Universitätsklinikum Ulm

Zentrum für Chirurgie

Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie

der Universität Ulm

Ärztliche Direktorin: Prof. Dr. med. Doris Henne-Bruns

Validierung von *Difluoro-dioxolo-benzoimidazol-benzamid* Derivaten als CK1-isoformenspezifische Inhibitoren *in vitro* und in Zellkultur

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von Sebastian Berg

geboren in Kiel

2013

Amtierender Dekan:		Prof. Dr. Thomas Wirth
1.	Berichterstatter:	Prof. Dr. Uwe Knippschild
2.	Berichterstatter:	Prof. Dr. Reinhold Schirmbeck
Tag der Promotion:		18.12.2014

Meinem Vater

Media vita in morte sumus

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 Bedeutung von Proteinkinasen 1

1.2 Die CK1-Familie 2

1.2.1 Spezifische Substrate und Konsensussequenz 3

1.2.2 Regulation von Expression und Aktivität der CK1 6

1.2.3 Die physiologischen Funktionen von CK1 8

1.2.4 Die Rolle von CK1 bei der Krankheitsentstehung 10

1.2.4.1 Kanzerogenese 11

1.2.4.2 Neurodegenerative Erkrankungen 11

1.2.4.3 Störungen des zirkadianen Rhythmus 12

1.2.5 Spezifische „small molecule inhibitors“ (SMIs) 12

1.3 Fragestellung und Zielsetzung der Dissertation 16

2. Material und Methoden 18

2.1 Material 18

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien 18

2.1.2 Verbrauchsmaterialien 19

2.1.3 Enzyme 19

2.1.4 Pipetten, Zentrifugen und sonstige Geräte 20

2.1.5 Zelllinien 21

2.1.6 Medium 22

2.1.7 CK1-spezifische Inhibitorsubstanzen 22

2.1.8 Softwareprogramme 23

2.2 Methoden 23

2.2.1 Bakterielle Expression und Aufreinigung des GST-Fusionsproteins 23

2.2.2 *In vitro*-Kinaseassays zur Bestimmung des CK1-vermittelten Phosphateinbaus 25

2.2.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen 27

2.2.4 Färben mit Coomassie Brilliant Blue 28

2.2.5 Nachweis des Phosphateinbaus durch Autoradiographie 29

2.2.6 Einfrieren und Auftauen der Zelllinien 29

2.2.7 Mediumwechsel und Passagieren der Zelllinien 29
2.2.8 MTT-Zytotoxizitäts-Assay 30
2.2.9 Bestimmung der Zellzyklusverteilung der Zellen durch FACS-Durchflusszytometrie 31
2.2.10 Statistische Methoden zur Auswertung der Ergebnisse 31

3. Ergebnisse 33
3.1 Einleitendes Screening der potentiellen Inhibitoren 33
3.2 Bestimmung der IC_{50}-Konzentrationen der Verbindungen und Validierung in Bezug auf Isoformenspezifität für CK1δ(FP449), CK1δKD und CK1ε 36
3.3 Bestimmung der EC_{50}-Konzentrationen und Validierung ausgewählter Verbindungen in etablierten Tumorzellen 41
3.4 Einfluss ausgewählter Inhibitoren auf die Zellzyklusverteilung etablierter Tumorzelllinien 45

4. Diskussion 52
4.1 Biochemische Charakterisierung der *Difluoro-dioxolo-benzoimidazol-benzamid* Derivate *in vitro* 53
4.2 Charakterisierung des antiproliferativen Potentials der neu identifizierten CK1-spezifischen Verbindungen und Einfluss auf die Zellzyklusverteilung in etablierten Tumorzelllinien 55

5. Zusammenfassung 58

6. Literaturverzeichnis 60

7. Abbildungsverzeichnis 81

8. Tabellenverzeichnis 82

9. Anhang 83

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
α	alpha
β	beta
γ	gamma
δ	delta
ε	epsilon
Abb.	Abbildung
APC	Adenomatous Polyposis Coli
aPK	atypische Proteinkinase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
(β-)APP	(β-)Amyloid precursorprotein
Bischof-5	2-Benzamido-N-(1H-benzo[d]imidazol-2 yl)thiazole-4-carboxamide Derivat, CK1-Inhibtor
bzw.	beziehungsweise
C-	Carboxyl-
CDK	cyclin dependent kinase
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ci	Curie
CK1	Casein Kinase 1
CK2	Casein Kinase 2
CKI-7	N-(2-Aminoethyl)-5-chloroisoquinoline-8-sulphonamide dihydrochloride, CK1-Inhibitor
CLOCK	Circadian locomotor output cycles kaput
cm	Zentimeter

CMGC	Gruppe von mehreren Kinasen: cyclin-dependent kinases (CDKs), mitogen activated protein kinases (MAP kinases), glycogen synthase kinases (GSK) und CDK-like kinases
CREB	cAMP response element binding protein
DEAD	Asp-Glu-Ala-Asp Aminosäuren
DDX3,DDX4,DDX5/6	RNA Helikasen der DEAD Box Familie
dH_2O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbeccos's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ePK	eukaryotische Proteinkinase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F12	Nutrient Mixture F-12, Zellkulturmedium
FACS	Flourescence activated cell sorting
FADD	Fas associated protein with death domain
FASPS	familial advanced sleep phase syndrom
FCS	fetal calf serum; Fötales Kälberserum
FP	Fusionsprotein
g	Gramm
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GSK3-β	Glykogen Synthase Kinase 3 β
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl) ethansulfonsäure, Puffersubstanz
IC261	3-[(2,4,6-Trimethoxyphenyl)methylidenyl]-indolin-2-one, CK1-Inhibitor
IC_{50}	50-prozentige inhibitorischeKonzentration
Inhib.	Inhibitor
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KD	Kinasedomäne
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KHD	Kinesin-homologe Domäne
Konz.	Konzentration
l	Liter
LB	Luria-Bertani Medium
LRP	Low density lipoprotein receptor related protein
M	molar (mol/l)
MAPK	mitogen activated protein kinase
MBP	Myelin basic protein
Mdm2	murine double minuteoncogene
Min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
mRNA	messenger ribonucleic acid
MSK1	mitogen and stress activated kinase 1
MTT- Farbstoff	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	beliebige Anzahl
N	Amino-
NaCl	Natriumchlorid
NCAM	neural cell adhesion molecule

NLS	nuclear localization signal: Kernlokalisationssequenz
NF-AT	Nuclearfactor of activated T-cells, Familie von Transkriptionsfaktoren
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nM	nanomolar
OD	optische Dichte
o.g.	oben genannten
P-	Phosphat-
p38-MAPK	p38 mitogen activated protein kinase
p53	Tumorsuppressor p53
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet derived growth factor
PER2/3	Period Proteine 2/3
PF-4800567	3-(3-chloro-phenoxymethyl)-1-(tetrahydro-pyran-4-yl)-1H-pyrazolo[3,4-yl]-pyrimidin-4-ylamine, CK1-Inhibitor
PF-670462	4-[3-cyclohexyl-5-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4yl]-pyrimidin-2-ylamin, CK1-Inhibitor
pH	pondus Hydrogenii
Phe	Phenylalanin
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PS	Penicillin/Streptomycin
RhoA	Rashomologe gene family, member A
RhoB	Rashomologe gene family, member B
RNA	Ribonucleic acid
Ror2	Tyrosine protein kinase transmembrane receptor
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, Zellkulturmedium

RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SDS-Page	Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
Sek	Sekunde
Ser	Serin
SGK	Serum/Glukokortikoid-induzierbare Kinase
S6K1	S6 Kinase 1
SLS	Serin-Leucin-Serin, nicht-kanonisches Konsensusmotiv
SMI	small molecule inhibitor
SNARE	soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor
sog.	sogenannt
SR-2890/3029	2-(aminomethyl)benzimidazoles Derivate, CK1-Inhibitoren
s.u.	siehe unten
SV40	Simian Virus 40
T	Threonin
Tab.	Tabelle
Tcf3/Lef	T-cell factor 3/Lymphoid enhancer factor
TEMED	N,N,N´,N´-tetramethylethylendiamine
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
V	Volt
v.a.	vor allem
vs.	versus; gegen
(v/v)	volume per volume
(w/v)	weight per volume

1. Einleitung

1.1 Bedeutung von Proteinkinasen

Die Zelle ist permanent einer großen Anzahl an Reizen und Signalen ausgesetzt, die auf den Gesamtorganismus des Körpers einwirken. Der Informationsfluss zwischen und innerhalb der einzelnen Zellen wird durch Signaltransduktionswege vermittelt, bei denen Proteine eine entscheidende Rolle spielen. Proteinkinasen, zu denen auch die Casein Kinasen zählen, katalysieren die Phosporylierung der entsprechenden Regulationsproteine und nehmen eine Schlüsselfunktion bei der Regulation zellulärer Prozesse ein (Perez et al. 2011). Die Rolle der Proteinkinasen spiegelt sich auch im menschlichen Genom wider: Von den insgesamt 30.000 bis 40.000 Genen kodieren allein über 500 für Proteinkinasen (Cohen 2001; Hanks 2003; Kostich et al. 2002; Lander et al. 2001; Peifer et al. 2009; Plowman et al. 1993; Rubin et al. 2000).

Von den bis heute bekannten 518 eukaryotischen Proteinkinasen sind 478 durch eine stark konservierte, katalytische Domäne charakterisiert. Sie bilden die Gruppe der eukaryotischen Proteinkinasen (ePK). Demgegenüber stehen 40 atypische Proteinkinasen (aPK), die keine Ähnlichkeit zu der eukaryotischen katalytischen Domäne aufweisen. Bei den ePKs wird weiter differenziert zwischen den Tyrosin-spezifischen und den Serin/Threonin-spezifischen Kinasen (Manning 2002).

Zu der Superfamilie der Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen gehören die beiden Vertreter CK1 und CK2, welche in der Literatur zu den ersten beschriebenen Proteinkinasen überhaupt gehören (Burnett and Kennedy 1954; Knippschild et al. 2005a; Pinna 1994). Die CK2 gehört aufgrund ihrer Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz zur Gruppe der CMGC-Proteinkinasen, während die CK1 Familie eine eigene phylogentische Gruppe repräsentiert (Tuazon and Traugh 1991). Ihren Namen haben die CK1 von dem Phosphoprotein Casein erhalten, welches den Kinasen *in vitro* als Substrat dient.

1.2 Die CK1-Familie

Die CK1 (Casein Kinase 1) Familie ist phylogenetisch hochkonserviert. In Säugetieren wurden mehrere CK1 Isoformen (Fish et al. 1995; Graves et al. 1993; Zhai et al. 1995) identifiziert. Auch in Hefezellen (z.B. *S. pombe* und *S. cerevisiae*) (DeMaggio et al. 1992; Dhillon and Hoekstra 1994; Wang et al. 1992), in Pflanzen (Klimczak and Cashmore 1993; Liu et al. 2003) sowie in *Xenopus laevis* (der glatte Krallenfrosch) und *Paramecium tetraurelia* (Pantoffeltierchen) wurden inzwischen zahlreiche Homologe gefunden (Pulgar et al. 1996; Walczak et al. 1993). Wie sich aus dem Namen schon erahnen lässt, bevorzugen die CKs bereits phosphorylierte oder saure Substrate. Als Phosphatspender dient ihnen ausschließlich ATP (Tuazon and Traugh 1991). In Säugetierzellen sind bis heute sieben verschiedene Isoformen von CK1 beschrieben, nämlich α, β, γ1, γ2, γ3, δ und ε (Fish et al. 1995; Graves et al. 1993; Zhai et al. 1995). Beim Menschen finden sich allerdings nur sechs der Isoformen, CK1β ist bisher nur bei Kühen gefunden worden (Cheong and Virshup 2011). Von CK1α, CK1γ3, CK1δ und CK1ε sind weiterhin verschiedene Spleißvarianten in Säugetieren bekannt (Wang et al. 1996; Zhai et al. 1995).

Die Molekulargewichte der einzelnen Isoformen liegen zwischen 37 kD für CK1α und 51 kD für CK1γ3. Innerhalb ihrer katalytischen Kinasedomäne (ca. 290 Aminosäuren (AS) lang) sind die Isoformen hochkonserviert. CK1δ und CK1ε stimmen beispielsweise zu ca. 97 % in ihrer Kinasedomäne (KD) überein, im nicht-katalytischen C-Terminus immerhin noch zu 53 %, während die beiden Isoformen CK1α und CK1ε zu 74 % in ihrer Kinasedomäne identische Sequenzen aufweisen (Cegielska et al. 1998; Gietzen and Virshup 1999). Die unterschiedlichen Molekulargewichte kommen durch die Varianz von Aminosäuren im N-Terminus (9 – 76 AS) und im C-Terminus (24 bis über 200 AS) zustande.

Die Domänenstruktur der humanen CK1δ ist in Abb. 1 dargestellt. Die Kinasedomäne (KD) wird hierbei vom 5 AS langen N-Terminus und vom 120 AS langen C-Terminus umschlossen. Der Bereich in der KD, der an der ATP-Bindung beteiligt ist, setzt sich vor allem aus Glycin-reichen Sequenzen zusammen. In der KD liegt auch die Kinesin-homologe Domäne (KHD), die bei Kinesinen für die Wechselwirkung mit den Mikrotubuli entscheidend ist (Roof et al. 1992). Außerdem ist in der KD eine putative Kernlokalisationssequenz (NLS=nuclear

localization signal) enthalten, die auch beim T-Antigen des Simian Virus 40 (SV40) vorkommt (Rowles et al. 1991; Tuazon and Traugh 1991; Zhai et al. 1995). Diese Kernlokalisierungssequenz besteht aus wenigen Aminosäuren und markiert Proteine, die in den Zellkern eingeschleust werden sollen. Fu und Mitarbeiter zeigten jedoch, dass diese NLS wahrscheinlich nicht ausreichend für den Kerntransport ist. Eine Lokalisation im Kern konnte nur für Spleißvarianten von CK1α gezeigt werden, bei denen zusätzlich neben der NLS ein weiteres L-Exon eingefügt war (Fu et al. 2001).

Typisch für die Serin/Threonin-Kinasen ist deren bilobulärer Aufbau in der dreidimensionalen Struktur. Sie setzt sich aus jeweils neun α-Helices und β-Faltblättern zusammen. Durch die Faltung ensteht so eine kleinere β-Domäne am N-Terminus und eine größere α-Domäne, die C-terminal liegt. Die ATP-Bindungsstelle setzt sich wie bereits genannt aus der Glycin-reichen Sequenz Gly-Glu-Gly-Ser-Phe-Gly zusammen und bildet das katalytische Zentrum. Die Flexibilität der Gesamtstruktur wird durch eine Scharnierregion zwischen der α- und der β-Region gewährleistet (Taylor et al. 1992).

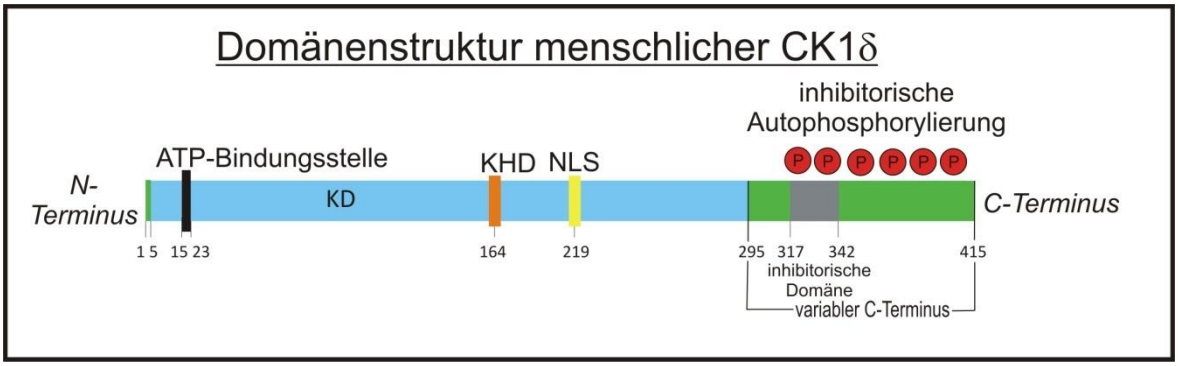


Abb. 1: Domänenstruktur der menschlichen CK1δ-Isoform.
Die unten stehenden Zahlen kennzeichnen die Positionen der Aminosäuren. Abkürzungen: N-: Amino-; KHD: Kinesin-homologe Domäne; NLS: nuclear localization signal=Kernlokalisationssequenz; C-: Carboxyl-; P: Phosphat; KD: Kinasedomäne

1.2.1 Spezifische Substrate und Konsensussequenz

Die Substrate von CK1 sind überwiegend Proteine mit sauren AS wie Aspartat (Asp) oder Glutamat (Glu). Diese Substratspezifität erklärt sich durch die hohe Konzentration von positiven Ladungen um die Substratbindungsstelle (Anion-binding site) der CK1-Kinasedomäne (Longenecker et al. 1996). Für CK1 sind verschiedene Erkennungsmotive bekannt. Die typische kanonische Konsensusse-

quenz weist folgende Architektur auf: S(P)/T(P)-X-X-S/T. S(P) bzw. T(P) steht für einen phosphorylierten Serin- bzw. Threoninrest. Das X steht für jede beliebige Aminosäure. Dieses AS-Motiv wiederholt sich und bildet durch Phosphorylierung die Erkennungssequenz weiterer Phosphorylierungen. Auf diese Weise läuft die Phosphorylierung sehr effizient und fortlaufend ab. Allerdings haben Forschungsergebnisse gezeigt, dass die vorhergehende Phosphorylierung nicht zwingend notwendig ist (Agostinis et al. 1989; Flotow and Roach 1991; Longenecker et al. 1996). Alternativ kann es auch durch eine Ansammlung von negativ geladenen Aminosäuren zur Phosphorylierung kommen.
Weitere Erkennungsmotive für eine Phosphorylierung durch CK1 bilden die nicht-kanonische Sequenz (SLS=Serin-Leucin-Serin), wie man sie in NF-AT oder β-Catenin findet (Knippschild et al. 2005a). Weiterhin ist das Phosphorylierungsmotiv K/R-X-K/R-X-X-S/T bekannt, welches sich in Sulfatid und Cholesterol-3-Sulfat (SCS)-Bindungsproteinen, wie z.B „myelin basic protein“ (MBP) oder Tau Protein, findet. K steht hier für Lysin (Lys), R für Arginin (Arg), während S/T den Serin/Threonin-Rest darstellt (Kawakami et al. 2008). Hierdurch erlangt CK1 an Bedeutung bei der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen (s.u.).
Es spielen aber nicht nur die Konsensussequenz bzw. die Akkumulation negativ geladener Aminosäuren bei der Phosphorylierung eine Rolle. Entscheidend für eine korrekte Substraterkennung ist außerdem die vorherrschende Tertiärstruktur des Proteins (Cegielska et al. 1998). Amanchy und Mitarbeiter haben bei *in vitro* Versuchen gezeigt, dass verschiedenste Phosporylierungsmotive von CK1 Isoformen erkannt werden (Amanchy et al. 2011).

Die physiologische Bedeutung der CK1 Mitglieder wird verdeutlicht durch die Vielzahl von Proteinen, die CK1 Isoformen als Substrat dienen. Hierzu gehören u.a. Transkriptions- und Translationsfaktoren, Onkogene, Tumorsuppressoren, Zellzyklusproteine und viele weitere. Die Tabelle 1 gibt einen Überblick über die wichtigsten in der Literatur beschriebenen CK1-Substrate.

Tab. 1: CK1-Substrate und ihre physiologischen Funktionen.

Modifiziert nach (Knippschild et al. 2005a). Die verschiedenen Substrate und ihre physiologische Bedeutung wurden von folgenden Autoren beschrieben:(Behrend et al. 2000b; Bustos et al. 2005; Cheong and Virshup 2011; Dupre-Crochet et al. 2007; Eder et al. 1986; Eide et al. 2002; Faundez and Kelly 2000; Feng and Davis 2000; Grasser et al. 1988; Gross et al. 1995; Haas and Hagedorn 1991; Hicke et al. 1998; Kawakami et al. 2008; Kuret et al. 1985; Lee et al. 2001; Link et al. 1993; Liu et al. 2002; Lu et al. 1985; Mackie et al. 1989; Marchal et al. 2002; Milne et al. 2001; Nakajo et al. 1987; Okano et al. 2004; Pal et al. 2008; Poulter et al. 1988; Quintavalle et al. 2007; Regad et al. 2007; Rubinfeld et al. 2001; Sakanaka 2002; Singh et al. 1982; Smelkinson et al. 2007; Soong et al. 1987; Swiatek et al. 2004; Szabo et al. 2009; Tillement et al. 2008; Tipper et al. 1983; Tobin et al. 1997; Umphress et al. 1992; von Blume et al. 2007; Wolff et al. 2006; Agostinis et al. 1989; Alappat et al. 2005; Behrend et al. 2000b; Chen et al. 2005a; Chen et al. 2005b; Christmann and Dahmus 1981; Davidson et al. 2005; Desagher et al. 2001; Desdouits et al. 1995a; Desdouits et al. 1995b; Dubois et al. 1997; Flajolet et al. 2007; Gao et al. 2000; Giamas et al. 2009; Gonzales et al. 2008; Grozav et al. 2009; He et al. 2006; Huang et al. 2007; Knippschild et al. 2005a; Lin et al. 1996; Marin et al. 1994; Mishra et al. 2004; Peters et al. 1999; Singh et al. 1995; Walter et al. 2001; Wang et al. 1992; Wang et al. 2008; Winter et al. 2004; Xu et al. 2008; Yanagawa et al. 2002; Zeng et al. 2005)**.**

Abkürzungen: MAP4=Mikrotubuli-assoziiertes Protein 4; 14-3-3 Proteine=Proteine aus der 14. Fraktion bovinen Hirn-Homgenisats an der Position 3.3; Acetyl-CoA=Acetyl-Coenzym A; AP 3 Komplex=Adaptor protein complex 3; APC=Adenomatous Polyposis Coli; Bid=BH3 domain-containing protein; BMAL1=Brain and Mucle Arnt like Protein 1; CDK5=Cyclin-abhängige Kinase 5; CRY=Cryptochrome; ER α=estrogen receptor α; FADD=Fas associated protein with Death Domain; FoxG1=Forkhead box protein G1; IF= Initiation Factor; L4, L8, L13=Ribosomale Proteine; LRP5/6=Low Density Lipoprotein 5/6; MBP=myelin basic protein; MdM2=Murine double minute 2; MdMX=Murine double minute X; Mih1=Mphase inducer phosphatase; mPER=Period Protein; MTA1s=Metastatisches Tumor Antigen 1, short form; NCAM=Neuronal Cell adhäsion Molecule; p53=Tumorsuppressor p53; PDGF-R=Plateled DerivedGrowth Factor Receptor; PKC=Protein Kinase C; PKD2=polycystic kidney disease 2; Rho A/B=Ras homolog gene family, member A/B; RIP1=receptor interacting protein 1; SMAD1-5 =S-mothers againstdecapentaplegic 1-5; SR Proteine=serine/arginine-rich proteins; β-APP=β-Amyloid precursor protein; STAR PAP=Starnuclear poly(A) polymerase; SV2=Synaptic vesicle protein 2; Swi6=Swi6 Protein aus Saccharomyces pombe; TcF3=T-Zell Faktor 3; Parkin=Enzym, das defekte Proteine markiert; TDP-43=TAR DNA-binding protein 43; CERT=ceramide transfer protein; Ubr1=Ubiquitin-Protein-Ligase; DARPP-32=dopamine and cAMP regulated phosphoprotein; nm23H1=Tumorsuppressor; Ror2=Tyrosine protein kinase transmembrane receptor

Physiologische Funktionen	*CK1-Substrate*
Signaltransduktionsmoleküle	Smad 1,2,3,5 (S-mothers against decapentaplegic 1-5)
Metastatische Tumorantigene	MTA1 (metastatic tumor antigen 1 short form)
Faktoren bei neurodegenerativen Prozessen	Presenilin-2 , β-Sekretase, γ-Sekretase, Tau Protein, Parkin, TDP-43 (TAR DNA-binding protein 43), β-APP (β-amyloid precursor protein)
Ribosomale Enzyme	15 kDa, 20 kDa, 35 kDa, L4, L8, L13
Metabolische Enzyme	Acetyl-CoA Carboxylase, Glykogen-Synthase, CERT (ceramide transfer protein), Ubr1 (Ubiquitin-Protein-Ligase)
Translationsfaktoren	IF (Initiation factor) 4B, 4E, 5
Rezeptor assoziierte Proteine	FADD (Fas associated protein with death domain), RIP1 (receptor interacting protein)
Inhibitoren und Modulatoren	Phosphatase modulator subunit (inhibitor 2), DARPP-32 (dopamine and cAMP regulated phosphoprotein), Dishevelled, 14-3-3 Proteine , mPER (Period), APC (adenomatous polyposis coli protein), Bid, CPI-17 (protein kinase C-potentiated inhibitor protein of 17kDa), Mdm2

	(murine double minute oncogene), Mdmx, Lectin Galectin-3, dMyc, AIP1 (ASK-interacting protein 1)
Zytoskelett- und Interaktionsproteine	Myosin, Troponin, Anykyrin, Spektrin 3, Filamin, Vinculin, Neurofilamentproteine, Dynein, α/β-Tubulin, MAP4 (Mitogen-activated protein Kinase 4), Stathmin, Keratin 17, Desmolein, Annexin II, RhoB (Ras homologe gene family, member B), RhoA (Ras homologe gene family, member A), MBP (myelin basic protein), nm23-H1, CREB (cAMP response elment-binding protein)
Rezeptoren	β- Untereinheit des Insulinrezeptors, TNFα-Rezeptor (Tumornekrosefaktor α), Muskarin M3-Rezeptor, Ste2p (α-Faktor-Rezeptor), PDGF-Rezeptor (Platelet-derived growth factor), Ror2 (Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor) Retinoid X Rezeptor, LRP 5/6 (Low-density lipoprotein receptor-related protein), ERα (Endoplasmatisches Reticulum alpha)
Transkriptions- und Splicefaktoren	RNA Polymerase I/II, p53, Swi6 (chromodomain protein Swi6), NF-AT (Nuclear factor of activated T-cells), SR Proteine (Serin/Arginin-reiche Proteine), Tcf3 (T-cell factor 3), BMAL1 (brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)-like), CRY (Cryptochrom), β-Catenin, Armadillo, Smad 1-3, 5; FoxG1 (Forkhead box G1)
Zelluläre und virale Onkogene	MDM2 (Murine double minute 2), MDMX (Murine double minute X), SV40 T-Antigen
Adhäsionsfaktoren	NCAM (Neural cell adhesion molecule), E-Cadherin, Lectin Galectin-3
Phosphatasen und Kinasen	CDK5 (cyclin abhängige Kinase 5), PKC (Proteinkinase C), PKD2 (Protein Kinase D2) Mih1/cdc25 (Mitosis initiation protein/cyclin dependent kinase)
Membrantransporter	Erythrozyten-Anionentransporter, Uracil-Permease (*S. cerevisiae*), α-T663-hENaC (human epithelial sodium channel)
DNA assoziierte Enzyme und Faktoren	Nicht-Histon Chromatin-Proteine, L-29, Topoisomerase IIα, Star-PAP (Poly-A-Polymerase)
Vesikel assoziierte Proteine	SV2 (synaptic vesicle-specific protein), β3A-, β3B- Untereinheiten des AP-3 (adapter protein) Komplexes, Snapin

1.2.2 Regulation von Expression und Aktivität der CK1

Die Mitglieder der CK1 Familie sind als konstitutiv aktive Enzyme an vielen zellulären Vorgängen beteiligt. Hierzu bedarf es einer strengen Regulation ihrer Kinaseaktivität auf verschiedenen Ebenen.

Zu den Regulationsmechanismen auf Proteinebene gehören posttranslationale Modifikationen, insbesondere die reversible Phosphorylierung (Cegielska et al.

1998). Die inhibitorische Autophosphorylierung stellt einen wichtigen Mechanismus der CK1 Regulation dar. In diesem Fall blockieren die als Pseudosubstrate fungierenden autophosphorylierten Domänen ihr eigenes katalytisches Zentrum (Budini et al. 2009; Gietzen and Virshup 1999; Graves and Roach 1995). Da diese Autophosphorylierungssequenzen im C-Terminus lokalisiert sind, erklärt sich auch die 2 - 3-fach gesteigerte Kinaseaktivität, wenn Endopeptidasen die inhibitorischen Sequenzen im C-Terminus abspalten oder es durch Phosphatasen zur Dephosphorylierung kommt (Carmel et al. 1994; Cegielska et al. 1998; Rivers et al. 1998). Behandelt man CK1ε mit speziellen Phosphatasen, so erhöht sich die Kinaseaktivität um das 20-fache, da entsprechende C-terminale Autophosphorylierungsbereiche entfernt werden (Carmel et al. 1994; Cegielska et al. 1998; Graves and Roach 1995; Swiatek et al. 2004).

Zu einer Abnahme der Substratphosphorylierung kommt es hingegen, wenn CK1δ an der Stelle Serin 370 durch die cAMP-abhängige Proteinkinase PKA phosphoryliert wird (Giamas et al. 2007).

Bei Behandlung mit Topoisomerase-Hemmstoffen kommt es im Gegensatz dazu durch die erhöhten mRNA Level zu einer Aktivitätssteigerung (Knippschild et al. 1997). Des Weiteren kann es auch durch Auftreten einzelner Mutationen zur Beeinflussung der Aktivität kommen. Wird beispielsweise Serin 370 durch Alanin ersetzt, phosphoryliert CK1δ vermehrt β-Casein und GST-p53 (Giamas et al. 2007).

Neben der Regulationsbeeinflussung auf Proteinebene ist die intrazelluläre Kompartimentierung ein wichtiger Faktor der CK1 Regulation. Studien bei CK1-Homologen in Hefen haben gezeigt, dass die räumliche Nähe von Kinase und Substrat einen Einfluss auf die Funktion hat (Ho et al. 1997; Vancura et al. 1994).

Die Lokalisation der Kinase kann sich aber im Laufe des Zellzyklus verändern. Die Umverteilung ist besonders gut bei Säugetieren für CK1α beschrieben. Während der Interphase ist diese Isoform v.a. am Endoplasmatischen Retikulum (ER), an Transportvesikeln und dem Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert (Gross et al. 1995). In der Mitose hingegen befindet sich CK1α überwiegend am Spindelapparat und den Zentrosomen (Brockman et al. 1992). Ähnliche Lokalisationen wurden auch für CK1δ beschrieben (Behrend et al. 2000b; Milne et al. 2001). Die Studien zeigen auch, dass es bei Mutationen an Isoprenylresten, die für die Verankerung von CK1γ an der inneren Zytoplasmamembran zuständig sind, zu Einschränkungen

der Kinaseaktivität kommen kann, da sich die CK1-Homologe nicht mehr an ihrer ursprünglichen physiologischen Lokalisation befinden (Ho et al. 1997; Vancura et al. 1994; Ventura and Nebreda 2006; Wang et al. 1992).
Durch die Interaktion mit zellulären Proteinen kann es ebenfalls zur Modulation der Kinaseaktivität von CK1 Isoformen kommen. Neueste Ergebnisse zeigen, dass CK1ε durch die Interaktion mit den DEAD Box RNA Helikasen DDX3, DDX4 und DDX5/6 aktiviert wird. Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch die Isoformen CK1α, CK1δ und CK1γ2 durch DDX3 stimuliert werden (Cruciat et al. 2013).

Es gibt noch weitere Effektoren und Regulationsmechanismen, die zu einer veränderten Expression der CK1 Isoformen führen. Hierzu zählt die verstärkte Kinaseaktivität durch virale Transformation und γ-Bestrahlung (Elias et al. 1981; Santos et al. 1996; Sudha et al. 2012). Die dreidimensionale Anordnung scheint ebenso eine Rolle zu spielen bei der Regulation der Aktivität. Speziell bei CK1δ kann es zur Bildung von Dimeren kommen, wodurch die Kinaseaktivität abnimmt (Longenecker et al. 1996). Cobb und Mitarbeiter konnten durch Behandlung mit Insulin eine Veränderung der Aktivität, in diesem Fall eine Steigerung, beobachten (Cobb and Rosen 1983).

1.2.3 Die physiologischen Funktionen von CK1

Wie aus der Tab. 1 bereits ersichtlich wird, sind die Mitglieder der CK1 Familie an vielen physiologischen Prozessen beteiligt. Hierzu zählen u.a. die Aufgaben bei der Regulation von Membrantransportprozessen (Murakami et al. 1999; Panek et al. 1997) bei DNA Reparaturmechanismen, Zellzyklusprogression, Zytokinese (Robinson et al. 1993) und der SNARE gesteuerten synaptischen Exozytose von Vesikeln (Dubois et al. 2002; Lin and Scheller 2000; Shuang et al. 1998). Isoformen von CK1 sind beteiligt an der Aufrechterhaltung des neurologischen Gleichgewichts durch hemmende Phosphorylierung von exzitatorischen NMDA-Rezeptoren. CK1 haben auch einen Einfluss auf die zirkadiane Rhythmik des Körpers. Durch Phosphorylierung von PER (period protein) durch CK1δ/ε kommt es zu dessen Abbau durch Degradation im Proteasom. Bindet CRY (cryptochrome protein) an PER, wird der Abbau verhindert und zusammen mit CK1δ/ε wandert der Komplex in den Zellkern. Im Zellkern wird durch negative Rückkopplung der

Komplex BMAL1/CLOCK gehemmt und so die eigene Transaktivierung und die weiterer „target genes“ verhindert (Chergui et al. 2005; Ebisawa 2007b; Eide et al. 2002; Lowrey et al. 2000; Miyazaki et al. 2001a; Miyazaki et al. 2001b; Partch et al. 2006; Reppert and Weaver 2002; Vielhaber et al. 2000).

Den CK1 Isoformen werden weiterhin modulatorische Einflüsse bei der Apoptose zugesprochen, insbesondere anti-apoptotische Eigenschaften (Alappat et al. 2005; Alappat et al. 2003; Beyaert et al. 1995; Cheong and Virshup 2011; Desagher et al. 2001; Knippschild et al. 2005a). Eine wichtige Rolle spielen proliferative Signalwege, bei deren Regulation CK1 modulierend wirken kann und die häufig bei Tumoren dysreguliert sind. CK1 kann dabei sowohl aktivierend als auch hemmend auf die Signalübertragung einwirken. Ein Beispiel ist der proliferative Wnt-Signaltransduktionsweg, bei dem es durch Bindung des Signalmediators Wnt an seine beiden Rezeptoren Frizzled (Fz) und LRP 5/6 (low density lipoprotein receptor related protein 5/6) über eine Signalkaskade zur Expression der verschiedenen Zielgene kommt.

Bei Aktivierung des Wnt-Signalweges durch eine CK1δ/ε-abhängige Phosphorylierung des Proteins Dishevelled (Dvl) kommt es zur Stabilisierung des β-Catenin Komplexes. Diese Stabilisierung führt dazu, dass β-Catenin in den Zellkern wandert und es zur Expression der Zielgene kommt. Einen aktivierenden Einfluss auf den Wnt-Signalweg hat außerdem die Phosphorylierung von LRP 5/6 durch CK1γ, indem es zu einer stärkeren Interaktion mit dem Schlüsselprotein Axin kommt.

Im kanonischen Signalweg hingegen wirkt CK1α hemmend auf die Signalübertragung durch die Interaktion mit dem Schlüsselprotein β-Catenin. Kommt es zur Phosphorylierung von β-Catenin durch CK1α an der Stelle S45, so wird β-Catenin zusätzlich von GSK3-β phosphoryliert, anschließend ubiquitiniert, durch Proteasomen degradiert und so eine Signalübertragung verhindert (Amit et al. 2002; Hernandez et al. 2012; Liu et al. 2002; Price 2006).

Ein weiteres Beispiel für die Beteiligung von CK1 an Signalwegen sind Hedgehog-abhängige Differenzierungsprozesse. Hierbei handelt es sich um Signalwege, die eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung spielen und beim Menschen z.B. für die korrekte Bildung von Gliedmaßenanlagen verantwortlich sind (Bryja et al. 2007; Cajanek et al. 2013; Davidson et al. 2005; Hino et al. 2003; Kalderon 2005; Knippschild et al. 2005b; Leyns et al. 1997; McKay et al. 2001;

Molenaar et al. 1996; Price 2006; Umar et al. 2007; van Noort et al. 2002; Wang et al. 1996; Zeng et al. 2005).

Die medizinische Bedeutung von CK1 wird deutlich, wenn man den Einfluss von CK1 bei der Kanzerogenese bedenkt. Auch hier können - in Abhängigkeit des jeweils phosphorylierten Proteins - unterschiedliche, teils gegensätzliche, Auswirkungen beobachtet werden. Am Beispiel des Tumorsuppressorproteins p53, welches u.a. wichtig für die DNA Reparatur und die Induktion apoptotischer Signalwege oder eines Zellzyklusarrests ist, sei dies kurz dargestellt (Lane 1992).

Wenn p53 durch CK1α/δ/ε site-spezifisch phosphoryliert wird, löst es sich verstärkt von seinem Gegenspieler, dem Onkoprotein MDM2 (murine double minute chromosome 2), wird dadurch frei und aktiv. Der Bindungspartner MDM2 kann jedoch ebenfalls von CK1α phosphoryliert werden. In diesem Fall kommt es zur stärkeren Bindung von p53 an MDM2 und der Tumorsuppressor wird vermehrt im Proteasom abgebaut und dadurch in seiner Funktion geschwächt. CK1 besitzt folglich eine Doppelfunktion: Einerseits werden onkogene Prozesse durch Phosphorylierung von Onkoproteinen gefördert, andererseits können ebenso Tumorsupressorfunktionen aktiviert werden (Alsheich-Bartok et al. 2008; Chen et al. 2005a; Dumaz et al. 1999; Haupt et al. 1997; Huart et al. 2012; Knippschild et al. 2005b; Kubbutat et al. 1997; MacLaine et al. 2008).

1.2.4 Die Rolle von CK1 bei der Krankheitsentstehung

Die Tatsache, dass CK1 an zahlreichen physiologischen Vorgängen beteiligt ist, bedeutet gleichzeitig, dass eine genaue Regulation der Expression und Aktivität notwendig ist. Mutationen oder Dysregulationen der einzelnen Isoformen können zu klinisch relevanten Erkrankungen bis hin zur malignen Entartung in verschiedenen Organen führen (Garzia et al. 2008; Mishra et al. 2004; Reya and Clevers 2005; Taipale and Beachy 2001).

1.2.4.1 Kanzerogenese

Durch die Dysregulation von CK1 kann es zur Tumorgenese kommen, z.B. im Rahmen der oben bereits dargestellten verstärkten Aktivierung des proliferativen Wnt-Signalweges (Kalderon 2002; Vielhaber and Virshup 2001).
Bei vielen Tumorentitäten findet man eine veränderte Expression der CK1 Isoformen in Abhängigkeit des jeweiligen Differenzierungsgrades. Die folgenden malignen Erkrankungen weisen eine erhöhte Expression auf: Akute myeloische Leukämie AML (CK1), gut differenzierte duktale Mamma-Karzinome, Nierenzellkarzinom (CK1γ3), duktales Pankreaskarzinom (CK1ε und CK1δ), Ovarialkarzinom (CK1ε) und Chorionkarzinom (CK1δ) (Brockschmidt et al. 2008; Desagher et al. 2001; Dreyling et al. 2007; Elias et al. 1981; Izeradjene et al. 2004; Knippschild et al. 2005b; Masuda et al. 2003; Rodriguez et al. 2012; Stoter et al. 2005). Ein Schlüsselschritt bei der Entstehung von Mamma-Karzinomen ist die Bildung des sog. nm23-H1-h-prune-Komplexes. Laut neueren Studien wird diese Komplexbildung verstärkt, wenn nm23-H1 vermehrt durch CK1 phosphoryliert wird. Garzia und Mitarbeiter zeigten zudem in einem zellulären Mamma-Ca-Modell, dass die Behandlung mit dem CK1δ/ε-spezifischen Inhibitor IC261 zur Hemmung der zellulären Motilität führt (Garzia et al. 2008). IC261 wirkt darüber hinaus hemmend auf pankreatische Tumorzellen und im Tiermodell induzierte Tumoren (Brockschmidt et al. 2008).

1.2.4.2 Neurodegenerative Erkrankungen

Die gesteigerte Phosphorylierung durch CK1 kann zu Erkrankungen des Nervensystems führen. Das Tau-Protein wird beispielsweise durch CK1δ, das β-Amyloid durch CK1ε/α und Presinilin-2 durch CK1δ phosphoryliert (Hanger et al. 2007; Walter et al. 2001; Walter et al. 1998). Eine Akkumulation dieser hyperphosphorylierten Proteine steht in Verbindung mit der Alzheimer Erkrankung. So weisen Alzheimer-Patienten in den entsprechenden Hirnregionen (z.B. Hippokampus) häufig erhöhte CK1δ mRNA Spiegel auf (Yasojima et al. 2000).

1.2.4.3 Störungen des zirkadianen Rhythmus

Die familiäre Schlafstörung FASPS (Familial advanced sleep-phase syndrome) kann durch Missense-Mutationen im CK1δ-Gen sowie durch Mutationen der Bindungsdomäne im PER2-Gen hervorgerufen werden (Xu et al. 2005). Außerdem gibt es Hinweise, dass Polymorphismen im PER3-Gen zu einer veränderten Phosphorylierung führen und so das verzögerte Schlafphasen-syndrom DSPS (Delayed sleep-phase syndrome) verursachen. Die beiden Gene PER2 und PER3 gehören zur Familie der CLOCK (Circadian locomotor output cycles kaput) Proteine und beeinflussen über den zirkadianen Rhythmus u.a. den menschlichen Stoffwechsel und das Verhalten. So konnten selbst affektive Symptome über veränderte CLOCK Proteine mit CK1 in Verbindung gebracht werden (Ebisawa 2007a).

1.2.5 Spezifische „small molecule inhibitors“ (SMIs)

In den vorangegangenen Kapiteln wurde bereits mehrfach auf die große Bedeutung von CK1 bei der Tumorentstehung und -progression hingewiesen. Aus diesem Grund gerät die Entwicklung spezifischer CK1-Inhibitoren zunehmend in den Blickpunkt therapeutischer Medizin. Die „small molecule inhibitors“ (SMIs) sollen möglichst selektiv wirken, um auftretende Nebenwirkungen gering zu halten. Eine Beeinflussung der Kinasenregulierung kann abhängig von der jeweils inhibierten Kinase verschiedene schwerwiegende Folgen haben, die es zu berücksichtigen gilt (Faivre et al. 2006; Zhang et al. 2009). Der Mechanismus, über den die meisten spezifischen Inhibitoren wirken, ist die kompetitive Hemmung von ATP an dessen hochkonservierter Bindungsstelle (siehe Abb. 1). Grundsätzlich lassen sich die Inhibitoren in verschiedene Kategorien einteilen. Inhibitoren vom *Typ I* hemmen kompetitiv die aktiven Enzyme, während Vertreter vom *Typ II* nur die inaktive Form des Enzyms hemmen (Liu and Gray 2006). Als allosterische Inhibitoren werden solche bezeichnet, die nicht kompetitiv wirken, außerhalb des aktiven Zentrums ansetzen und dessen Konformation verändern können. Diese Inhibitoren werden zum *Typ III* gezählt. Zum *Typ IV* werden Inhibitoren gezählt, die irreversibel die Kinaseaktivität durch kovalente Bindung am enzymatisch aktiven Zentrum der Kinase hemmen (Dar and Shokat 2011). Vor

allem für die Proteinkinasen-spezifischen Inhibitoren vom Typ I und II gilt, dass ihre Ähnlichkeit zum Nukleotid ATP groß ist und es dadurch zu Wechselwirkungen mit vielen anderen Enzymen kommt, die ebenfalls Nukleotide benutzen. Hierdurch erklärt sich auch die hohe Toxizität einiger ATP-kompetitiver Inhibitoren, weil diese zum Funktionsausfall wichtiger Enzyme führen können. Genetische Varianten der einzelnen Isoformen, die sich nur durch einzelne AS unterscheiden, können bereits zu Resistenzentwicklung führen. Zhang und Mitarbeiter beschreiben den perfekten Inhibitor daher als Substanz, die einerseits hochselektiv wirkt, andererseits aber eine gewisse Toleranz gegenüber kleinen genetischen Variationen erlaubt, um so eine schnelle Resistenzentwicklung zu verhindern (Zhang et al. 2009).

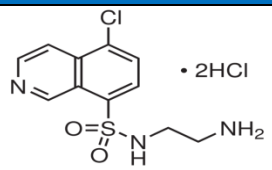
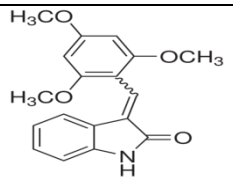
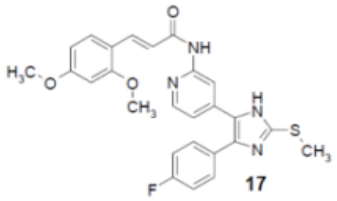
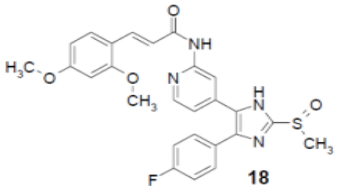
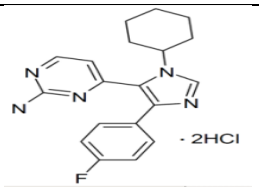
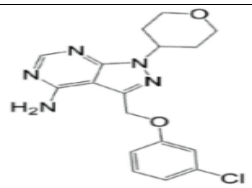
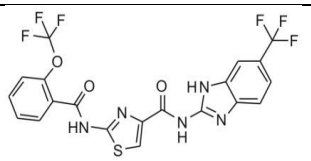
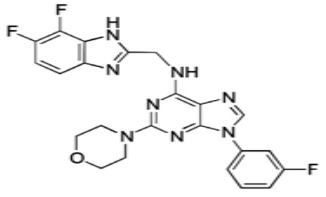
Der erste ATP-kompetitive CK1-spezifische Inhibitor mit einer 50-prozentigen inhibitorischen Konzentration (IC_{50}), die im mikromolaren Bereich lag, war CKI-7 (N-(2-Aminoethyl)-5-chloroisoquinoline-8-sulphonamide dihydrochloride) (Chijiwa et al. 1989). Dieser Inhibitor hemmt neben CK1 jedoch auch weitere Kinasen. Bei einer ATP-Konzentration von 0,1 mM werden SGK (Serum/Glukokortikoid-induzierbare Kinase), die ribosomale S6 Kinase-1 (S6K1) und MSK1 (mitogen and stress activated kinase 1) gleichermaßen stark inhibiert wie CK1 (Chijiwa et al. 1989; Rena et al. 2004).

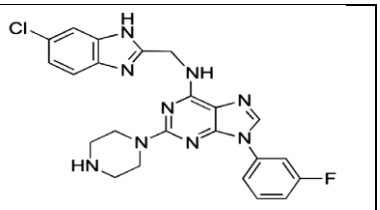
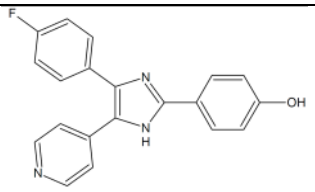
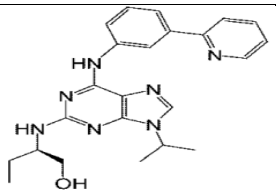
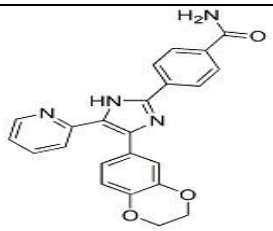
Ein weiterer heterozyklischer Inhibitor ist IC261 (3-[(2,4,6-Trimethoxyphe-nyl)methylidenyl]-indolin-2-one). Dieses Oxoindol wirkt wie auch CKI-7 ATP-kompetitiv und hemmt spezifisch die CK1α (IC_{50} 16 µM), CK1δ (IC_{50}1 µM) und CK1ε (IC_{50} 1 µM) (Mashhoon et al. 2000). Ein Vorteil gegenüber dem Inhibitor CKI-7 ist die bessere Membrandurchlässigkeit, da IC261 bei physiologischem pH ungeladen vorliegt. Cheong und Mitarbeiter fanden allerdings heraus, dass die zytotoxischen Effekte von IC261 nicht allein auf der Hemmung der CK1 beruhen. IC261 führt zu *off-target* Effekten durch die Fähigkeit, an die „colchicine-binding site“ des Tubulins zu docken, wodurch die Polymerisation der Mikrotubuli verhindert wird (Cheong and Virshup 2011). Zu den aktuell potentesten ATP-kompetitiven Inhibitoren zählen die Imidazolderivate Compound 17 und Compound 18 (Peifer et al. 2009).

Der CK1-Hemmer PF-670462 (4-[3-cyclohexyl-5-(4-fluoro-phenyl)-3H-Imidazol-4yl]-pyrimidin-2-ylamin) gehört ebenfalls zu den neueren Inhibitoren, mit einer IC_{50} von 7,7 nM für CK1ε und einer IC_{50} von 14 nM für CK1δ (Badura et al. 2007).

Nachteilig bei diesem Inhibitor ist jedoch, dass er nicht spezifisch für eine der beiden Isoformen ist. Eine Weiterentwicklung hinsichtlich der Isoformenspezifität stellt hierbei PF-4800567 (3-(3-chloro-phenoxymethyl)-1-(tetrahydro-pyran-4-yl)-1H-pyrazolo[3,4-yl]-pyrimidin-4-ylamine) dar, der CK1ε (IC_{50} 32 nM) wesentlich stärker inhibiert als CK1δ (IC_{50} 711 nM) (Walton et al. 2009). Bischof und Mitarbeiter fanden einen sehr spezifischen „small molecule inhibitor“, ein 2-Benzamido-N-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thiazole-4-carboxamide Derivat. Dieser Inhibitor, Bischof-5, besitzt für CK1δKD eine IC_{50} im niedrig-nanomolaren Bereich und weist eine 5-fach stärkere Affinität für CK1δ gegenüber CK1ε auf (Bischof et al. 2012). Zwei weitere sehr potente CK1δ-spezifische Inhibitoren stellen SR-2890 und SR-3029 dar, bei denen es sich um Modifizierungen von Purinhemmstoffen handelt. Bibian und Mitarbeiter beschreiben für diese neu identifizierten Inhibitoren IC_{50}-Konzentrationen für CK1δ unter 50 nM sowie entsprechende EC_{50}-Konzentrationen unter 100 nM in Zellkulturexperimenten (Bibian et al. 2013). Allerdings finden sich in der Publikation keine Angaben zur ATP-Konzentration, bei der die IC_{50}-Werte ermittelt wurden, so dass sich die Ergebnisse schwer beurteilen lassen. In der nachfolgenden Tabelle sind weitere in der Literatur beschriebene CK1-Inhibitoren aufgeführt. Die im Text genannten Substanzen sind in der Tabelle 2 zuerst aufgeführt.

Tab. 2: Zusammenstellung einiger CK1-Inhibitoren.
Angegeben sind jeweils die Substanznamen, die bekannten IC_{50}-Werte, die Literaturquellen und außerdem die Konzentration von ATP, bei der die jeweilige IC_{50} bestimmt wurde. Diese ist ausschlaggebend, da die meisten Inhibitoren ATP-kompetitiv sind und somit um die Bindungsstelle des Substrats konkurrieren.
Abkürzungen: IC_{50}: 50 % inhibitorische Konzentration; ATP-Konz.: ATP-Konzentration; µM: mikromolar; nM: nanomolar; CK1α, δ, δKD und ε: Casein Kinase 1 alpha, delta, delta Kinasedomäne und epsilon; k.A.: keine Angaben in der Publikation

Inhibitor	IC_{50}	ATP-Konz.	Referenz	Struktur
CKI-7	6 µM für CK1	100 µM	(Chijiwa et al. 1989; Rena et al. 2004)	
IC261	1 µM für CK1δ 1 µM für CK1ε 16 µM für CK1α	10 µM	(Mashhoon et al. 2000)	
Compound 17	0,004 µM für CK1δ	100 µM	(Peifer et al. 2009)	
Compound 18	0,005 µM für CK1δ	100 µM	(Peifer et al. 2009)	
PF-670462	7,7 nM für CK1ε 14 nM für CK1δ	5 µM	(Badura et al. 2007)	
PF-4800567	32 nM für CK1ε 711 nM für CK1δ	10 µM	(Walton et al. 2009)	
Compound 5	0,029 µM für CK1δKD	10 µM	(Bischof et al. 2012)	
SR-3029	44 nM für CK1δ	k.A	(Bibian et al. 2013)	

SR-2890	4 nM für CK1δ	k.A.	(Bibian et al. 2013)	
SB 202190	0,6 µM für CK1δ	50 µM	(Shanware et al. 2009)	
Roscovitin-Derivat DRF053	14 nM für CK1δ	15 µM	(Oumata et al. 2008)	
D4476	0,3 µM für CK1	100 µM	(Rena et al. 2004)	

1.3 Fragestellung und Zielsetzung der Dissertation

Die Mitglieder der CK1 Familie können durch ihren modulatorischen Einfluss bei der Signalübertragung, wie beispielsweise im Wnt-Signalweg oder bei Prozessen der Mikrotubulidynamik, eine wichtige Rolle im Rahmen der Krankheitsentstehung spielen. Durch eine Deregulation der Isoformen innerhalb der Signalwege kann es zur Ausbildung von Krankheiten kommen. Eine genaue Kenntnis der Funktionen und Regulation der einzelnen CK1-Isoformen ist daher sehr wichtig. Insbesondere gilt es Inhibitoren zu entwickeln, die spezifisch einzelne Isoformen hemmen, um so möglichst gezielt therapieren zu können und die Nebenwirkungen gering zu halten. Außerdem ist es von entscheidender Bedeutung, dass neuere Inhibitoren die Zellmembran leicht passieren können und gute pharmakokinetische Eigenschaften besitzen, damit die Inhibitoren bioverfügbar sind und so in lebenden Zellen und Organismen wirken können.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, neue Verbindungen bzw. ältere weiterentwickelte Inhibitoren auf ihre Fähigkeit zu testen, die Aktivität der drei Isoformen CK1δ, CK1δKD und CK1ε spezifisch zu inhibieren. Die Inhibitoren wurden uns von einem industriellen Kooperationspartner zur Verfügung gestellt

(4SC Discovery GmbH, Planegg-Martinsried). Zuerst sollen die IC_{50}-Konzentrationen der potentiellen Inhibitoren *in vitro* sowie deren Spezifität bestimmt werden. Im zweiten Schritt wurde geplant, MTT-Assays und später FACS-Analysen durchzuführen, um die Fähigkeit der Inhibitoren zu untersuchen, Tumorzellen zu inhibieren bzw. deren Apoptose einzuleiten. Die Ergebnisse der Arbeit sollen dazu führen, hochpotente und spezifische Inhibitoren zu identifizieren sowie zur zukünftigen Entwicklung derartiger Inhibitoren beizutragen. Durch die neu gewonnenen Erkenntnisse und die Identifizierung von wirksamen CK1-Inhibitoren erhoffen wir uns effizientere Therapiekonzepte im Kampf gegen aggressive Tumoren und Erkrankungen, an denen CK1 beteiligt ist.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	GE Healthcare, München
APS	Sigma-Aldrich, München
ATP	Roche, Mannheim
Benzamidin	Sigma-Aldrich, München
β-Mercaptoethanol (MSH)	Sigma-Aldrich, München
Coomassie Brilliant Blue R-250	Waldeck/Chroma, Münster
DMEM	Gibco, Karlsruhe
DMSO	Gibco, Karlsruhe
DTT	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Sigma-Aldrich, München
EGTA	Sigma-Aldrich, München
Essigsäure	Fluka, Seelzen
Ethanol	Fluka, Seelzen
Glutathion-Sepharose	GE Healthcare, München
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
Glycine	AppliChem, Darmstadt
IPTG	Biomol, Hamburg
Isopropanol	Fluka, Seelzen
Leupeptin	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Fluka, Seelzen
MTT	Sigma-Aldrich, München
$NaHCO_3$	Sigma-Aldrich, München
Nonident P40	Fluka, Seelzen
PBS	Gibco, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
Pepton	Carl Roth, Karlsruhe 19
Polyviniylalkohol	Sigma-Aldrich, München

RPMI	Gibco, Karlsruhe
SDS	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Trasylol/Aprotinin	Bayer, Leverkusen
Tris	USB, Staufen
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Trypsin-EDTA	Biochrom, Berlin
[γ- ^{32}P]-ATP	Hartmann Analytic, Braunschweig

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Marienfeld, Lauda- Königshofen
Eppendorf-Tube	Eppendorf, Hamburg
Handschuhe (Nitril und Latex)	Kimberly Clark, Zaventum, Belgien/ Semperit
Gewebekulturschale	Firma Nunc, Wiesbaden
Micro AmP Fast optical 96 Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Carlsbad
Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Objektträgerkästen	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen - epTips	Standard Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme Hyperfilm MP	GE Healthcare, München
Zellkulturschalen	Firma Nunc, Wiesbaden
Zellkulturschaber	Corning Costar, Bodenheim
Zentrifugenröhrchen Falcon	Becton Dickinson, Heidelberg

2.1.3 Enzyme

Casein Kinase 1ε	Invitrogen, Karlsruhe
Casein Kinase 1δ, δKD	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Lysozym	Sigma-Aldrich, München

2.1.4 Pipetten, Zentrifugen und sonstige Geräte

Research®	Eppendorf®, Hamburg 0,1- 2,5 µl, 0,5-10°µl, 2-20 µl, 10-100 µl,20-200 µl, 100-1000 µl
Zentrifuge 5415C	Eppendorf®, Hamburg
Zentrifuge 5417 R (Rotor FA-45 30-11)	Eppendorf®, Hamburg
Zentrifuge 5430,(Rotor FA-45-24-11-HS)	Eppendorf®, Hamburg
Zentrifuge 5810R	Eppendorf®, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0 R (Rotor 2705)	Heraeus GmbH, Hanau
Zentrifuge Sorvall RC-5B	Sorvall, Bad Homburg
Zentrifuge Universal 32R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Rotixa/RP	Hettich, Tuttlingen
Comfort	Liebherr GmbH, Biberach an der Riss
Hera freeze HFU 586 Basic	Heraeus GmbH, Hanau
Öko Super	Liebherr GmbH, Biberach an der Riss
Profiline	Liebherr GmbH, Biberach an der Riss
Thermo Scientific	Thermofischer, Schwerte
Waage R180-D	Sartorius GmbH, Göttingen
Waage 440-35A	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Autoklav 32-2-3	KSG Sterilisatoren GmbH, Olching
BioPhotometer	Eppendorf®, Hamburg
Glasgefäße	VWR® International, Darmstadt
Mörser	VWR® International, Darmstadt
Power-Supply PAC 300	Biorad, München

Spatel	VWR® International, Darmstadt
Slab Gel Dryer 2000	ThermoSavant, USA
TECAN Spectra II	Tecan, Männedorf/Schweiz
Thermomixer comfort	Eppendorf®, Hamburg
Transilluminator	Fluo-Link Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau
Ultrasonic Sonifier 250	Branson, USA

2.1.5 Zelllinien

HT29	Epitheliale Zellen eines kolorektalen Adenokarzinoms (Chen et al. 1987; Didier et al. 1996; Fogh et al. 1977)
SW 480	Humane Zelllinie eines Patienten mit kolorektalem Adenokarzinom (Adachi et al. 1987; Schroy et al. 1995)
SW620	Humane Epithelzellen aus dem Lymphknoten eines Patienten mit kolorektalem Adenokarzinom (Leibovitz et al. 1976; Rodrigues et al. 1990; Trainer et al. 1988)
AC1-M88	Die Zelllinie entsteht durch Fusion extravillöser Trophoblasten mit AC1-1 (Mutante der Chorionkarzinomzelllinie Jeg-3) (Frank et al. 2000)
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7: Humane epitheliale Zellreihe eines Adenokarzinoms von einer Brustkrebs-Patientin (Soule et al. 1973; Sugarman et al. 1985)
SV52	Rattenfibroblastenzelllinie, die nach Injektion von SV40-DNA in REF52 Zellen entsteht (Graessmann et al. 1983)
Rev2	Revertante SV40 transformierte Rattenfibroblastenzelllinie (Bauer et al. 1987)
HL60	Promyeloische Zellreihe aus dem peripheren Blut einer Patientin mit akuter promyeloischer Leukämie (Berninghausen and Leippe 1997; Gallagher et al. 1979)

2.1.6 Medium

Zur Kultivierung der verschiedenen Zelllinien wurden die in der unten stehenden Tabelle aufgeführten Kulturmedien mit den entsprechenden Zusätzen verwendet.

Tab. 3: Beschreibung des verwendeten Kulturmediums für die verschiedenen Zelllinien.

Abkürzungen: DMEM: Dulbeccos's modified Eagle medium; F12: Nutrient Mixture F-12 Zellkulturmedium; RPMI: Roswell Park Memorial Institute, Zellkulturmedium; HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, Puffersubstanz

Kulturmedium	Zelllinie
McCoys 5 A mit Zusatz von fötalem Kälberserum (FCS), Glutamin (Gln) und Penicillin/Streptomycin (PS)	**HT29**
Leibovitz L-15 mit Zusatz von FCS, Gln, PS	**SW480, SW620**
DMEM mit Zusatz von FCS, Gln, PS	**MCF-7, Rev2, SV52**
DMEM + F12 (50:50) mit Zusatz von FCS, Gln, PS	**AC1-M88**
RPMI mit Zusatz von FCS, Gln, PS und 1,25 ml HEPES	**HL60**

2.1.7 CK1-spezifische Inhibitorsubstanzen

Von unserem industriellen Kooperationspartner 4SC Discovery GmbH (Planeg-Martinsried) wurden dem Forschungslabor der Chirurgie 1 mehrere Inhibitoren zur Verfügung gestellt. Die Herausgabe von Informationen unterliegt hierbei den patentrechtlichen Beschränkungen. Die Inhibitoren wurden von uns intern fortlaufend nummeriert, gehören zur Gruppe der *Difluoro-dioxolo-benzoimidazol-benzamid* Derivate und stellen modifizierte Verbindungen der von Bischof und Mitarbeitern beschriebenen *2-Benzamido-N-(1H-benzo[d]imidazol-2 yl)thiazole-4-carboxamide* Derivate dar (Bischof et al. 2012).

2.1.8 Softwareprogramme

Word 2010	Microsoft, Unterschleißheim
Excel 2010	Microsoft, Unterschleißheim
CorelDraw12	Corel, Unterschleißheim
Endnote X1	Adept Scientific GmbH, Frankfurt
Magellan 3	Tecan, Männedorf, Schweiz
CELL QUEST	BD Bioscience, Bedford, USA
PubMed App	Applikation für Android Geräte
Adobe Acrobat	Adobe Systems, München
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems, München
GraphPad Prism	GraphPad Prism Software, Inc., San Diego, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterielle Expression und Aufreinigung des GST-Fusionsproteins

Als erster Schritt erfolgt die Beimpfung eines rekombinanten *E.coli* Bakterienstammes mit 50 ml Antibiotika (Ampicillin) haltigem LB-Medium (Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien) über Nacht bei 37 °C. 24 h später werden frisches Antibiotika-haltiges LB-Medium (400 ml) hinzugegeben und die Bakterien ca. eine Stunde bis zu einer OD von 0,7 - 0,9 (595 nm) inkubiert. Um die Proteinexpression zu starten, werden 500 ml einer 0,5 molaren IPTG-Lösung hinzugegeben (Endkonzentration IPTG 0,1 mM). 2 h später werden die Bakterien 10 Min lang zentrifugiert (4 °C, 4000 rpm). Das entstandene Sediment wird anschließend in 10 ml Lysispuffer resuspendiert und in ein 30 ml Sorvall-Röhrchen auf Eis überführt. Es folgt die Zugabe von 2,5 mg Lysozym (in 1 ml Lysispuffer gelöst) und eine weitere Inkubation von 30 Min auf Eis. Nachdem weitere 10 ml Lysispuffer hinzugegeben wurden, wird die bakterielle DNA kurz durch Ultraschall fragmentiert (Stufe 3 des Ultrasonic Sonifier 250). Nach anschließender Zentrifugation über 30 Min (10000 rpm, 4 °C) wird der Überstand mit 300 µl aufgeschwemmter Glutathion-Sepharose versetzt und für 2 h bei 4 °C rotiert. Nach den 2 h wird die Glutathion-Sepharose mit den gebundenen Fusionsproteinen kurz

(2 Min) zentrifugiert (2000 – 3000 rpm, 4 °C). Bei den folgenden drei Waschschritten wird jeweils der Überstand verworfen, das Sediment mit 1 ml Waschpuffer 1 gewaschen, in ein Eppendorf Röhrchen überführt und bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert (14000 rpm, 4 °C, 30 Sek). Der gleiche Vorgang wiederholt sich anschließend zweimal mit dem Waschpuffer 2. Die immer noch an den Sepharosebeads immobilisierten GST-Fusionsproteine werden durch Zugabe von 600 µl Elutionslösung gelöst und für 20 Min bei 4 °C rotiert. Nach der Elution werden die Proteine mithilfe von Dialyseschläuchen dialysiert, in 10 % Glycerol in flüssigem N_2 eingefroren und bei -80°C gelagert. Zur Kontrolle der Aliquote wird eine Elektrophorese mit jeweils 5, 10, 15 und 20 µl Proteinlösung gestartet. Bei erfolgreicher Aufreinigung ist auf dem SDS-Gel eine ansteigende Menge des aufgereinigten Fusionsproteins sichtbar.

Lysispuffer:
2 ml von 1 M Tris pH 7,6
3 ml von 5 M NaCl
0,5 ml Nonident P40
10 ml Glycerin
500 µl von 0,5 M EDTA
1 ml von 0,1 M EGTA
50 µl von 100 mM Benzamidin
100 µl Aprotinin
500 µl von 0,5 M DTT
25 µl Leupeptin
dH_2O ad 100 ml

Waschpuffer 1:
20 ml Lysispuffer, auf 300 mM NaCl hochstellen mit 5 M

Waschpuffer 2:
2 ml von 1 M Tris pH 7,6
1 ml von 5 M NaCl
100 µl Aprotinin
200 µl von 0,5 M EDTA
dH_2O ad 100 ml

Elutionslösung:
500 µl von 1 M Tris pH 7,0

10 mg reduziertes Glutathion
10 µl Aprotinin
20 µl von 0,5 M EDTA
dH_2O ad 10 ml

Dialyselösung: 50 ml von 1 M Tris pH 7,0
2 ml von 0,5 M EDTA
dH_2O ad 1 l

2.2.2 *In vitro*-Kinaseassays zur Bestimmung des CK1-vermittelten Phosphateinbaus

Im Folgenden wird die Phosphorylierung durch CK1 anhand von *in vitro* Assays mit den entsprechenden Reaktionsansätzen untersucht.

Tab. 4: Zusammensetzung der Reaktionsansätze mit der jeweiligen Inhibitorverdünnung für einen Ansatz à 20 µl.
Abkürzungen: GST=Glutathion-S-Transferase; µl=mikroliter; ATP=Adenosintriphosphat; µCi= mikroCurie; dH_2O=destilliertes Wasser; nM: nanomolar; µM: mikromolar

Reagenz	Volumen / Konzentration
Substrat GST-p53 (FP267)	3 µl / 500 nM
10x-Kinasepuffer ATP	2 µl / 10 µM
[γ- ^{32}P]-ATP	0,2 µl / 2 µCi
Kinase (CK1δ, CK1δKD oder CK1ε)	3 µl der Kinase(-Verdünnung)
Inhibitorverdünnung	2 µl / 5 nM – 10 µM
dH_2O	ad 20 µl

Tab. 5:Inhibitorverdünnungsreihe.
Die nachfolgend dargestellte Inhibitorverdünnungsreihe erlaubt anhand der ermittelten Messwerte eine Berechnung der jeweiligen IC_{50}- Konzentration.
Abkürzungen: µl= Mikroliter; mM=millimolar; nM=nanomolar; DMSO=Dimethylsulfoxid

2 µl in Reaktion (1:10) Endkonzentration	Stock- Verdünnung (10x)	Verdünnungsansatz	Nr.
10 µM	100 µM	2 µl 10 mM + 198 µl DMSO	1
5 µM	50 µM	50 µl Nr.1 + 50 µl DMSO	2
2,5 µM	25 µM	50 µl Nr.2 + 50 µl DMSO	3
1,25 µM	12,5 µM	50 µl Nr.3 + 50 µl DMSO	4
625 nM	6,25 µM	50 µl Nr.4 + 50 µl DMSO	5
313 nM	3,13 µM	50 µl Nr.5 + 50 µl DMSO	6
156 nM	1,56 µM	50 µl Nr.6 + 50 µl DMSO	7

78 nM	0,78 µM	50 µl Nr.7 + 50 µl DMSO	8
39 nM	0,39 µM	50 µl Nr.8 + 50 µl DMSO	9
20 nM	0,20 µM	50 µl Nr.9 + 50 µl DMSO	10
10 nM	0,10 µM	50 µl Nr.10 + 50 µl DMSO	11
5 nM	0,05 µM	50 µl Nr.11 + 50 µl DMSO	12

Die in Tab. 4 genannten Substanzen werden auf Eis zusammengeführt. Um einen frühen Reaktionsstart zu verhindern, müssen die einzelnen Komponenten getrennt zusammengeführt werden. Zunächst wurden die Kinasen CK1δKD (1:30) und CK1ε (1:45) verdünnt, CK1δ wird unverdünnt eingesetzt. Die jeweilige Kinase wird auf den Boden des entsprechenden Tubes pipettiert, während die entsprechende Inhibitorverdünnung der Tab. 5 bzw. die DMSO-Kontrolle an den hinteren Rand vorgelegt wird. Hierzu wurde CK1δKD 1:30 und CK1ε 1:45 verdünnt. Der Mastermix aus den weiteren Komponenten (Substrat 267, 10xKP ATP und dH_2O) wird an die entgegengesetzte Wand des Röhrchens gesetzt. Die Zugabe des radioaktiv markierten [γ-^{32}P]-ATP erfolgt zuletzt. Durch kurze Zentrifugation wird die Reaktion gestartet und die Proben inkubiert (30°C). Nach 30 Min Inkubationszeit kommt es durch Zugabe von 5xSDS Puffer zum Abbruch weiterer Reaktionen. Anschließend folgt die Auftrennung der Proteine in der SDS-Gelelektrophorese (s.u.), die Färbung mit Coomassie Brilliant Blue (s.u.), das Entfärben, das Trocknen der Gele und das Auflegen eines Röntgenfilmes zur Autoradiographie (s.u.). Die einzelnen Proteinbanden werden aus den Gelen herausgeschnitten und mithilfe des Cherenkov-Zählers wird der Phosphateinbau in das Substrat quantitativ ausgewertet.

Als relatives Maß der Phosphorylierung, d.h. der Kinaseaktivität, dienen die vom Cherenkov-Zähler gemessenen Zerfälle pro Minute. Hierbei weist eine hohe Anzahl von Zerfällen pro Minute auf eine hohe Aktivität der Kinase und somit auf eine geringere Hemmung durch den Inhibitor hin. Anhand der oben dargestellten Inhibitorverdünnungsreihe (Tab. 5) lässt sich somit die IC_{50}-Konzentration der jeweiligen Substanz bestimmen.

Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen:

SDS-Probenpuffer (5x):	250 mM Tris-HCl (pH 6,8) 25 % β-Mercaptoethanol 50 % (v/v) Glycerol 10 % (w/v) SDS 0,5 % (w/v) Bromphenolblau
Kinasepuffer:	250 mM Tris HCl (pH 7,5) 100 mM $MgCl_2$ 1 mM EDTA

2.2.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen

Die SDS Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung und Analyse von Proteinen. SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz und hebt die Eigenladung der Proteine auf, sodass diese nach außen hin keine Ladungsunterschiede mehr besitzen und aufgrund ihrer Größe im Gel getrennt werden.

Aus den u.g. Substanzen wird ein Gel angefertigt, bestehend aus einem oberen Sammelgel (upper gel) und einem unteren Trenngel (lower gel). Vor dem Auftragen der Proben werden diese für 5 Min bei 99 °C inkubiert und anschließend in die einzelnen Taschen des Gels gegeben. Zur Bestimmung des Proteingewichts wird auch ein Markerprotein (Precision Plus Protein Dual Color - BioRad, München) in eine Geltasche pipettiert. Die Elektrophoresekammern (Firma BioRad) werden mit dem Laufpuffer aufgefüllt und mit einer Spannung von zunächst 80 V gestartet. 10 - 15 Min später erfolgt die weitere Auftrennung bei einer Spannung von 180 V für ca. 45 - 60 Min.

Laufpuffer:	250 mM Tris-HCL 1,9 mM Glycin 1 % (w/v) SDS

Die Mengenangaben sind für vier Gele konzipiert:

Sammelgel/upper gel:	1,25 ml	1,25 M Tris pH 6,6
	3,0 ml	H_2O
	30 µl	10 % APS
	100 µl	10 % SDS
	10 µl	TEMED
Trenngel/lower gel:	4,0 ml	1,25 M Tris pH 8,8
	6,7 ml	30 % Acrylamidstock
	5,0 ml	H_2O
	150 µl	10 % APS
	300 µl	10 % SDS
	10 µl	TEMED

2.2.4 Färben mit Coomassie Brilliant Blue

Sobald die Elektrophorese beendet ist, werden die Gele für ca. 15 - 20 Min mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Dieser Farbstoff lagert sich an die basischen Seitenketten der AS und färbt so Proteine spezifisch an.
Danach werden die Gele für weitere 30 - 45 Min in der Entfärbelösung geschwenkt und mit dH_2O vorsichtig abgespült. Anschließend kommen die Gele auf das Vakuumiergerät zum Trocken (Slab Gel Dryer 2000). Dieser Vorgang ist bei 80 °C nach ungefähr 45 Min beendet.

Färbelösung:	1,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250 in 1 l Methanol/dH_2O/Eisessig (5:5:1). Diese Zusammensetzung zwei Tage lösen lassen, anschließend filtrieren
Entfärbelösung:	10 % (v/v) Isopropanol; 10 % (v/v) Essigsäure in dH_2O

2.2.5 Nachweis des Phosphateinbaus durch Autoradiographie

Nach dem Trocknen werden Röntgenfilme (GE Healthcare, München) auf die Gele gelegt und über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT) exponiert. Zur Verstärkung der Signalintensität kann eine Entwicklung mit einer Verstärkungsfolie bei -80 °C erfolgen. Mithilfe der KODAK Entwicklungsmaschine werden die Filme 24 h später unter Rotlicht entwickelt.

2.2.6 Einfrieren und Auftauen der Zelllinien

Um die Zellen einfrieren zu können, werden diese zunächst mit 1 ml 2,5 % Trypsin von der Kulturplatte gelöst und die Reaktion durch Zugabe des Kulturmediums gestoppt. Im Anschluss daran werden die Zellen bei 900 rpm für 5 Min bei RT zentrifugiert. Die Pellets werden in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen gegeben. Nun werden die Röhrchen zuerst in die obere Phase des Stickstofftanks für 1 h gegeben und anschließend für 17 h in der unteren Phase platziert. Die letztendliche Lagerung erfolgt in flüssigem Stickstoff.
Um die eingefrorenen Zellen zu einem späteren Zeitpunkt aufzutauen, werden die Zellen auf Eis gelegt, mit 10 ml Medium versetzt und bei 900 rpm für 3 Min bei RT kurz herunter zentrifugiert. Die Sedimente werden in dem entsprechenden Kulturmedium resuspendiert und auf die Gewebekulturschalen gegeben. Einen Tag später erfolgt ein Mediumwechsel.

Einfriermedium: 50 % (v/v) FCS; 3,9 g/l $NaHCO_3$; 12 % (v/v) DMSO in doppelt konzentriertem DMEM

2.2.7 Mediumwechsel und Passagieren der Zelllinien

Die Zellen werden in 10 ml des entsprechenden Kulturmediums inkubiert (37 °C, 85 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO_2). Jeden zweiten Tag wird das Medium auf den Platten gewechselt. Für das sog. Passagieren oder Splitten der Zellreihen müssen die Zellen von der Kulturschale gelöst werden. Hierzu werden sie mit 5 ml PBS gespült und mit 1 ml 2,5 % Trypsin versetzt. Für ca. 3 - 5 Min kommen die Kulturschalen in den Brutschrank. Anschließend werden die Kulturplatten

abhängig von ihrem jeweiligen Wachstumsstand verdünnt, auf neue, frische Gewebeschalen verteilt und zurück in den Brutschrank gestellt.

2.2.8 MTT-Zytotoxizitäts-Assay

Mithilfe des MTT-Zytotoxizitäts-Assays kann man quantitativ den Anteil lebender Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe messen. Der gelbe Farbstoff MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wird in den Mitochondrien in einer NADH-abhängigen Reaktion in blau-violettes Formazan umgewandelt. Diese Umwandlung geschieht nur in biologisch aktiven Zellen. Die Stopplösung führt zur Lyse der Zellen und somit zur Freisetzung des Formazans. Die optische Dichte des freigesetzten Formazans wird photometrisch gemessen. Die Menge an freiem Formazan ist hierbei proportional zur Anzahl vitaler Zellen, sodass die Aktivität und Effektivität eines Inhibitors auf die Zellreihe gemessen werden kann. Die Messung und Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit dem Luminometer TECAN Spectra II und der Software Magellan 3 am Computer.
Für die MTT-Assays ist es entscheidend, dass sich pro ml Zellsuspension ca. 50.000 Zellen befinden. Hierzu werden die Zellen in einer Zählkammer ausgezählt und entsprechend verdünnt, sodass auf der 96er Multiwell-Platte pro Well (Loch) mit jeweils 200 µl Zellsuspension ungefähr 10.000 Zellen (→ insgesamt 50.000/ml) verteilt sind. Diese Platten werden für ca. 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h erhalten die Zellen frisches Medium mit der entsprechenden Inhibitorverdünnung. Eine Kontrollplatte mit DMSO wird ebenfalls kultiviert (DMSO 1:1000 in Medium verdünnt). Sind die Platten mit dem Medium und dem zu testenden Inhibitor behandelt, werden sie für 2 Tage (d) unter den üblichen Bedingungen (37 °C; 5 % CO_2 und 85 % relative Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Nach 2 d Inkubationszeit wird das alte Medium abgesaugt und jeweils 10 µl MTT-Farbstoff auf die Zellen pipettiert. Anschließend kommen die Zellen für 4 h in den Brutschrank. Im nächsten Schritt wird der Farbstoff abgesaugt und 100 µl Stopplösung *„Acidic isopropanol“* pro Well hinzugegeben. Nun werden die Platten für 30 Min geschüttelt und photometrisch gemessen. Wichtig ist es, die Platten abgedeckt bzw. verdunkelt zu schütteln, da die Zellen nach Zugabe der Stopplösung lichtempfindlich geworden sind.

Stopplösung: „Acidic isopropanol“ 180 ml Isopropanol und 20 ml 1 N HCL

2.2.9 Bestimmung der Zellzyklusverteilung der Zellen durch FACS-Durchflusszytometrie

Für die Zellzyklusanalyse wird das Prinzip der Durchflusszytometrie am FACS (fluorescence activated cell sorting) -Analysegerät angewendet. Mithilfe der FACS-Analyse kann man den DNA–Gehalt verschiedener Zellpopulationen innerhalb einer Zelllinie messen, indem der DNA interkalierende Farbstoff Propidium Iodid verwendet wird. Auf diese Art und Weise lassen sich Rückschlüsse ziehen auf die Phase des Zellzyklus (G1, S und G2/M), in welcher sich die Zelle befindet. Auch tote Zellen oder Zellfragmente können nachgewiesen werden. Die Zellen müssen hierzu entsprechend behandelt werden:
Zunächst werden die Zellen mit Trypsin von der Kulturplatte abgelöst. Anschließend werden die Zellen kurz sedimentiert (400 rpm, 5 Min, 4 °C), die Pellets im PBS-Puffer gewaschen und in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert. Es folgt im nächsten Schritt eine Zentrifugation mit 400 – 900 rpm bei RT für 5 Min. Das entstandene Zellpellet wird daraufhin in 200 µl Kit-Lösung A/Solution A resuspendiert. Solution A enthält Trypsin, welches die Zellen voneinander trennt. Die Ansätze werden nun für 10 Min bei RT inkubiert. Im nächsten Schritt wird 180 µl Solution B zum Ansatz hinzugegeben und erneut bei RT stehen gelassen. Nach 10 Min gibt man die letzten 180 µl Solution C (enthält Propidium Iodid) gekühlt hinzu. Die Zellen werden wiederholt für 10 Min, maximal jedoch 1 h, auf Eis im Dunkeln gelagert. Im Anschluss daran werden die nun angefärbten Zellen durch ein kleines Metallnetz (Nylonsieb) in einzelne Glasröhrchen gegeben, welche dann vom FACS-Gerät zur Bestimmung des DNA-Gehaltes analysiert werden. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgt mit Hilfe der Software CELL QUEST (Becton Dickinson Bioscience, USA) am Computer.

2.2.10 Statistische Methoden zur Auswertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse des einleitenden Screenings und der MTT-Zytotoxizitätsmessungen wurden als Balkendiagramme dargestellt. Ein einzelner Balken stellt hierbei den Mittelwert der drei Messergebnisse dar. Der Standardfehler ist durch den dargestellten Fehlerindikator wiedergegeben.

Die IC_{50}-Werte der getesteten Verbindungen sowie die EC_{50}-Werte der untersuchten Zelllinien sind als Dosis-Wirkungs-Kurven dargestellt. Der einzelne Datenpunkt auf der Kurve stellt den Mittelwert der drei Messwerte dar. Der Fehlerindikator gibt den Standardfehler an. In einer zusammenfassenden Tabelle werden die Ergebnisse durch den berechneten Standardfehler zusätzlich korrigiert.

3. Ergebnisse

Da die Mitglieder der CK1 Familie eine wichtige Rolle bei Zellregulationsprozessen spielen und es durch Überexpression von CK1 Isoformen zur Entstehung von malignen Erkrankungen kommen kann, steigt das Interesse an der Entwicklung von „small molecule inhibitors“ (SMIs), die möglichst spezifisch die einzelnen CK1 Isoformen hemmen können.

Dem Forschungslabor der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie 1 wurden von einem industriellen Kooperationspartner (4SC Discovery GmbH, Planegg-Martinsried) ein *2-Benzamido-N-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thiazole-4-Carboxamid* Derivat (Compound **8**) und mehrere *Difluoro-dioxolo-benzoimidazol-benzamid* Derivate (Compound **25** – **44**) bereit gestellt, die auf ihre Fähigkeit, CK1 Isoformen zu inhibieren, getestet werden sollten. Die in Abb. 2, 4 und 5 dargestellten Ergebnisse entstanden in Zusammenarbeit mit Julia Richter und Irmgard Pospiech.

3.1 Einleitendes Screening der potentiellen Inhibitoren

Zunächst wurden die dem Labor zur Verfügung gestellten Substanzen bei einer Inhibitorkonzentration von 10 µM in *in vitro* Kinaseassays auf ihre Fähigkeit getestet, CK1δ(FP449) (Abb.2 I), CK1δKD (Abb.2 II) und CK1ε (Abb. 2 III) zu inhibieren. Als Vergleichssubstanz diente der Inhibitor **8**, ein *2-Benzamido-N-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thiazole-4-Carboxamid Derivat* aus einer früheren Testreihe. Als Substrat diente das GST-p53$^{1\text{-}64}$ Fusionsprotein (FP267); als Kontrollreaktion wurde das Lösungsmittel DMSO eingesetzt.

Die in Abb. 2 I dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die einzelnen potentiellen Inhibitoren in ihrer hemmenden Wirkung auf die Isoform CK1δ unterschiedlich effektiv sind. Es gibt einige sehr wirkungsvolle Inhibitoren, welche die Kinaseaktivität um mehr als 90 % reduzieren können. Hierzu zählen die Inhibitoren **8**, **25**, **26**, **28**, **31**, **32**, **34**, **35**, **40** und **42**, wobei Compound **28** CK1δ am stärksten hemmt. Der Inhibitor **30** zeigt hingegen die geringste inhibitorische Wirkung auf CK1δ. Die Restaktivität der Kinase beträgt unter Einfluss dieses Inhibitors immerhin noch 60 %. Der Inhibitor **33** zeigt ebenfalls nur eine geringe Effektivität: die Aktivität wird lediglich zu 50 % gehemmt (Abb.2 I).

Die getesteten Compounds inhibieren auch die Kinasedomäne von CK1δ (CK1δKD) in ähnlicher Art und Weise wie CK1δ. Die in Abb. 2 II gezeigten Ergebnisse verdeutlichen, dass die Kinasedomäne von CK1δ durch alle getesteten Verbindungen mindestens um die Hälfte ihrer Aktivität reduziert wird. Auch in diesem Fall erreichen die Inhibitoren **8**, **25**, **26**, **28**, **31**, **32**, **34** sowie **40** und **42** - wie schon bei CK1δ beobachtet - eine Hemmung der Kinaseaktivität von mehr als 90 %. Der wirkungsschwächste Inhibitor ist der Inhibitor **36** mit einer Restaktivität von ca. 40 %, während der Inhibitor **30**, der bei CK1δ die schwächste Hemmwirkung besitzt, die Kinasedomäne von CK1δ immerhin noch zu 70 % inhibiert.

Die Fähigkeit der getesteten Compounds CK1ε zu inhibieren, unterscheidet sich sehr stark im Vergleich zu CK1δ und CK1δKD. Von den insgesamt 20 neuen Verbindungen hemmen nur die Hälfte die CK1ε Kinaseaktivität um 50 % oder mehr (Compound **25**, **26**, **27**, **28**, **31**, **32**, **34**, **37**, **40**, **42** sowie der Vergleichsinhibitor **8**).

Die wirkungsvollsten getesteten Compounds führen zu einer Inhibition der CK1ε Aktivität um mehr als 90 %. Hierzu zählen die Inhibitoren **8**, **26**, **28**, **32** und **34** (siehe Abb. 2 III). Die Hemmung der CK1ε Aktivität durch die anderen 10 Verbindungen ist hingegen wesentlich schwächer (Compound **29**, **30**, **33**, **35**, **36**, **38**, **39**, **41**, **43** und **44**). Der wirkungsschwächste Inhibitor ist auch hier – wie bei CK1δKD - der Inhibitor **36**.

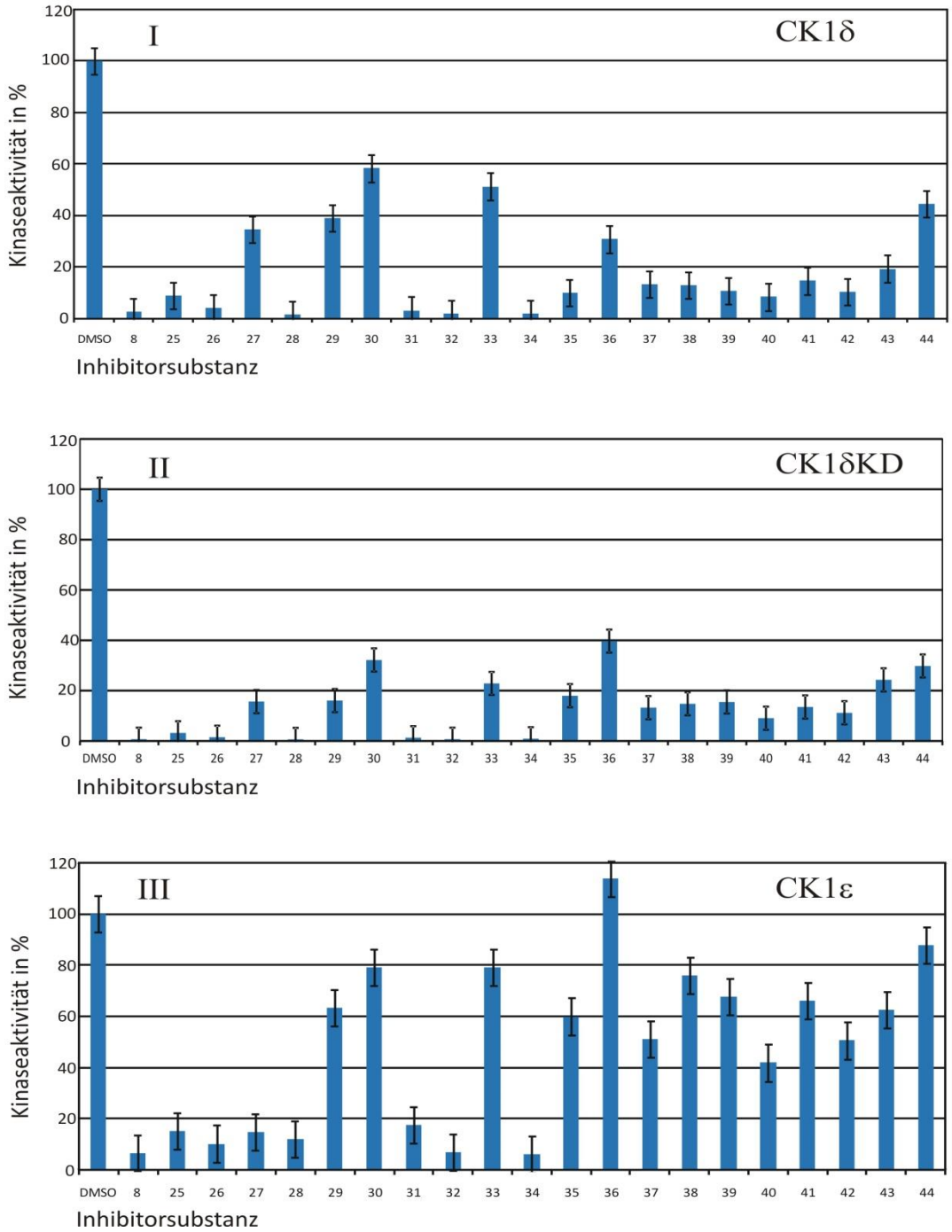


Abb. 2: Einfluss der Compounds 25 – 44 auf die Enzymaktivitäten von GST-CK1δ, CK1δKD und CK1ε.

Als CK1-spezifischer Inhibitor (Positivkontrolle) wurde der Inhibitor 8 verwendet und als Kontrolle das Lösungsmittel DMSO. Die *in vitro* Kinaseassays wurden mit einer Konzentration von 10 µM ATP und der jeweiligen Inhibitorsubstanz, ebenfalls in einer Konzentration von 10 µM, durchgeführt. Untersucht wurde die Hemmwirkung der Inhibitoren auf CK1δ (I), CK1δKD (II) und CK1ε (III). Als Substrat diente bei allen Versuchen das aufgereinigte Fusionsprotein GST-p53$^{1-64}$ (s.o.). Anschließend wurden die phosphorylierten Substrate in der SDS-PAGE aufgetrennt und der Phosphateinbau quantifiziert, siehe 2.2.3. Als Referenzwert diente der Phosphateinbau in GST-p53$^{1-64}$ ohne Zusatz von Inhibitoren jedoch unter Einsatz von DMSO (100 % Kinaseaktivität). Die in der Abb. 2 aufgeführten Ergebnisse stellen jeweils den Mittelwert von drei Messvorgängen dar. Der Standardfehler wird durch die Fehlerbalken angegeben. Auf der senkrechten Achse ist die ermittelte Restaktivität der Kinase in % ablesbar, die horizontale Achse zeigt die einzelnen Inhibitorsubstanzen. Abkürzungen: DMSO: Dimethylsulfoxid; CK1δ, CK1δKD &CK1ε: Casein Kinase 1 delta, Casein Kinase 1 delta Kinasedomäne & Casein Kinase 1 epsilon

3.2 Bestimmung der IC_{50}-Konzentrationen ausgewählter Verbindungen und deren Validierung in Bezug auf Isoformenspezifität für CK1δ(FP449), CK1δKD und CK1ε

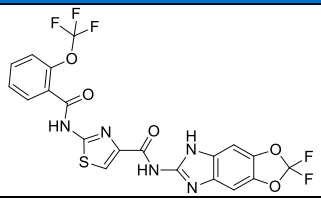
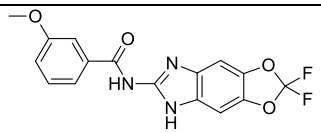
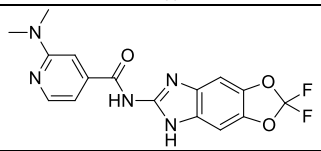
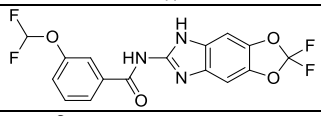
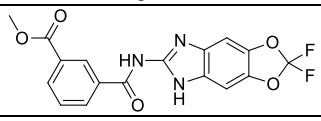
Das in 3.1 dargestellte Screening der potentiellen Inhibitoren diente dazu, einen ersten Überblick über die Wirksamkeit der Substanzen bei einer Inhibitorkonzentration von 10 µM zu erhalten.
Im zweiten Schritt erfolgte die Bestimmung der IC_{50}-Konzentrationen ausgewählter Verbindungen (siehe Tab. 7) für CK1δ, CK1δKD und CK1ε. Hierfür wurden Kinaseassays in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des jeweiligen Compounds durchgeführt, die phosphorylierten Proteine anschließend in der SDS-PAGE aufgetrennt und der Einbau des Phosphats in das Substrat mittels Autoradiogramm sichtbar gemacht. Die Quantifizierung des Phosphateinbaus erfolgte durch Cherenkov-Zählung. Die durch Computersoftware (Prism) ermittelten IC_{50}-Werte sind in Abb. 3 und 4 als Dosis-Wirkungs-Kurven dargestellt.

Von den insgesamt neun untersuchten Verbindungen besitzen fünf Inhibitoren für CK1δ(FP449) einen niedrig-nanomolaren IC_{50}-Wert von unter 100 nM (**8**, **25**, **29**, **31** und **34**). Die drei Compounds **8** (IC_{50}: 21,09 nM), **25** (IC_{50}: 33,20 nM) und **29** (IC_{50}: 23,39 nM) heben sich hierbei durch besonders niedrige Werte hervor.
Sechs der getesteten Substanzen inhibieren CK1δKD im nanomolaren Bereich unter 100 nM. Hierzu zählen die Verbindungen **8**, **25**, **29**, **31**, **34** sowie Compound **38.** Auch in diesem Fall besitzen die Inhibitoren **8** (IC_{50}: 19,53 nM), **25** (IC_{50}: 27,67 nM) und **29** (IC_{50}: 20,80 nM) die niedrigsten IC_{50}-Konzentrationen.
Die IC_{50}-Werte der Compounds für CK1ε weisen – wie aus Abb. 2 III ersichtlich - wesentlich höhere Werte auf. In diesem Fall besitzen nur die Inhibitoren **25** und **29** IC_{50}-Werte im niedrigen nanomolaren Bereich (IC_{50} für **25**: 56,05 nM; IC_{50} für **29**: 46,30 nM). Die höchste ermittelte IC_{50}-Konzentration für CK1ε liegt bei knapp 600 nM (IC_{50} für **44**: 599,8 nM). Die ermittelten IC_{50}-Werte aller Verbindungen in Bezug auf CK1δ, CKδKD und CK1ε sind in Abb. 3 und 4 dargestellt. Die Tabelle 7 stellt die ermittelten IC_{50}-Werte der getesteten Inhibitoren für die drei Isoformen zum direkten und anschaulichen Vergleich dar.
Um im Folgenden die Verbindungen bezüglich ihrer Spezifität für eine bestimmte CK1 Isoform bewerten zu können, wurden die IC_{50}-Werte der einzelnen

Compounds für die getesteten Kinasen direkt miteinander verglichen (Tab. 7), sodass einige Verbindungen als isoformenspezifisch verifiziert werden konnten.
Der Inhibitor **8**, die bereits bekannte Vergleichssubstanz, besitzt eine ca. 10-fach höhere Spezifität für CK1δ gegenüber CK1ε (IC_{50} für CK1δ von 21,09 nM vs. IC_{50} für CK1ε von 208,3 nM). Bei Compound **34** ist die CK1δ-Spezifität ähnlich stark ausgeprägt. Hier liegt der IC_{50}-Wert für CK1ε bei 511,7 nM, während CK1δKD schon bei 52,34 nM zu 50 % inhibiert wird und CK1δ(FP449) eine IC_{50}-Konzentration von 79,83 nM besitzt. Auch durch die beiden Inhibitoren **31** und **38** werden CK1δ bzw. CK1δKD wesentlich effektiver inhibiert als CK1ε (Inhib. **31**: IC_{50} für CK1δ entspricht 76,50 nM vs. IC_{50} für CK1ε von 584,7 nM; Inhib. **38**: IC_{50} für CK1δKD entspricht 67,75 nM vs. IC_{50} für CK1ε von 524 nM).
Die Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Strukturformeln der ausgewählten Verbindungen.

Tab. 6: Übersicht der ausgewählten Verbindungen.

Dargestellt sind die Strukturformeln der getesteten Compounds.

Compound	Strukturformel
8	
25	Patentrechtlich geschützt
29	Patentrechtlich geschützt
31	Patentrechtlich geschützt
34	Patentrechtlich geschützt
38	
40	
42	
44	

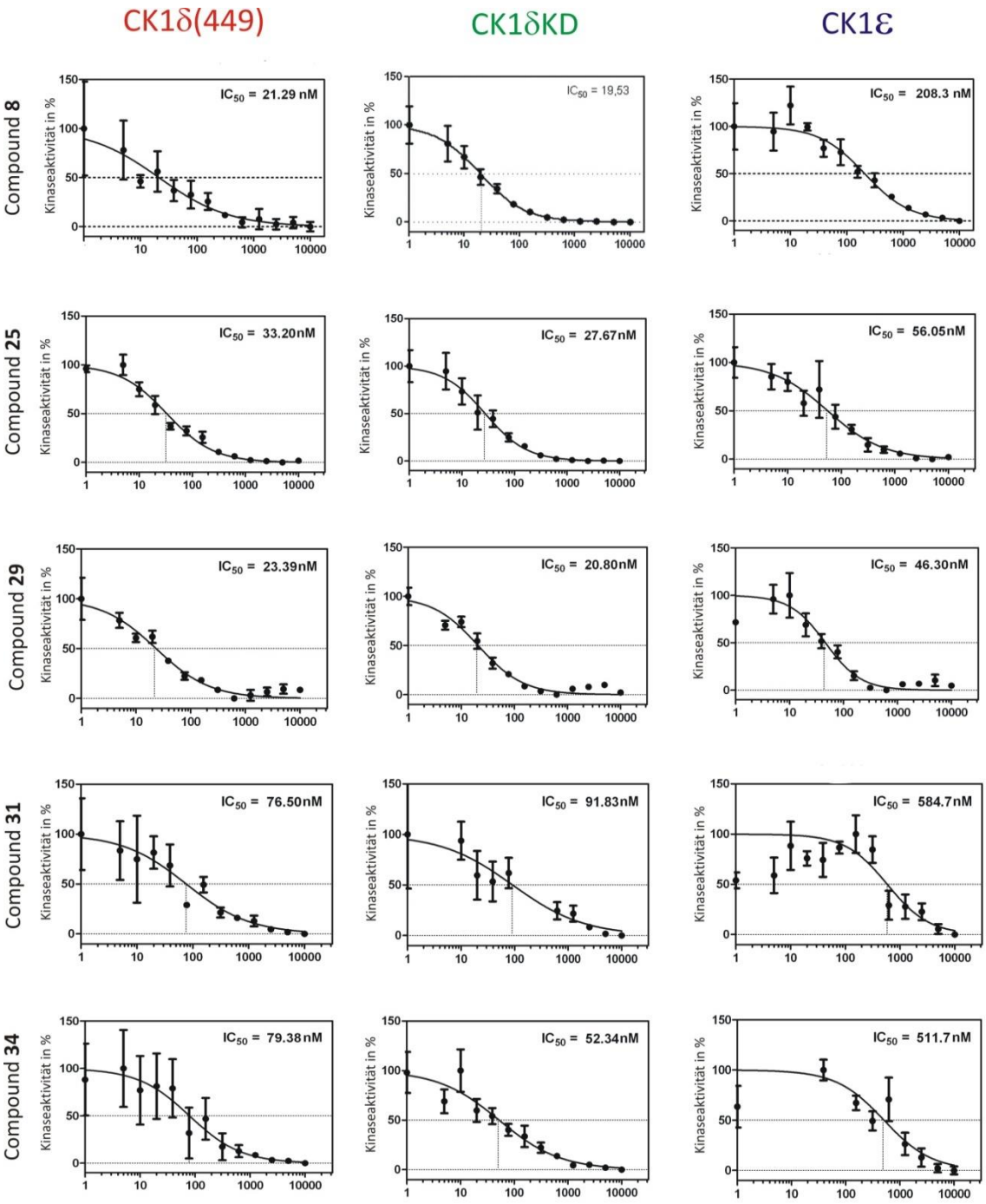


Abb. 3: IC_{50}-Konzentrationen der getesteten Verbindungen 8, 25, 29, 31 und 34 für CK1δ, CK1δKD und CK1ε.

Zur Bestimmung der IC_{50}-Konzentrationen der dargestellten Compounds wurden Kinaseassays durchgeführt, bei denen verschiedene Konzentrationen (zwischen 5 nM und 10 µM) der jeweiligen Verbindung eingesetzt wurden. Als Substrat diente das GST-$p53^{1-64}$ Fusionsprotein (FP267) und als Kinase CK1δ, CK1δKD oder CK1ε. Im Anschluss an die Kinaseassays erfolgte die Auftrennung der phosphorylierten Substrate durch SDS-PAGE und die Exposition der getrockneten und Coomassie gefärbten Gele gegenüber einem Röntgenfilm. Die einzelnen Substratbanden wurden isoliert und die Phosphorylierung im Cherenkov-Zähler quantitativ ermittelt. Aus den Ergebnissen konnte durch Computersoftware (Prism) die IC_{50}-Konzentration bestimmt werden. Die Datenpunkte auf der Dosis-Wirkungs-Kurve setzen sich aus drei Messwerten zusammen, der Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Die x-Achse zeigt die jeweilige Inhibitorkonzentration in nM. Abkürzungen: nM: nanomolar; IC_{50}: 50 % inhibitorische Konzentration; CK1δ, CK1δKD & CK1ε: Casein Kinase 1 delta, Casein Kinase 1 delta Kinasedomäne & Casein Kinase 1 epsilon

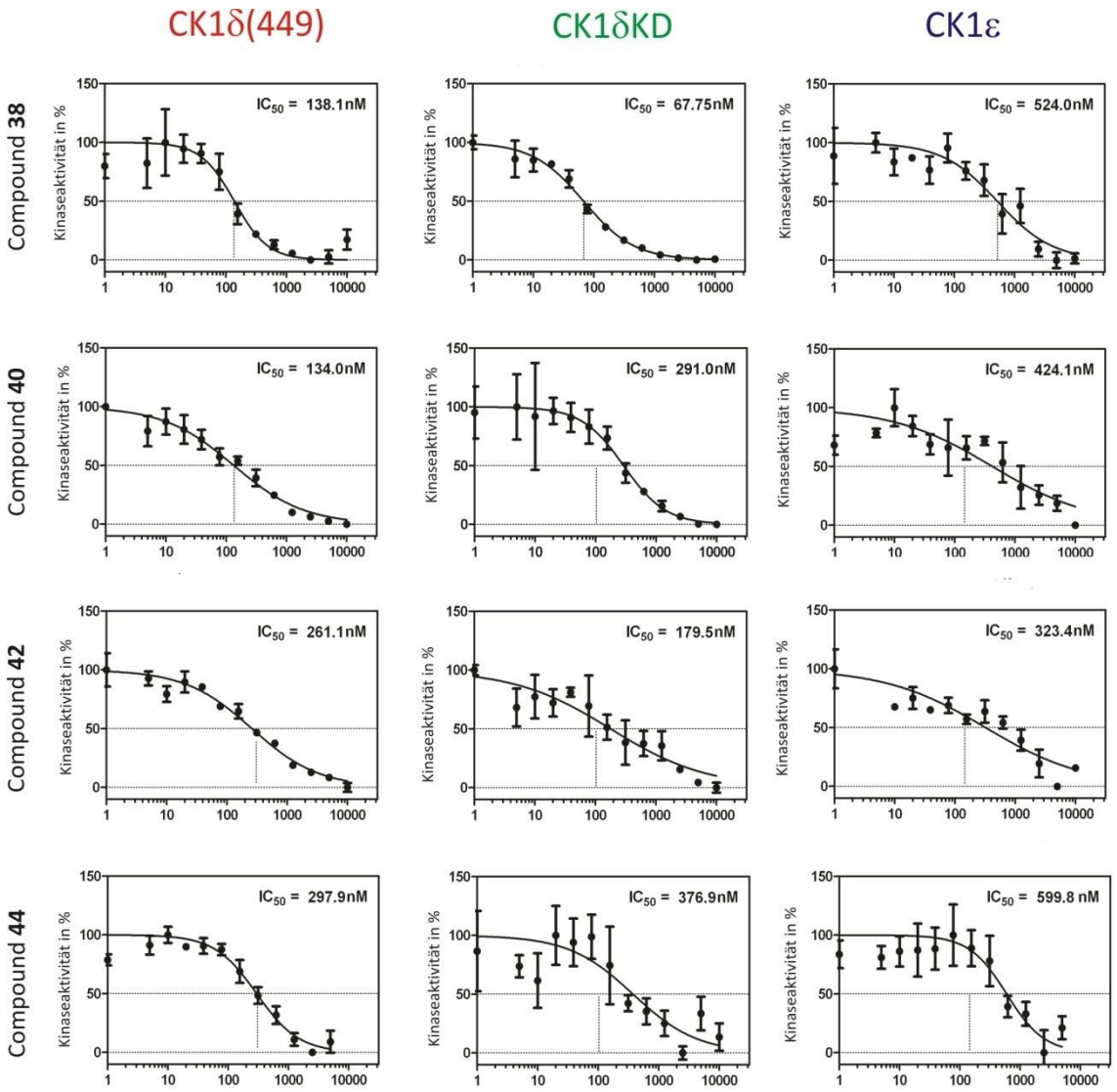


Abb. 4: IC_{50}-Konzentrationen der getesteten Verbindungen 38, 40, 42 und 44 für CK1δ, CK1δKD und CK1ε.

Zur Bestimmung der IC_{50}-Konzentrationen der dargestellten Compounds wurden Kinaseassays durchgeführt, bei denen verschiedene Konzentrationen (zwischen 5 nM und 10 µM) der jeweiligen Verbindung eingesetzt wurden. Als Substrat diente das GST-$p53^{1-64}$ Fusionsprotein (FP267) und als Kinase CK1δ, CK1δKD oder CK1ε. Im Anschluss an die Kinaseassays erfolgte die Auftrennung der phosphorylierten Substrate durch SDS-Page und die Exposition der getrockneten und Coomassie gefärbten Gele gegenüber einem Röntgenfilm. Die einzelnen Substratbanden wurden isoliert und die Phosphorylierung im Cherenkov-Zähler quantitativ ermittelt. Aus den Ergebnissen konnte durch Computersoftware (Prism) die IC_{50}-Konzentration bestimmt werden. Die Datenpunkte auf der Dosis-Wirkungs-Kurve setzen sich aus drei Messwerten zusammen, der Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Die x-Achse zeigt die jeweilige Inhibitorkonzentration in nM. Abkürzungen: nM: nanomolar; IC_{50}: 50 % inhibitorische Konzentration; CK1δ, CK1δKD & CK1ε: Casein Kinase 1 delta, Casein Kinase 1 delta Kinasedomäne & Casein Kinase 1 epsilon

Tab. 7: Vergleich der IC_{50}-Konzentrationen der getesteten Verbindungen für die CK1 Isoformen CK1δ, CK1δKD und CK1ε.
Dargestellt sind die ermittelten IC_{50}-Werte der ausgewählten Verbindugen 8, 25, 29, 31, 34, 38, 40, 42 und 44 für die CK1 Isoformen CK1δ, δKD und ε. Der angegebene Wert ist ein Mittelwert aus drei Messergebnissen und wird durch den Standardfehler korrigiert. Abkürzungen: IC_{50}: 50 % inhibitorische Konzentration; nM: nanomolar; CK1δ, δKD und ε: Casein Kinase 1 delta , Casein Kinase 1 delta Kinasedomäne und Casein Kinase 1 epsilon

Inhibitor / Compound	IC_{50}Werte [nM] **CK1δ**	Ic_{50}Werte [nM] **CK1δKD**	IC_{50}Werte [nM] **CK1ε**
8	21,09 ± 0,02	19,53 ± 0,01	208,3 ± 0,12
25	33,20 ± 0,01	27,67 ± 0,01	56,05 ± 0,01
29	23,39 ± 0,01	20,80 ± 0,01	46,30 ± 0,01
31	76,50 ± 0,02	91,83 ± 0,09	584,7 ± 0,06
34	79,83 ± 0,03	52,34 ± 0,01	511,7 ± 0,01
38	138,1 ± 0,03	67,75 ± 0,01	524,0 ± 0,05
40	134,0 ± 0,03	291,0 ± 0,07	424,1 ± 0,02
42	261,1 ± 0,03	179,5 ± 0,09	323,4 ± 0,01
44	297,9 ± 0,01	376,9 ± 0,05	599,8 ± 0,01

3.3 Bestimmung der EC_{50}-Konzentrationen und Validierung ausgewählter Verbindungen in etablierten Tumorzellen

Um den Einfluss der potentiellen Inhibitoren auf das Wachstum etablierter Tumorzellen verschiedener Tumorentitäten zu untersuchen, wurden HT29, SW480 und SW620, AC1-M88, MCF-7, SV52 sowie Rev2 Zellen mit ausgewählten Inhibitoren behandelt. Der Anteil lebender Zellen wurde anschließend mit Hilfe des MTT-Zytotoxizitätsassays bestimmt (siehe auch Kapitel 2.2.8, Material und Methoden). Die Viabilitätsbestimmung erfolgte pro Zelllinie mit maximal fünf ausgewählten Inhibitoren. Hierzu zählen die Compounds **8**, **25**, **29**, **38** und **44**.
In Abb. 5 und 6 sind die ermittelten EC_{50}-Kurven für die jeweilige Zelllinie unter dem Einfluss des eingesetzten Inhibitors dargestellt. Die mittlere effektive Konzentration EC_{50} beschreibt die Inhibitorkonzentration, die zum Absterben bzw. dem Überleben von 50 % der Zellpopulation führt. Aus den in Abb. 5 dargestellten Ergebnissen wird ersichtlich, dass alle Substanzen die Viabilität der verschiedenen Zellen beeinträchtigen. Zwischen den ausgewählten Inhibitoren gibt es zum Teil sehr starke Unterschiede hinsichtlich ihrer Wirkung. Als besonders effektiver Inhibitor ist Compound **44** zu nennen, der bei allen vier

untersuchten Zelllinien eine EC_{50} unter 1 µM aufweist (HT29 EC_{50}=0,4567 µM; SW480 EC_{50}=0,7473 µM; SW620 EC_{50}=0,3255 µM und AC1-M88 EC_{50}=0,4016 µM). Andere Inhibitoren hingegen weisen stärkere Unterschiede bezüglich der EC_{50}-Werte zwischen den einzelnen Zelllinien auf. Die Inhibitorsubstanz **38** besitzt für HT29 Zellen beispielsweise eine EC_{50}=0,1486 µM, während die EC_{50} desselben Inhibitors bei den Zellen vom Typ SW480 einen ca. 18-fach höheren Wert aufweist, nämlich 2,693 µM. Ähnlich verhält es sich auch bei Compound **29**, bei dem der EC_{50}-Wert für HT29 Zellen um ein Vielfaches geringer ist als derjenige für SW480 Zellen (HT29 EC_{50}=0,8832 µM; SW480 EC_{50}=2,323 µM). Den absolut niedrigsten EC_{50}-Wert besitzt der Inhibitor **38** für HT29 Zellen (EC_{50}=0,1486 µM), während Compound **25** auf die Zellviabilität von SW480 Zellen den geringsten Einfluss hat (EC_{50}=4,666 µM).

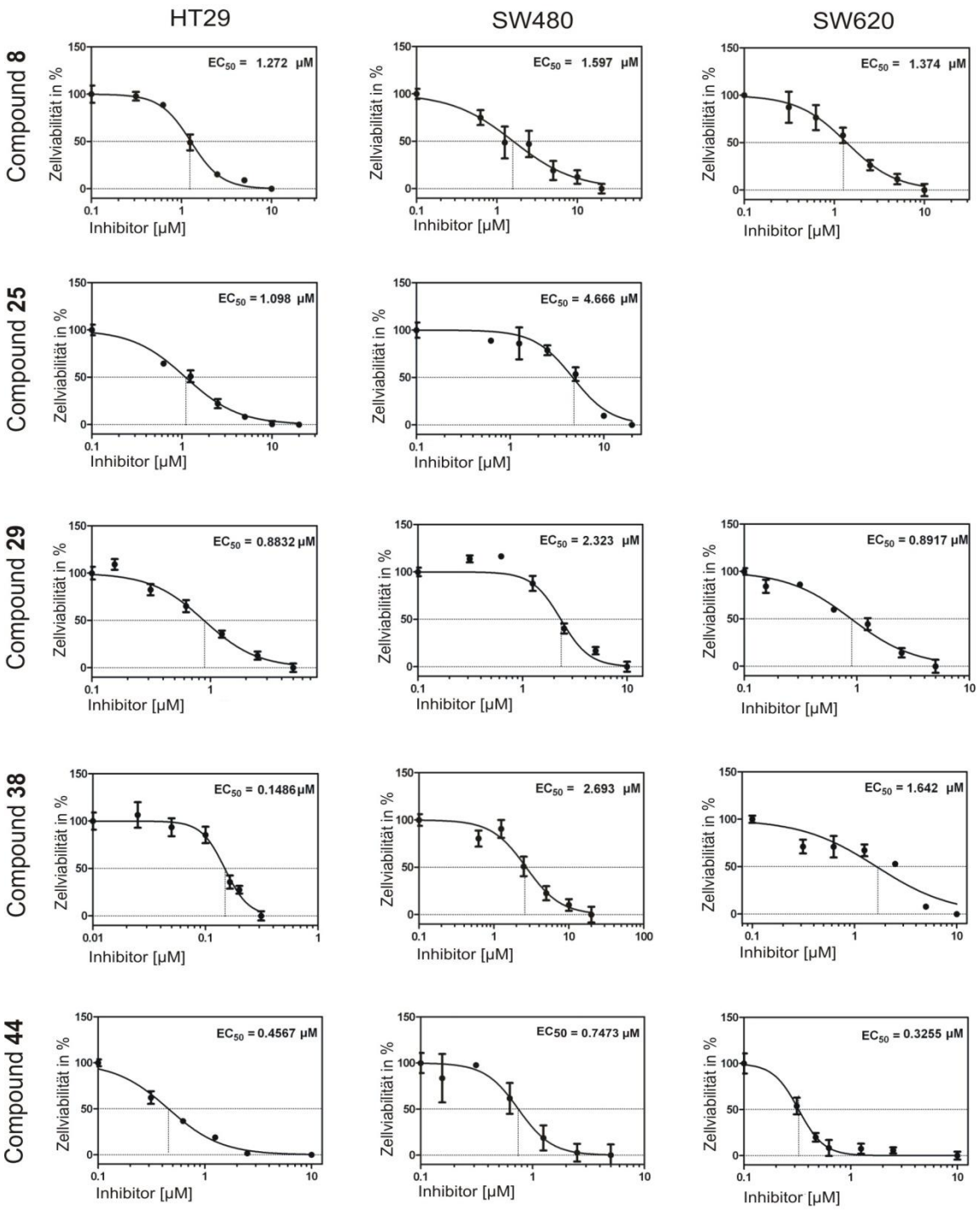


Abb. 5: EC_{50}-Konzentrationen ausgewählter Inhibitoren für die Zelllinien HT29, SW480 und SW620.

Dargestellt sind die ermittelten EC_{50}-Werte als Dosis-Wirkungs-Kurve der Zelllinien HT29, SW480 und SW620. Das genaue Verfahren der MTT-Zytotoxizitätsbestimmung ist in dem Kapitel 2.2.8, Material und Methoden, beschrieben. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert aus Messergebnissen des dreifachen Versuchsansatzes dar. In der Abbildung links ist die jeweilige Inhibitorsubstanz aufgeführt, während die drei untersuchten Zelllinien oben ablesbar sind. Zum Einfluss der Zytotoxizität von Compound 25 auf SW620 Zellen konnte keine verwertbare EC_{50}-Konzentration bestimmt werden. Abkürzungen: EC_{50}: mittlere effektive Konzentration bei der Toxizitätsbestimmung; µM: mikromolar

In Abb. 6 sind die Ergebnisse der MTT-Zytotoxizitätsbestimmungen für vier weitere Zelllinien (SV52, Rev2, AC1-M88 und MCF-7) mit den ausgewählten Verbindungen **29**, **38** und **44** dargestellt. Auch in diesem Fall besitzt Compound **44** wie bereits erwähnt eine EC_{50}-Konzentration unter 1 µM (EC_{50}=0,4016 µM) bei der getesteten Tumorzelllinie AC1-M88.

Die Verbindung **38** stellt sich als besonders effizienter Inhibitor heraus und erreicht bei allen drei untersuchten Zelllinien einen EC_{50}-Wert von unter 0,5 µM (SV52 Zellen EC_{50}=0,2534 µM; Rev2 Zellen EC_{50}=0,2764 µM und AC1-M88 Zellen EC_{50}=0,1832 µM).

Die untersuchte Zelllinie MCF-7 wurde durch den Inhibitor **29** ebenfalls in ihrer Viabilität reduziert, der EC_{50}-Wert beträgt hier 0,8559 µM.

Die gesamten EC_{50}-Werte der getesteten Inhibitoren und Zelllinien aus Abb. 5 und 6 sind zusammenfassend in der Tabelle 8 aufgelistet.

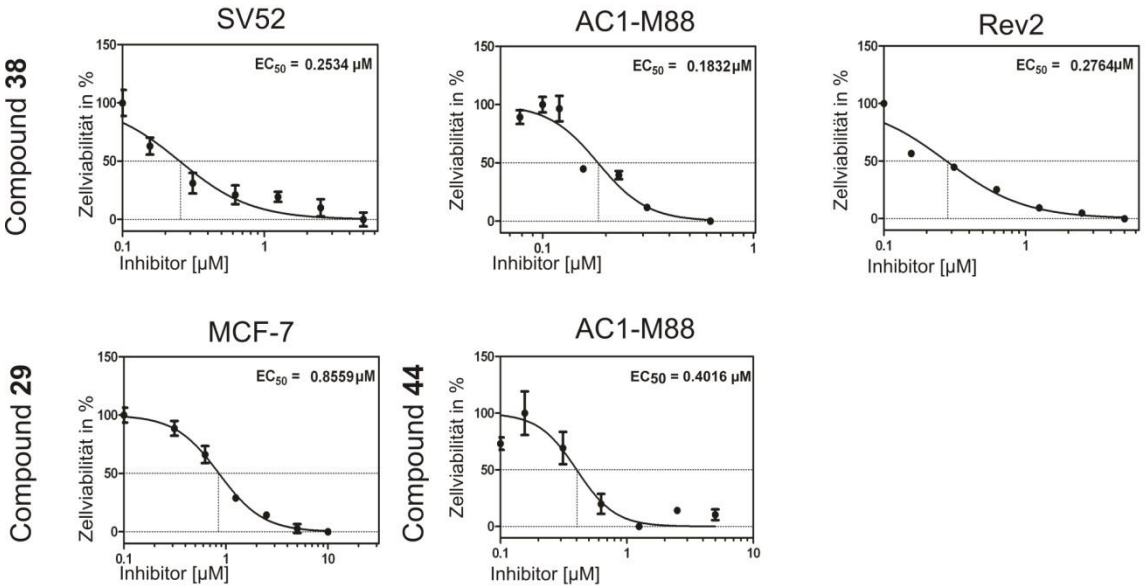


Abb.6: EC_{50}-Konzentrationen ausgewählter Inhibitoren für die Zelllinien SV52, Rev2, MCF-7 und AC1-M88.

Dargestellt sind die ermittelten EC_{50}-Werte als Dosis-Wirkungs-Kurve der Zelllinien SV52, AC1-M88, Rev2 und MCF-7. Das Prinzip der MTT-Zytotoxizitätsbestimmung ist in dem Kapitel 2.2.8, Material und Methoden, beschrieben. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert aus Messergebnissen des dreifachen Versuchsansatzes dar. In der Abbildung links ist die jeweilige Inhibitorsubstanz aufgeführt, die untersuchte Zelllinie ist oberhalb der Dosis-Wirkungs-Kurve ablesbar. Abkürzungen: EC_{50}: mittlere effektive Konzentration bei der Toxizitätsbestimmung; µM: mikromolar

Tab. 8: Zusammenstellung der EC_{50}-Konzentrationen der ausgewählten Inhibitoren für die verschiedenen Zelllinien.
Aufgeführt sind die ermittelten EC_{50}-Werte der Inhibitoren 8, 25, 29, 38 und 44 für die jeweilige Zelllinie. Die genannten Werte stellen Mittelwerte der drei Messergebnisse dar, außerdem ist der Fehler der Standardabweichung angegeben.
Abkürzungen: EC_{50}: mittlere effektive Konzentration; µM: mikromolar; nd: „not done“

Zelllinie	Compound 8 (EC_{50} in µM)	Compound 25 (EC_{50} in µM)	Compound 29 (EC_{50} in µM)	Compound 38 (EC_{50} in µM)	Compound 44 (EC_{50} in µM)
HT29	1,272 ± 0,09	1,098 ± 0,16	0,8832 ± 0,05	0,1486 ± 0,00	0,4567 ± 0,03
SW480	1,597 ± 0,04	4,666 ± 0,48	2,323 ± 0,21	2,693 ± 0,32	0,7473 ± 0,05
SW620	1,374 ± 0,20	nd	0,8917 ± 0,05	1,642 ± 0,38	0,3255 ± 0,00
SV52	nd	nd	nd	0,2534 ± 0,05	nd
Rev2	nd	nd	nd	0,2764 ± 0,01	nd
AC1-M88	nd	nd	nd	0,1832 ± 0,01	0,4016 ± 0,10
MCF-7	nd	nd	0,8559 ± 0,03	nd	nd

3.4 Einfluss ausgewählter Inhibitoren auf die Zellzyklusverteilung etablierter Tumorzelllinien

Um die neuen potentiellen Inhibitoren differenzierter beurteilen zu können, wurden im Anschluss an die MTT-Zytotoxizitätsmessungen FACS-Analysen durchgeführt. Ziel war es hierbei, Hinweise auf mögliche Auswirkungen der neuen Verbindungen auf die Zellzyklusverteilung verschiedener etablierter Tumorzelllinien zu erhalten.
Die FACS-Analysen wurden mit den Tumorzelllinien SW480, MCF-7, Rev2 und HL60 durchgeführt. Die eingesetzten Verbindungen sind die bereits bei der IC_{50}-Bestimmung und Zytotoxizitätsmessung getesteten Compounds **8**, **25**, **29**, **38** und **44**. Die jeweiligen Zelllinien wurden hierbei mit zwei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen behandelt. Zum Einen war dies der in 3.3 ermittelte EC_{50}-Wert der Zellen, zum Anderen der dreifach höhere Wert dieser EC_{50}-Konzentrationen.
Die Abb. 7 zeigt die Ergebnisse für die Zelllinie SW480. Die Zellen wurden für 48 h mit den Inhibitoren **8**, **25**, **29**, **38** und **44** behandelt. Zusätzlich erfolgte die Behandlung mit dem entsprechenden Zellmedium als Kontrollprobe und mit DMSO, um so eine potentiell zytotoxische Wirkung des Lösungsmittels zu ermitteln.

Die in Abb. 7 dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass nach 48 h Behandlung mit den neuen *Difluoro-dioxolo-benzoimidazol-benzamid* Derivaten der Anteil toter Zellen (SubG1 Fraktion) im Vergleich zur Kontrolle und zur DMSO-Behandlung unterschiedlich stark angestiegen ist. Die beiden höchsten Werte werden hierbei durch die Inhibitoren **29** (3 µM) mit 28,81 % und **38** (0,6 µM) mit 28,60 % abgestorbener Zellen erzielt. Der geringste Anteil an toten Zellen ist bei Compound **44** in einer Konzentration von 0,5 µM zu beobachten (14,33 %) und somit nicht gegenüber der Kontrolle bzw. der DMSO-Behandlung erhöht (s. Abb. 7). Neben dem Einfluss auf die SubG1 Fraktion kommt es auch zu Veränderungen bezüglich des Anteils von G2 Zellen, den Zellen in der prämitotischen Phase.

Bei einer Konzentrationszunahme des Inhibitors **25** steigt auch der Anteil an G2 Zellen um mehr als 10 Prozentpunkte. Die Zunahme an toten Zellen (Zellen der SubG1 Fraktion) beträgt bei einer Konzentrationssteigerung von 0,5 µM auf 4,5 µM hingegen nur weniger als 5 Prozentpunkte. Im Gegensatz dazu ist bei Compound **44** konzentrationsabhängig eine Abnahme der G2 Fraktion erkennbar (G2 bei einer Konzentration von 0,5 µM=20,54 %; G2 bei einer Konzentration von 1,5 µM=17,78 %).

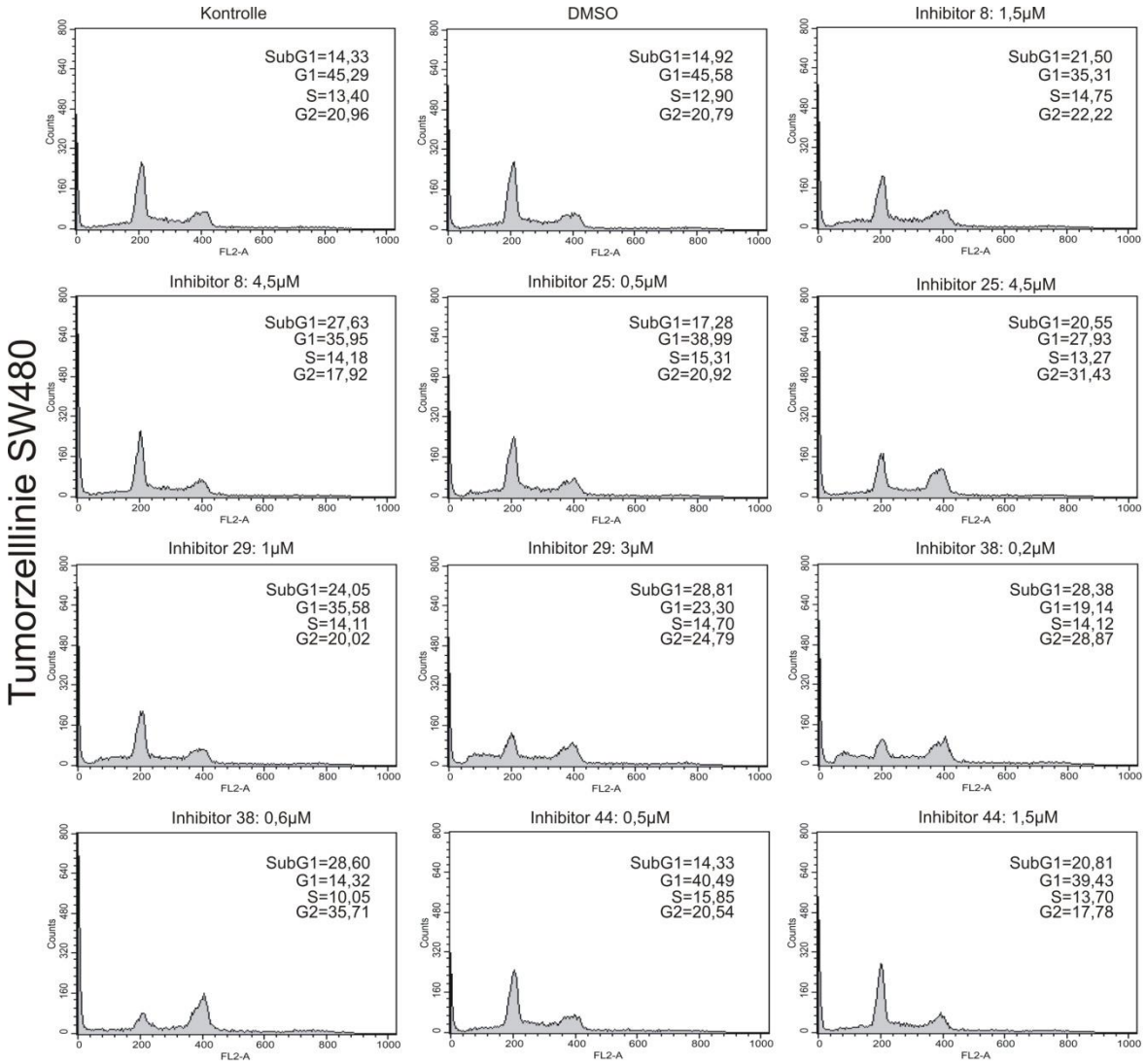


Abb. 7: Einfluss der Compounds 8, 25, 29, 38 und 44 auf die Zellzyklusverteilung der Tumorzelllinie SW480.

SW480 Zellen wurden für die FACS-Analysen 48 h mit den potentiellen Inhibitoren 8, 25, 29, 38 und 44 sowie DMSO behandelt. Die Kontrollprobe enthält lediglich das entsprechende Zellmedium. Die Zellen wurden nach 48 h fixiert, die DNA mit Propidiumiodid gefärbt, im Durchflusszytometer analysiert und anschließend mittels der Software Cell Quest ausgewertet. Die Angaben zu den einzelnen Fraktionen SubG1, G1, S und G2 sind in % dargestellt.

Abkürzungen: SubG1: Fraktion toter Zellen; G1: postmitotische Phase; S: Synthesephase; G2: prämitotische Phase; DMSO: Dimethylsulfoxid; FACS: flourescence activated cell sorting; µM: mikromolar

Neben den FACS-Analysen der SW480 Zellen wurden auch die Effekte der Verbindungen **8**, **25** und **38** auf die Zellzyklusverteilung der Tumorzelllinien MCF-7 und Rev2 untersucht (Abb. 8).

Hier zeigt sich, dass die Verbindungen **25** und **38** konzentrationsabhängig zu einem starken Anstieg der Fraktion abgestorbener Zellen (SubG1) im Vergleich zu den niedrigen Kontrollergebnissen führen. Den höchsten Wert erreicht der Inhibitor **38** bei den Rev2 Zellen in einer Konzentration von 0,9 µM mit einem Anteil toter

Zellen von über 50 %. In geringerer Konzentration (0,3 µM) kommt es ebenfalls zu einem starken Anstieg der SubG1 Fraktion auf ca. 30 %.

Bei der Tumorzelllinie MCF-7 kommt es unter dem Einfluss des Inhibitors **25** zum höchsten Wert der SubG1 Fraktion. In einer Konzentration von 1,5 µM liegt der Anteil toter Zellen bei ca. 46 %. Der Inhibitor **38** erreicht bei diesen Zellen in seiner höchsten Konzentration (1,2 µM) immerhin noch einen SubG1 Wert von 40 %. Die Ergebnisse des Einflusses von Compound **8** fallen hierbei vergleichsweise gering aus (SubG1 bei 0,8 µM=7,54 %; SubG1 bei 2,4 µM=15,69 %). Ähnlich den Zellen vom Typ SW480 kommt es auch bei den Tumorzelllinien MCF-7 und Rev2 konzentrationsabhängig zu Veränderungen der Anzahl von Zellen, die sich in der G2 Phase befinden. Bei den MCF-7 Zellen lässt sich unter dem Einfluss des Inhibitors **8** ein Anstieg der G2 Fraktion von 25,32 % (Inhibitorkonzentration=0,8 µM) auf ca. 40 % (Inhibitorkonzentration=2,4 µM) feststellen. Bei dieser Inhibitorverbindung kommt es somit sowohl zu einem Anstieg der SubG1 Fraktion als auch zu einer Zunahme der Zellen in der G2 Phase. Anders verhält es sich hingegen bei der Inhibitorverbindung **25**. Hier steigt der Anteil apoptotischer MCF-7 Zellen (SubG1) bei Konzentrationszunahme des Inhibitors von 16 % auf 46 %, während der G2 Anteil unverändert bei ca. 26 % persistiert. Auch bei der Tumorzelllinie Rev2 kommt es durch die neuen Verbindungen zur Beeinflussung des G2 Anteils. Durch Konzentrationszunahme des Inhibitors **38** kommt es zu einer Steigerung des Anteils toter Zellen (SubG1), während im Gegenzug der Anteil an G2 Zellen um ca. die Hälfte abnimmt (G2 bei einer Inhibitorkonzentration von 0,3 µM=14,24 % vs. G2 bei einer Inhibitorkonzentration von 0,9 µM=8,48 %).

Die Ergebnisse für diese beiden Zelllinien sind in Abb. 8 dargestellt.

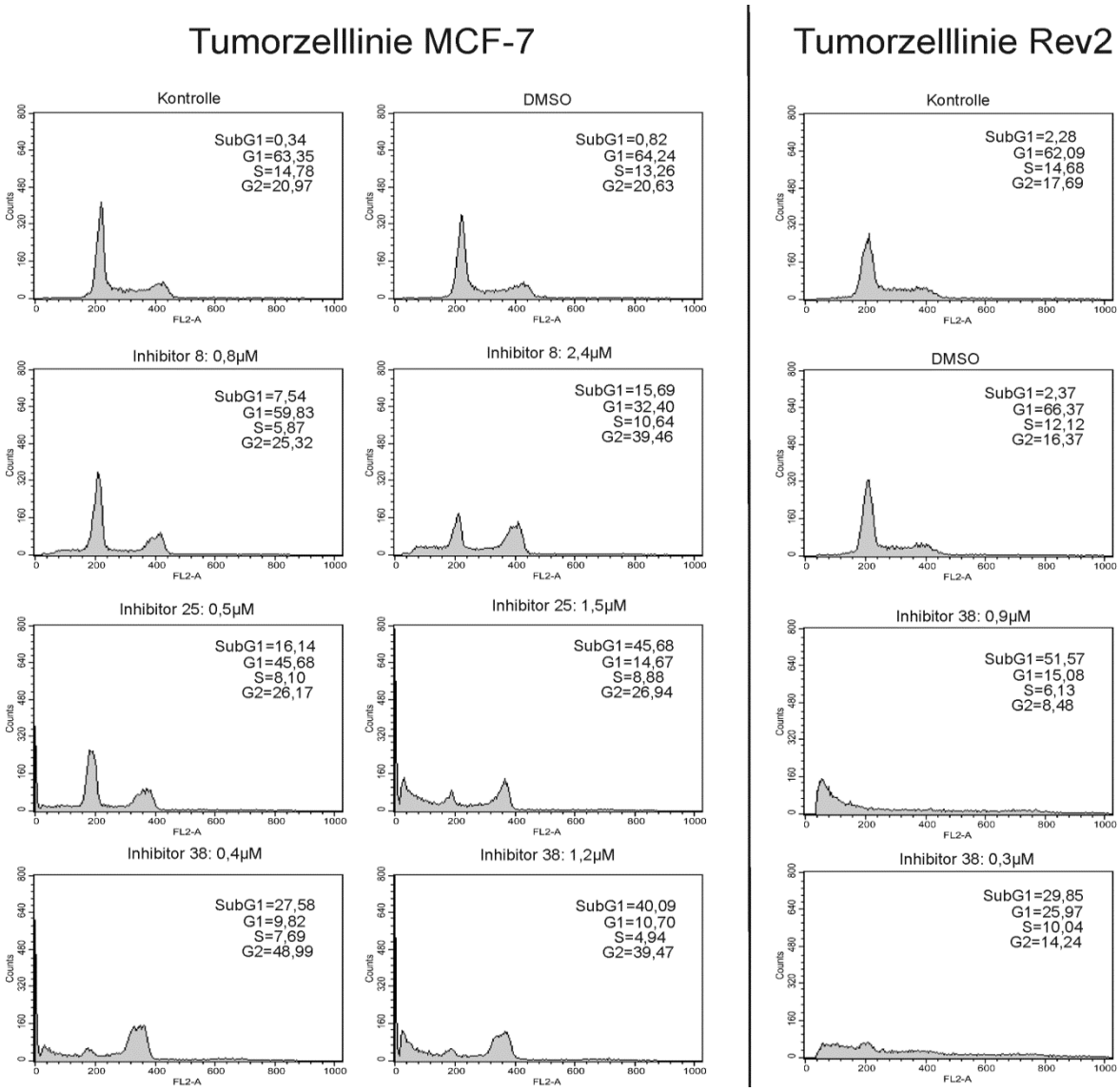


Abb. 8: Einfluss der Inhibitoren 8, 25 und 38 auf die Zellzyklusverteilung der Tumorzelllinie MCF-7 und Einfluss von Compound 38 auf die Zellzyklusverteilung der Tumorzelllinie Rev2.

MCF-7 und Rev2 Zellen wurden für die FACS-Analysen 48 h mit den potentiellen Inhibitoren 8, 25 und 38 sowie DMSO behandelt. Die Kontrollprobe enthält lediglich das entsprechende Zellmedium. Die Zellen wurden nach 48 h fixiert, gefärbt (Propidiumiodid), im Durchflusszytometer analysiert und anschließend mittels der Software Cell Quest ausgewertet. Die Angaben zu den einzelnen Fraktionen SubG1, G1, S und G2 sind in % dargestellt.
Abkürzungen: SubG1: Fraktion toter Zellen; G1: postmitotische Phase; S: Synthesephase; G2: prämitotische Phase; DMSO: Dimethylsulfoxid; FACS: „flourescence activated cell sorting"; µM: mikromolar

Abb. 9 zeigt die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse der Tumorzelllinie HL60 unter Einfluss der Inhibitorverbindung **38**. Zusätzlich zu den 48 h Messungen wurden bei dieser Zelllinie bereits nach 24 h die ersten Proben gemessen. Im Gegensatz zu den bisher untersuchten Zellen (Abb. 7 und 8) kommt es bei HL60 Zellen schon durch niedrige nanomolare Inhibitorkonzentrationen zu Zellzyklusveränderungen.

Einleitende FACS-Analysen, durchgeführt zur genauen Bestimmung der zu messenden Konzentrationen, zeigten für die HL60 Zellen bereits bei 200 nM einen Anteil von über 70 % abgestorbener Zellen, sodass die Messungen im Konzentrationsbereich von 1 nM – 100 nM erfolgten. Die entsprechenden Ergebnisse für 200 nM und 400 nM sind der Vollständigkeitshalber im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.
Der Anteil toter Zellen steigt nach 24 Stunden konzentrationsabhängig von 13 % bei einer Konzentration von 1 nM auf ca. 30 % bei 100 nM kontinuierlich an. Ähnlich verhält es sich auch nach 48 Stunden Behandlung durch den Inhibitor **38**. Hier beträgt der SubG1 Anteil bei 1 nM Inhibitorkonzentration ca. 15 % und steigt auf über 30 % (34,40 %) bei einer Inhibitorkonzentration von 100 nM. Die 24 h längere Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor führt somit nur zu einer relativ geringen Erhöhung der SubG1 Fraktion um wenige Prozentpunkte.

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse, dass die neuen getesteten *Difluoro-dioxolo-benzoimidazol-benzamid* Derivate, zelllinien- und konzentrationsabhängig die Proliferation sowie die Zellzyklusverteilung der untersuchten Tumorzelllinien beeinflussen. Insbesondere die Inhibitoren **38** und **44** zeichnen sich durch ihren hemmenden Einfluss auf die Proliferation mehrerer Tumorzellen in teilweise sehr geringer Konzentration aus.

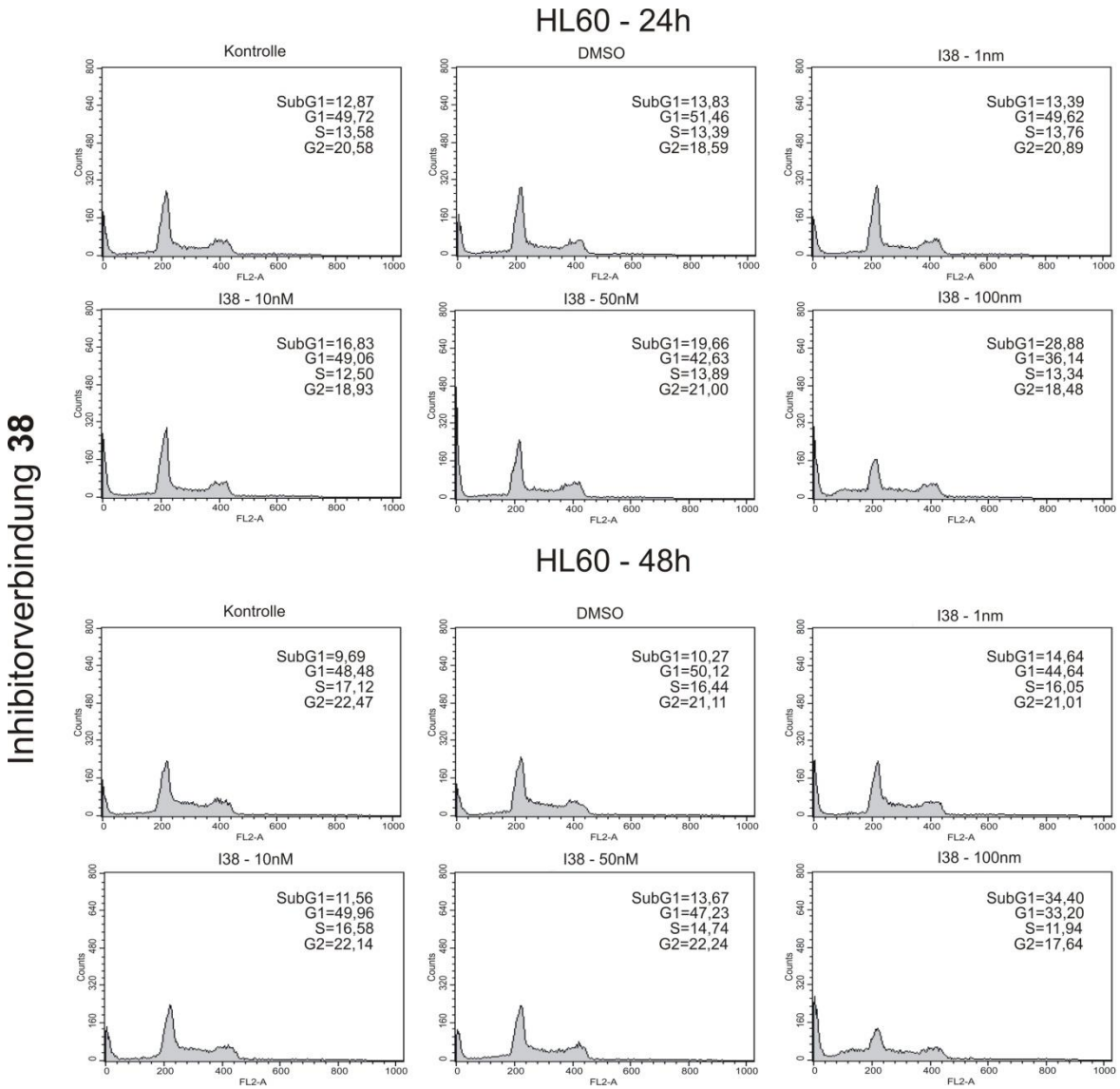


Abb. 9: Einfluss von Compound 38 auf die Zellzyklusverteilung der Tumorzelllinie HL60 nach 24 h und nach 48 h.

HL60 Zellen wurden für die FACS-Analysen für 24 h und für 48 h mit dem Inhibitor 38 sowie DMSO behandelt. Die Kontrollprobe enthält lediglich das Zellmedium. Die Zellen wurden nach der entsprechenden Zeit fixiert, gefärbt (Propidiumiodid), im Durchflusszytometer analysiert und anschließend mittels der Software Cell Quest ausgewertet. Die Angaben zu den einzelnen Fraktionen SubG1, G1, S und G2 sind in % dargestellt.

Abkürzungen: SubG1: Fraktion toter Zellen; G1: postmitotische Phase; S: Synthesephase; G2: prämitotische Phase; DMSO: Dimethylsulfoxid; FACS: „flourescence activated cell sorting"; µM: mikromolar

4. Diskussion

Mit zunehmenden Erkenntnissen über die Beteiligung von CK1 Isoformen an der Entstehung von malignen Erkrankungen, steigt das Interesse an der Entwicklung CK1-spezifischer Inhibitoren (Yang et al. 2012). Da die Proliferation von verschiedenen Tumorzelllinien und von induzierten Tumoren durch CK1 spezifische „small molecule inhibitors“ (SMIs) inhibiert werden kann (Behrend et al. 2000a; Brockschmidt et al. 2008; Dar and Shokat 2011; Stoter et al. 2005), besteht ein großes Interesse, neue CK1-spezifische Inhibitoren auch in klinischen Studien zu charakterisieren.
Das Ziel der vorliegenden Arbeit war aus diesem Grund die Validierung der von der Biotechnologiefirma 4SC neu entwickelten *Difluoro-dioxolo-benzoimidazol-benzamid* Derivate bezüglich ihrer Fähigkeiten, CK1-Isoformen spezifisch *in vitro* zu inhibieren sowie im Hinblick auf deren Potential das Wachstum etablierter Tumorzelllinien zu hemmen.

Zusammenfassend werden nun die wichtigsten Ergebnisse der Arbeit genannt und anschließend in einzelnen Kapiteln detailliert diskutiert:

- Die Bestimmung der IC_{50}-Konzentration von *Difluoro-dioxolo-benzoimidazol-benzamid* Derivaten ergab, dass diese die Aktivität von CK1 Isoformen, insbesondere CK1δ, sehr spezifisch im niedernanomolaren Bereich *in vitro* hemmen.

- Die Bestimmung der EC_{50}-Konzentration von *Difluoro-dioxolo-benzoimidazol-benzamid* Derivaten ergab, dass sie das Wachstum etablierter Tumorzelllinien zelllinien- und dosisabhängig hemmen.

- Des Weiteren wurden Veränderungen der Zellzyklusverteilung der mit *Difluoro-dioxolo-benzoimidazol-benzamid* Derivaten behandelten Zellen festgestellt. Diese waren zelllinien- und dosisabhängig.

4.1 Biochemische Charakterisierung der *Difluoro-dioxolo-benzoimidazol-benzamid* Derivate *in vitro*

Um die potentiellen Inhibitoren validieren zu können, wurde zu Beginn ein einleitendes Screening bei einer ATP-Konzentration von 10 µM durchgeführt, um inhibitorische Effekte auf die Aktivität von GST-CK1δ, CK1δKD und CK1ε zu untersuchen. Für die Verbindungen, die im Screening besonders hohe inhibitorische Effekte zeigten, wurde die jeweilige IC_{50}-Konzentration für die Isoformen GST-CK1δ, CK1δKD und CK1ε bestimmt, sodass einige sehr potente Substanzen identifiziert werden konnten.

Zu den besonders wirksamen CK1δ Inhibitoren zählen Compound **8** (IC_{50} in nM=21,09), **25** (IC_{50} in nM=33,20), **29** (IC_{50} in nM=23,39), **31** (IC_{50} in nM=76,50) und **34** (IC_{50} in nM=79,83) mit niedrigen Werten im nanomolaren Bereich. Von sog. niedrigen oder geringen Werten wird in dieser Arbeit gesprochen, wenn die IC_{50}-Konzentration unter 100 nM liegt. Auch für CK1δKD erreichen die genannten Verbindungen relativ ähnliche Werte im niedrig-nanomolaren Bereich. Den größten Unterschied zwischen den Werten von CK1δ und CK1δKD besitzt hierbei Compound **38**. Compound **38** besitzt für GST-CK1δKD eine IC_{50} von 67,75 nM, was ungefähr der Hälfte des IC_{50}-Wertes für CK1δ entspricht.

Derartige Unterschiede zwischen den Werten für GST-CK1δ und CK1δKD sind durch den C-terminalen regulatorischen Bereich erklärbar. Dieser regulatorische C-Terminus ist - im Gegensatz zur CK1δKD - in GST-CK1δ enthalten, und kann sich auf die Konformation von CK1δ auswirken und auf diese Weise auch die Bindungsfähigkeit des Inhibitors modulieren (Bischof et al. 2012; Lolli et al. 2012).

Für die dritte untersuchte Isoform CK1ε lassen sich nur zwei Inhibitoren mit einer hemmenden Wirkung im geringen nanomolaren Bereich identifizieren. Hierzu zählen die Verbindungen **25** (IC_{50} in nM=56,05) und **29** (IC_{50} in nM=46,30). Die IC_{50}-Werte für CK1ε liegen jedoch immer noch höher als die Werte derselben Verbindungen für GST-CK1δ.

Neben dem inhibitorischen Effekt wurde auch die Selektivität der Verbindungen für CK1-Isoformen analysiert. Hierbei zeigen sich vor allem für vier Verbindungen zwischen GST-CK1δ bzw. CK1δKD und CK1ε deutliche Unterschiede. Neben der bekannten Vergleichssubstanz **8** weist auch Compound **34** eine ca. 10-fach stärkere Hemmung von CK1δKD gegenüber CK1ε auf (IC_{50} Compound**34** für

CK1ε=511,7 nM und für CK1δKD=52,34 nM). CK1δKD wird auch durch die zwei Substanzen **31** und **38** wesentlich stärker inhibiert als CK1ε; für beide wurde im Vergleich eine ca. 8-fach stärkere Hemmung nachgewiesen.

Um die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse in einem wissenschaftlichen Kontext beurteilen zu können, wurden die Ergebnisse mit bereits bekannten CK1-Inhibitoren verglichen. Die von Peifer und Mitarbeitern charakterisierten Compounds 17 und 18 zeigen für CK1δKD bei einer ATP-Konzentration von 100 µM IC_{50}-Werte unter 10 nM und gehören damit zu den bisher potentesten bekannten CK1-Inhibitoren (IC_{50} Compound 17 für CK1δKD=4 nM und IC_{50} Compound 18 für CK1δKD=5 nM) (Peifer et al. 2009). Zwei weitere sehr potente Inhibitoren sind PF-670462 (Badura et al. 2007) und (R)-DRF053 (Oumata et al. 2008), die beide eine IC_{50}-Konzentration von 14 nM für CK1δ besitzen. PF-670462 scheint jedoch nicht so hochselektiv zu sein wie anfangs gedacht. Neue Erkenntnisse haben gezeigt, dass PF-670462 ebenfalls sehr potent p38, JNK und EGFR inhibiert (Bibian et al. 2013; Walton et al. 2009).

Der heterozyklische Inhibitor IC261 besitzt für CK1δ eine IC_{50} von 1 µM. Doch auch dieser Inhibitor erzielt seine hemmende Wirkung teilweise durch *off-target* Effekte, unter anderem durch eine Unterbindung der Mikrotubuli-Polymerisation (Cheong and Virshup 2011). Der von Bischof und Mitarbeitern identifizierte Inhibitor Bischof-5 besitzt eine IC_{50}-Konzentration im niedrig-nanomolaren Bereich (IC_{50} für CK1δ=48 nM) und hemmt CK1δ sehr spezifisch im Vergleich zu anderen CK1-Isoformen (Bischof et al. 2012). Zwei weitere sehr potente und auch stark spezifisch wirkende Inhibitoren stellen die erst kürzlich charakterisierten Compounds SR-2890 und SR-3029 dar. Hierbei handelt es sich um *2-(aminomethyl)benzimidazoles* Derivate, deren IC_{50} ebenfalls im niedrig-nanomolaren Bereich liegt. Für CK1δ liegt der IC_{50}-Wert des Inhibitors SR-2890 bei 4 nM und des Inhibitors SR-3029 bei 44 nM (Bibian et al. 2013). Die Ergebnisse sind jedoch schwer zu beurteilen, da in der Publikation keine Angaben zur verwendeten ATP-Konzentration gemacht wurden.

Die in dieser Arbeit neu identifizierten Inhibitoren **25** und **29** weisen mit ihrer halbmaximalen Hemmkonzentration von ca. 33 nM und 23 nM für CK1δ ebenso niedrige Werte auf wie einige der oben genannten Inhibitoren, beispielsweise PF-670462 und (R)-DRF053. Im Vergleich zu diesen beiden Hemmstoffen werden für CK1δKD sogar noch geringere IC_{50}-Konzentrationen erzielt (IC_{50} Compound **25** für

CK1δKD=27,67 nM; IC_{50} Compound **29** für CK1δKD=23,39 nM), sodass die in dieser Arbeit identifizierten Inhibitoren neben den in der Literatur beschriebenen Inhibitoren zu den potentesten CK1-spezifischen Hemmstoffen gehören. Für eine genauere Einschätzung der inhibitorischen Potenz der jeweiligen Verbindung ist zusätzlich auch die ATP-Konzentration zu berücksichtigen, bei der die Ergebnisse ermittelt wurden. Da es sich bei den Inhibitoren um ATP-kompetitive Substanzen handelt, die gemeinsam mit dem ATP um die Bindungsstelle konkurrieren, heben sich insbesondere die von Peifer und Mitarbeitern identifizierten Inhibitoren hervor, die bei einer ATP-Konzentration von 100 µM die o.g. niedrig-nanomolaren IC_{50}-Werte erreichen (Peifer et al. 2009).

Um die Isoformspezifitäten und weitere Effekte der neuen Verbindungen noch detaillierter beurteilen zu können, sind weitere Experimente mit den Isoformen CK1α, β und γ1 - 3 sowie deren Spleißvarianten erforderlich. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch bereits, dass es unter den untersuchten *Difluoro-dioxolo-benzoimidazol-benzamid* Derivaten Verbindungen gibt, die eine hohe Spezifität für CK1δ und deren Kinasedomäne besitzen.

4.2 Charakterisierung des antiproliferativen Potentials der neu identifizierten CK1-spezifischen Verbindungen und Einfluss auf die Zellzyklusverteilung in etablierten Tumorzelllinien

Im Anschluss an die IC_{50}-Bestimmung ausgewählter Inhibitoren wurden Zellkulturexperimente durchgeführt, um die antiproliferative Wirkung auf etablierte Tumorzelllinien zu untersuchen. Diese Versuche sind insofern wichtig, weil sich die inhibitorische Wirkung von Hemmstoffen *in vitro* und *in vivo* erheblich unterscheiden kann. Die Neu- und Weiterentwicklung von Inhibitoren bedeutet folglich nicht allein eine Verbesserung der IC_{50}-Werte, sondern eine Stärkung der Hemmung in Bezug auf Tumorzelllinienwachstum. Alle bisher bekannten CK1-Inhibitoren sind ATP-kompetitiv. Das bedeutet, dass CK1-Inhibitoren, die *in vitro* eine hohe Wirksamkeit gezeigt haben, aufgrund der höheren intrazellulären ATP-Konzentration ihren hemmenden Einfluss in Zellkulturexperimenten verlieren können.

Des Weiteren sind nur wenige der bekannten CK1-spezifischen Inhibitoren im intrazellulären Milieu verfügbar (Chijiwa et al. 1989; Mashhoon et al. 2000; Rena

et al. 2004). Zu diesen Inhibitoren, welche die Zellmembranen penetrieren und die Proliferation von Tumorzelllinien hemmen können, zählen u.a. D4476 und IC261.

Die durchgeführten MTT-Assays haben gezeigt, dass die *Difluoro-dioxolo-benzoimidazol-benzamid* Derivate **8**, **25**, **29**, **38** und **44** die Viabilität der untersuchten Tumorzelllinien senken. Insbesondere Compound **44** sticht hierbei hervor, da dieser Inhibitor in allen getesteten Tumorzelllinien - HT29, SW480, SW620 und AC1-M88 - jeweils eine EC_{50}-Konzentration von unter 1 µM aufwies. Auch bei dem Inhibitor **38** werden bei vier von insgesamt sechs untersuchten Tumorzelllinie EC_{50}-Werte unter 1 µM erreicht. HT29 Zellen werden hier bereits bei einer EC_{50}-Konzentration von nur 0,1486 µM um 50 % in ihrer Viabilität reduziert, während bei den SW480 Zellen höhere Konzentrationen für die entsprechende Wirkung benötigt werden. Insgesamt reagieren HT29 Zellen von allen untersuchten Tumorzelllinien am sensitivsten auf die untersuchten Inhibitoren, wohingegen für die Viabilitätssenkung der Colontumorzelllinie SW480 höhere Inhibitorkonzentrationen notwendig sind. Die Ergebnisse zeigen somit, dass die Inhibitoren zelllinien- und dosisabhängig wirken.

Die durchgeführten Zellzyklusanalysen bestätigen die bei den MTT-Assays gewonnenen Erkenntnisse. Hierbei zeigten sich insbesondere die Inhibitoren **25**, **29** und **38** am effektivsten und führten zu einem Anteil toter Zellen von ca. 46 % bei der Tumorzelllinie MCF-7 (Inh. **25**) und ca. 52 % bei der Tumorzelllinie Rev2 (Inh. **38**). Der Inhibitor **29** führte bei den im MTT-Assay relativ resistenten SW480 Zellen immerhin noch zu einem Anteil abgestorbener Zellen von ungefähr 30 %.

Vergleicht man die gewonnenen EC_{50} Ergebnisse mit bereits bekannten potenten CK1-Inhibitoren, fallen insbesondere die in dieser Arbeit identifizierten Inhibitoren **29**, **38** und **44** positiv auf. Diese Inhibitoren sind in der Lage mehrere Tumorzelllinien im nanomolaren Bereich zu inhibieren sowie entsprechende Zellzyklusveränderungen hervorzurufen.

Der bereits bekannte Inhibitor D4476 benötigt hingegen für vergleichende Effekte im Zellkulturexperiment mit MOLT-3 Zellen Mindestkonzentrationen von ca. 20 - 50 µM (Badura et al. 2007; MacLaine et al. 2008). Auch der CK1-Inhibitor IC261 besitzt EC_{50}-Werte in der Größenordnung um 25 µM und erreicht seine Wirkung zudem über zusätzliche *off-target* Effekte. Ein weiterer beschriebener Inhibitor ist DRF053, der sowohl CK1 als auch CDK inhibiert und bei den menschlichen Neuroblastoma-Zellen SH-SY5Y getestet wurde. Für diesen dualen Hemmstoff

wurde eine EC_{50}-Konzentration von 17,2 µM ermittelt. Bei den von Bibian und Mitarbeitern beschriebenen Inhibitoren SR-2890 und SR-3029 wurden im Gegensatz dazu in MTT-Versuchen mit menschlichen Melanomzellen EC_{50}-Werte unter 100 nM gemessen (Bibian et al. 2013).
Abschließend muss erwähnt werden, dass eine vergleichende Beurteilung der Inhibitoren bezüglich ihres antiproliferativen Potentials auf Tumorzelllinien insgesamt schwierig ist, da die Compounds häufig bei unterschiedlichen Tumorzelllinien getestet wurden. Neben der Art der Tumorzelllinie ist weiterhin der genaue zelluläre Background entscheidend. Hier spielt vor allem der p53 Status eine Rolle. Einen Anstieg von Zellen, die sich im postmitotischen Zellzyklusarrest (G1) befinden, lässt sich z.B. bei „wild-type p53“ exprimierenden Tumorzelllinien, wie z.B. AC1-M88, beobachten. Exprimiert die Tumorzelle jedoch kein p53 bzw. mutiertes p53, so kommt es durch die Behandlung von CK1-spezifischen Inhibitoren zu einer Endoreduplikation und Aneuploidie, wobei sich das Genom fortlaufend repliziert, ohne dass es zur Zellteilung kommt (Behrend et al. 2000a; Stoter et al. 2005).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Identifizierung neuer *Difluoro-dioxolo-benzoimidazol-benzamid* Derivate führte, die CK1 Isoformen, insbesondere CK1ð, im niedernanomloaren Bereich hemmen. Die Behandlungen unterschiedlicher Tumorzelllinien mit diesen Inhibitoren haben weiterhin gezeigt, dass es unter ihrem Einfluss zur Apoptose und Veränderungen im Zellzyklus kommt. Weitere Experimente zur Untersuchung der Isoformenspezifität und zur Verbesserung der intrazellulären Verfügbarkeit sollen folgen, um die gewonnenen Ergebnisse zu bestätigen und die *in vivo* Wirksamkeit zu erhöhen.
Im Hinblick auf das hohe maligne Potential und die klinische Bedeutung von deregulierten und mutierten CK1-Isoformen ist die Entwicklung und Testung neuer potenter und spezifischer CK1-Inhibitoren für den therapeutischen Einsatz in der Tumortherapie von großer Relevanz.

5. Zusammenfassung

Die Mitglieder der CK1 (Casein Kinase 1) Familie sind an zahlreichen zellulären Vorgängen im Körper maßgeblich beteiligt. Zur Entstehung von Krankheiten, insbesondere von malignen Tumorentitäten, kann es hingegen kommen, wenn einzelne Isoformen von CK1 dereguliert oder mutiert sind, was zu einer Störung einer Vielzahl von physiologischen Prozessen führt. Der Einsatz von hochwirksamen „small molecule inhibitors“ (SMIs), zur Hemmung von CK1 Isoformen, stellt aus diesem Grund eine vielversprechende Therapiemöglichkeit dar. Ziel dieser Arbeit war folglich die Validierung von neuen bzw. weiterentwickelten CK1-spezifischen Inhibitoren. Unter den getesteten *Difluoro-dioxolo-benzoimidazol-benzamid* Derivaten konnten einige sehr effiziente und auch spezifische Inhibitoren identifiziert werden. Bei den zuerst durchgeführten *in vitro* Versuchen konnten mehrere Inhibitoren charakterisiert werden, die die Aktivität von CK1δ bereits in niedrig-nanomolaren Konzentrationen hemmen. Hierzu zählen die Compounds **8** (IC_{50} in nM=21,09), **25** (IC_{50} in nM=33,20), **29** (IC_{50} in nM=23,39), **31** (IC_{50} in nM=76,50) und **34** (IC_{50} in nM=79,83). Neben der eigentlichen inhibitorischen Potenz ist zusätzlich die Isoformenspezifität zu validieren, die später im klinischen Einsatz bedeutsam für den Therapierfolg und das Auftreten von Nebenwirkungen ist. Als CK1δ-spezifische Inhibitoren haben sich bei den Versuchen speziell die Compounds **31**, **34** und **38** gezeigt. Für den Inhibitor **34** konnte eine ca. 10-fach stärkere Hemmung - für die Inhibitoren **31** und **38** immerhin noch eine 8-fach stärkere Hemmung **-** von CK1δKD gegenüber CK1ε nachgewiesen werden.

Nach der IC_{50}-Bestimmung der Inhibitoren folgten *in vivo* Versuche mit etablierten Tumorzelllinien. Es wurden MTT-Assays (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) und FACS-Analysen (fluorescence activated cell sorting) durchgeführt, um mögliche Einflüsse auf die Zellviabilität und die Zellzyklusverteilung der Zellen aufzudecken. Auch bei diesen Experimenten konnten *Difluoro-dioxolo-benzoimidazol-benzamid* Derivate identifiziert werden, die in der Lage sind, die Zellviabilität signifikant zu reduzieren und somit die Proliferation zu hemmen.

Die Inhibitoren **8**, **25**, **29**, **38** und **44** reduzierten alle in ihrer jeweils untersuchten Tumorzelllinie die Zellviabilität. Compound **38** und **44** müssen besonders hervorgehoben werden, weil diese beiden Substanzen bereits in sehr niedriger Konzentration (EC_{50}-Konzentration unter 1 µM) die Proliferation mehrerer Tumorzelllinien inhibieren.
Entsprechende Veränderungen im Zellzyklus konnten durch die durchgeführten FACS-Analysen ebenfalls nachgewiesen werden. So konnte bei den zwei Inhibitoren **25** und **38** ein deutlicher Anstieg von toten Zellen (SubG1 Fraktion) gemessen werden (46 % bei Inhib. **25**; 52 % bei Inhib. **38**).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegende Arbeit durch die gewonnenen Ergebnisse zur Identifizierung von neuen potenten und spezifischen CK1-Inhibitoren geführt hat, die *in vitro* und in Zellkulturexperimenten validiert wurden.
Mit Blick auf die klinische Relevanz, stellen diese neu identifizierten CK1 Inhibitoren in Zukunft mögliche Therapiekonzepte gegen Tumorentitäten dar. Hierfür müssen sich die bisher gewonnenen Erkenntnisse in folgenden Tiermodellversuchen und ersten klinischen Studien zusätzlich beweisen.

6. Literaturverzeichnis

1 Adachi A, Koenig S, Gendelman H E, Daugherty D, Gattoni-Celli S, Fauci A S and Martin M A: Productive, persistent infection of human colorectal cell lines with human immunodeficiency virus. J Virol 61: 209-213 (1987)

2 Agostinis P, Pinna L A, Meggio F, Marin O, Goris J, Vandenheede J R and Merlevede W: A synthetic peptide substrate specific for casein kinase I. FEBS Lett 259: 75-78 (1989)

3 Alappat E C, Volkland J and Peter M E: Cell cycle effects by C-FADD depend on its C-terminal phosphorylation site. J Biol Chem 278: 41585-41588 (2003)

4 Alappat E C, Feig C, Boyerinas B, Volkland J, Samuels M, Murmann A E, Thorburn A, Kidd V J, Slaughter C A, Osborn S L, Winoto A, Tang W J and Peter M E: Phosphorylation of FADD at serine 194 by CKIalpha regulates its nonapoptotic activities. Mol Cell 19: 321-332 (2005)

5 Alsheich-Bartok O, Haupt S, Alkalay-Snir I, Saito S, Appella E and Haupt Y: PML enhances the regulation of p53 by CK1 in response to DNA damage. Oncogene 27: 3653-3661 (2008)

6 Amanchy R, Kandasamy K, Mathivanan S, Periaswamy B, Reddy R, Yoon W H, Joore J, Beer M A, Cope L and Pandey A: Identification of Novel Phosphorylation Motifs Through an Integrative Computational and Experimental Analysis of the Human Phosphoproteome. J Proteomics Bioinform 4: 22-35 (2011)

7 Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen J S, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y and Alkalay I: Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. Genes Dev 16: 1066-1076 (2002)

8 Badura L, Swanson T, Adamowicz W, Adams J, Cianfrogna J, Fisher K, Holland J, Kleiman R, Nelson F, Reynolds L, St Germain K, Schaeffer E, Tate B and Sprouse J: An inhibitor of casein kinase I epsilon induces phase delays in circadian rhythms under free-running and entrained conditions. J Pharmacol Exp Ther 322: 730-738 (2007)

9 Bauer M, Guhl E, Graessmann M and Graessmann A: Cellular mutation mediates T-antigen-positive revertant cells resistant to simian virus 40

transformation but not to retransformation by polyomavirus and adenovirus type 2. J Virol 61: 1821-1827 (1987)

10 Behrend L, Milne D M, Stoter M, Deppert W, Campbell L E, Meek D W and Knippschild U: IC261, a specific inhibitor of the protein kinases casein kinase 1-delta and -epsilon, triggers the mitotic checkpoint and induces p53-dependent postmitotic effects. Oncogene 19: 5303-5313 (2000a)

11 Behrend L, Stoter M, Kurth M, Rutter G, Heukeshoven J, Deppert W and Knippschild U: Interaction of casein kinase 1 delta (CK1delta) with post-Golgi structures, microtubules and the spindle apparatus. Eur J Cell Biol 79: 240-251 (2000b)

12 Berninghausen O and Leippe M: Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by Entamoeba histolytica. Infect Immun 65: 3615-3621 (1997)

13 Beyaert R, Vanhaesebroeck B, Declercq W, Van Lint J, Vandenabele P, Agostinis P, Vandenheede J R and Fiers W: Casein kinase-1 phosphorylates the p75 tumor necrosis factor receptor and negatively regulates tumor necrosis factor signaling for apoptosis. J Biol Chem 270: 23293-23299 (1995)

14 Bibian M, Rahaim R J, Choi J Y, Noguchi Y, Schurer S, Chen W, Nakanishi S, Licht K, Rosenberg L H, Li L, Feng Y, Cameron M D, Duckett D R, Cleveland J L and Roush W R: Development of highly selective casein kinase 1delta/1epsilon (CK1delta/epsilon) inhibitors with potent antiproliferative properties. Bioorg Med Chem Lett 23: 4374-4380 (2013)

15 Bischof J, Leban J, Zaja M, Grothey A, Radunsky B, Othersen O, Strobl S, Vitt D and Knippschild U: 2-Benzamido-N-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thiazole-4-carboxamide derivatives as potent inhibitors of CK1delta/epsilon. Amino Acids 43: 1577-1591 (2012)

16 Brockman J L, Gross S D, Sussman M R and Anderson R A: Cell cycle-dependent localization of casein kinase I to mitotic spindles. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 9454-9458 (1992)

17 Brockschmidt C, Hirner H, Huber N, Eismann T, Hillenbrand A, Giamas G, Radunsky B, Ammerpohl O, Bohm B, Henne-Bruns D, Kalthoff H, Leithauser F, Trauzold A and Knippschild U: Anti-apoptotic and growth-stimulatory functions of CK1 delta and epsilon in ductal adenocarcinoma of

the pancreas are inhibited by IC261 in vitro and in vivo. Gut 57: 799-806 (2008)

18 Bryja V, Schulte G, Rawal N, Grahn A and Arenas E: Wnt-5a induces Dishevelled phosphorylation and dopaminergic differentiation via a CK1-dependent mechanism. J Cell Sci 120: 586-595 (2007)

19 Budini M, Jacob G, Jedlicki A, Perez C, Allende C C and Allende J E: Autophosphorylation of carboxy-terminal residues inhibits the activity of protein kinase CK1alpha. J Cell Biochem 106: 399-408 (2009)

20 Burnett G and Kennedy E P: The enzymatic phosphorylation of proteins. J Biol Chem 211: 969-980 (1954)

21 Bustos V H, Marin O, Meggio F, Cesaro L, Allende C C, Allende J E and Pinna L A: Generation of protein kinase Ck1alpha mutants which discriminate between canonical and non-canonical substrates. Biochem J 391: 417-424 (2005)

22 Cajanek L, Ganji R S, Henriques-Oliveira C, Theofilopoulos S, Konik P, Bryja V and Arenas E: Tiam1 regulates the Wnt/Dvl/Rac1 signaling pathway and the differentiation of midbrain dopaminergic neurons. Mol Cell Biol 33: 59-70 (2013)

23 Carmel G, Leichus B, Cheng X, Patterson S D, Mirza U, Chait B T and Kuret J: Expression, purification, crystallization, and preliminary x-ray analysis of casein kinase-1 from Schizosaccharomyces pombe. J Biol Chem 269: 7304-7309 (1994)

24 Cegielska A, Gietzen K F, Rivers A and Virshup D M: Autoinhibition of casein kinase I epsilon (CKI epsilon) is relieved by protein phosphatases and limited proteolysis. J Biol Chem 273: 1357-1364 (1998)

25 Chen L, Gilkes D M, Pan Y, Lane W S and Chen J: ATM and Chk2-dependent phosphorylation of MDMX contribute to p53 activation after DNA damage. EMBO J 24: 3411-3422 (2005a)

26 Chen L, Li C, Pan Y and Chen J: Regulation of p53-MDMX interaction by casein kinase 1 alpha. Mol Cell Biol 25: 6509-6520 (2005b)

27 Chen T R, Drabkowski D, Hay R J, Macy M and Peterson W, Jr.: WiDr is a derivative of another colon adenocarcinoma cell line, HT-29. Cancer Genet Cytogenet 27: 125-134 (1987)

28 Cheong J K and Virshup D M: Casein kinase 1: Complexity in the family. Int J Biochem Cell Biol 43: 465-469 (2011)

29 Chergui K, Svenningsson P and Greengard P: Physiological role for casein kinase 1 in glutamatergic synaptic transmission. J Neurosci 25: 6601-6609 (2005)

30 Chijiwa T, Hagiwara M and Hidaka H: A newly synthesized selective casein kinase I inhibitor, N-(2-aminoethyl)-5-chloroisoquinoline-8-sulfonamide, and affinity purification of casein kinase I from bovine testis. J Biol Chem 264: 4924-4927 (1989)

31 Christmann J L and Dahmus M E: Phosphorylation of rat ascites tumor non-histone chromatin proteins. Differential phosphorylation by two cyclic nucleotide-independent protein kinases and comparison to in vivo phosphorylation. J Biol Chem 256: 3326-3331 (1981)

32 Cobb M H and Rosen O M: Description of a protein kinase derived from insulin-treated 3T3-L1 cells that catalyzes the phosphorylation of ribosomal protein S6 and casein. J Biol Chem 258: 12472-12481 (1983)

33 Cohen P: The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. Eur J Biochem 268: 5001-5010 (2001)

34 Cruciat C M, Dolde C, de Groot R E, Ohkawara B, Reinhard C, Korswagen H C and Niehrs C: RNA helicase DDX3 is a regulatory subunit of casein kinase 1 in Wnt-beta-catenin signaling. Science 339: 1436-1441 (2013)

35 Dar A C and Shokat K M: The evolution of protein kinase inhibitors from antagonists to agonists of cellular signaling. Annu Rev Biochem 80: 769-795 (2011)

36 Davidson G, Wu W, Shen J, Bilic J, Fenger U, Stannek P, Glinka A and Niehrs C: Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. Nature 438: 867-872 (2005)

37 DeMaggio A J, Lindberg R A, Hunter T and Hoekstra M F: The budding yeast HRR25 gene product is a casein kinase I isoform. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 7008-7012 (1992)

38 Desagher S, Osen-Sand A, Montessuit S, Magnenat E, Vilbois F, Hochmann A, Journot L, Antonsson B and Martinou J C: Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. Mol Cell 8: 601-611 (2001)

39 Desdouits F, Cohen D, Nairn A C, Greengard P and Girault J A: Phosphorylation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, by casein kinase I in vitro and in vivo. J Biol Chem 270: 8772-8778 (1995a)

40 Desdouits F, Siciliano J C, Greengard P and Girault J A: Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein DARPP-32: phosphorylation of Ser-137 by casein kinase I inhibits dephosphorylation of Thr-34 by calcineurin. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 2682-2685 (1995b)

41 Dhillon N and Hoekstra M F: Characterization of two protein kinases from Schizosaccharomyces pombe involved in the regulation of DNA repair. EMBO J 13: 2777-2788 (1994)

42 Didier E S, Rogers L B, Orenstein J M, Baker M D, Vossbrinck C R, Van Gool T, Hartskeerl R, Soave R and Beaudet L M: Characterization of Encephalitozoon (Septata) intestinalis isolates cultured from nasal mucosa and bronchoalveolar lavage fluids of two AIDS patients. J Eukaryot Microbiol 43: 34-43 (1996)

43 Dreyling M, Trumper L, von Schilling C, Rummel M, Holtkamp U, Waldmann A, Wehmeyer J and Freund M: Results of a national consensus workshop: therapeutic algorithm in patients with follicular lymphoma--role of radioimmunotherapy. Ann Hematol 86: 81-87 (2007)

44 Dubois T, Rommel C, Howell S, Steinhussen U, Soneji Y, Morrice N, Moelling K and Aitken A: 14-3-3 is phosphorylated by casein kinase I on residue 233. Phosphorylation at this site in vivo regulates Raf/14-3-3 interaction. J Biol Chem 272: 28882-28888 (1997)

45 Dubois T, Howell S, Zemlickova E and Aitken A: Identification of casein kinase Ialpha interacting protein partners. FEBS Lett 517: 167-171 (2002)

46 Dumaz N, Milne D M and Meek D W: Protein kinase CK1 is a p53-threonine 18 kinase which requires prior phosphorylation of serine 15. FEBS Lett 463: 312-316 (1999)

47 Dupre-Crochet S, Figueroa A, Hogan C, Ferber E C, Bialucha C U, Adams J, Richardson E C and Fujita Y: Casein kinase 1 is a novel negative regulator of E-cadherin-based cell-cell contacts. Mol Cell Biol 27: 3804-3816 (2007)

48 Ebisawa T: Circadian rhythms in the CNS and peripheral clock disorders: human sleep disorders and clock genes. J Pharmacol Sci 103: 150-154 (2007a)

49 Ebisawa T: [Functional polymorphisms in clock genes and circadian rhythm sleep disorders]. Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi 27: 91-94 (2007b)

50 Eder P S, Soong C J and Tao M: Phosphorylation reduces the affinity of protein 4.1 for spectrin. Biochemistry 25: 1764-1770 (1986)

51 Eide E J, Vielhaber E L, Hinz W A and Virshup D M: The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase Iepsilon. J Biol Chem 277: 17248-17254 (2002)

52 Elias L, Li A P and Longmire J: Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent and -independent protein kinase in acute myeloblastic leukemia. Cancer Res 41: 2182-2188 (1981)

53 Faivre S, Delbaldo C, Vera K, Robert C, Lozahic S, Lassau N, Bello C, Deprimo S, Brega N, Massimini G, Armand J P, Scigalla P and Raymond E: Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. J Clin Oncol 24: 25-35 (2006)

54 Faundez V V and Kelly R B: The AP-3 complex required for endosomal synaptic vesicle biogenesis is associated with a casein kinase Ialpha-like isoform. Mol Biol Cell 11: 2591-2604 (2000)

55 Feng Y and Davis N G: Akr1p and the type I casein kinases act prior to the ubiquitination step of yeast endocytosis: Akr1p is required for kinase localization to the plasma membrane. Mol Cell Biol 20: 5350-5359 (2000)

56 Fish K J, Cegielska A, Getman M E, Landes G M and Virshup D M: Isolation and characterization of human casein kinase I epsilon (CKI), a novel member of the CKI gene family. J Biol Chem 270: 14875-14883 (1995)

57 Flajolet M, He G, Heiman M, Lin A, Nairn A C and Greengard P: Regulation of Alzheimer's disease amyloid-beta formation by casein kinase I. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 4159-4164 (2007)

58 Flotow H and Roach P J: Role of acidic residues as substrate determinants for casein kinase I. J Biol Chem 266: 3724-3727 (1991)

59 Fogh J, Wright W C and Loveless J D: Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. J Natl Cancer Inst 58: 209-214 (1977)

60 Frank H G, Gunawan B, Ebeling-Stark I, Schulten H J, Funayama H, Cremer U, Huppertz B, Gaus G, Kaufmann P and Fuzesi L: Cytogenetic and DNA-fingerprint characterization of choriocarcinoma cell lines and a trophoblast/choriocarcinoma cell hybrid. Cancer Genet Cytogenet 116: 16-22 (2000)

61 Fu Z, Chakraborti T, Morse S, Bennett G S and Shaw G: Four casein kinase I isoforms are differentially partitioned between nucleus and cytoplasm. Exp Cell Res 269: 275-286 (2001)

62 Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F and Gallo R: Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. Blood 54: 713-733 (1979)

63 Gao Z H, Metherall J and Virshup D M: Identification of casein kinase I substrates by in vitro expression cloning screening. Biochem Biophys Res Commun 268: 562-566 (2000)

64 Garzia L, D'Angelo A, Amoresano A, Knauer S K, Cirulli C, Campanella C, Stauber R H, Steegborn C, Iolascon A and Zollo M: Phosphorylation of nm23-H1 by CKI induces its complex formation with h-prune and promotes cell motility. Oncogene 27: 1853-1864 (2008)

65 Giamas G, Hirner H, Shoshiashvili L, Grothey A, Gessert S, Kuhl M, Henne-Bruns D, Vorgias C E and Knippschild U: Phosphorylation of CK1delta: identification of Ser370 as the major phosphorylation site targeted by PKA in vitro and in vivo. Biochem J 406: 389-398 (2007)

66 Giamas G, Castellano L, Feng Q, Knippschild U, Jacob J, Thomas R S, Coombes R C, Smith C L, Jiao L R and Stebbing J: CK1delta modulates the transcriptional activity of ERalpha via AIB1 in an estrogen-dependent manner and regulates ERalpha-AIB1 interactions. Nucleic Acids Res 37: 3110-3123 (2009)

67 Gietzen K F and Virshup D M: Identification of inhibitory autophosphorylation sites in casein kinase I epsilon. J Biol Chem 274: 32063-32070 (1999)

68 Gonzales M L, Mellman D L and Anderson R A: CKIalpha is associated with and phosphorylates star-PAP and is also required for expression of select star-PAP target messenger RNAs. J Biol Chem 283: 12665-12673 (2008)

69 Graessmann M, Graessmann A and Westphal H: Microinjected simian virus 40 cRNA is spliced, as evidenced by electron microscopy. J Virol 48: 296-299 (1983)

70 Grasser F A, Scheidtmann K H, Tuazon P T, Traugh J A and Walter G: In vitro phosphorylation of SV40 large T antigen. Virology 165: 13-22 (1988)

71 Graves P R, Haas D W, Hagedorn C H, DePaoli-Roach A A and Roach P J: Molecular cloning, expression, and characterization of a 49-kilodalton casein kinase I isoform from rat testis. J Biol Chem 268: 6394-6401 (1993)

72 Graves P R and Roach P J: Role of COOH-terminal phosphorylation in the regulation of casein kinase I delta. J Biol Chem 270: 21689-21694 (1995)

73 Gross S D, Hoffman D P, Fisette P L, Baas P and Anderson R A: A phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-sensitive casein kinase I alpha associates with synaptic vesicles and phosphorylates a subset of vesicle proteins. J Cell Biol 130: 711-724 (1995)

74 Grozav A G, Chikamori K, Kozuki T, Grabowski D R, Bukowski R M, Willard B, Kinter M, Andersen A H, Ganapathi R and Ganapathi M K: Casein kinase I delta/epsilon phosphorylates topoisomerase IIalpha at serine-1106 and modulates DNA cleavage activity. Nucleic Acids Res 37: 382-392 (2009)

75 Haas D W and Hagedorn C H: Casein kinase I phosphorylates the 25-kDa mRNA cap-binding protein. Arch Biochem Biophys 284: 84-89 (1991)

76 Hanger D P, Byers H L, Wray S, Leung K Y, Saxton M J, Seereeram A, Reynolds C H, Ward M A and Anderton B H: Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. J Biol Chem 282: 23645-23654 (2007)

77 Hanks S K: Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. Genome Biol 4: 111 (2003)

78 Haupt Y, Maya R, Kazaz A and Oren M: Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. Nature 387: 296-299 (1997)

79 He Q, Cha J, Lee H C, Yang Y and Liu Y: CKI and CKII mediate the FREQUENCY-dependent phosphorylation of the WHITE COLLAR complex

to close the Neurospora circadian negative feedback loop. Genes Dev 20: 2552-2565 (2006)

80 Hernandez A R, Klein A M and Kirschner M W: Kinetic responses of beta-catenin specify the sites of Wnt control. Science 338: 1337-1340 (2012)

81 Hicke L, Zanolari B and Riezman H: Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. J Cell Biol 141: 349-358 (1998)

82 Hino S, Michiue T, Asashima M and Kikuchi A: Casein kinase I epsilon enhances the binding of Dvl-1 to Frat-1 and is essential for Wnt-3a-induced accumulation of beta-catenin. J Biol Chem 278: 14066-14073 (2003)

83 Ho Y, Mason S, Kobayashi R, Hoekstra M and Andrews B: Role of the casein kinase I isoform, Hrr25, and the cell cycle-regulatory transcription factor, SBF, in the transcriptional response to DNA damage in Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 581-586 (1997)

84 Huang G, Chen S, Li S, Cha J, Long C, Li L, He Q and Liu Y: Protein kinase A and casein kinases mediate sequential phosphorylation events in the circadian negative feedback loop. Genes Dev 21: 3283-3295 (2007)

85 Huart A S, MacLaine N J, Narayan V and Hupp T R: Exploiting the MDM2-CK1alpha protein-protein interface to develop novel biologics that induce UBL-kinase-modification and inhibit cell growth. PLoS One 7: e43391 (2012)

86 Izeradjene K, Douglas L, Delaney A B and Houghton J A: Casein kinase I attenuates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by regulating the recruitment of fas-associated death domain and procaspase-8 to the death-inducing signaling complex. Cancer Res 64: 8036-8044 (2004)

87 Kalderon D: Similarities between the Hedgehog and Wnt signaling pathways. Trends Cell Biol 12: 523-531 (2002)

88 Kalderon D: The mechanism of hedgehog signal transduction. Biochem Soc Trans 33: 1509-1512 (2005)

89 Kawakami F, Suzuki K and Ohtsuki K: A novel consensus phosphorylation motif in sulfatide- and cholesterol-3-sulfate-binding protein substrates for CK1 in vitro. Biol Pharm Bull 31: 193-200 (2008)

90 Klimczak L J and Cashmore A R: Purification and characterization of casein kinase I from broccoli. Biochem J 293 (Pt 1): 283-288 (1993)

91 Knippschild U, Milne D M, Campbell L E, DeMaggio A J, Christenson E, Hoekstra M F and Meek D W: p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by the delta and epsilon isoforms of casein kinase 1 and enhances the level of casein kinase 1 delta in response to topoisomerase-directed drugs. Oncogene 15: 1727-1736 (1997)

92 Knippschild U, Gocht A, Wolff S, Huber N, Lohler J and Stoter M: The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. Cell Signal 17: 675-689 (2005a)

93 Knippschild U, Wolff S, Giamas G, Brockschmidt C, Wittau M, Wurl P U, Eismann T and Stoter M: The role of the casein kinase 1 (CK1) family in different signaling pathways linked to cancer development. Onkologie 28: 508-514 (2005b)

94 Kostich M, English J, Madison V, Gheyas F, Wang L, Qiu P, Greene J and Laz T M: Human members of the eukaryotic protein kinase family. Genome Biol 3: RESEARCH0043 (2002)

95 Kubbutat M H, Jones S N and Vousden K H: Regulation of p53 stability by Mdm2. Nature 387: 299-303 (1997)

96 Kuret J, Woodgett J R and Cohen P: Multisite phosphorylation of glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Identification of the sites phosphorylated by casein kinase-I. Eur J Biochem 151: 39-48 (1985)

97 Lander E S, Linton L M, Birren B, Nusbaum C, Zody M C, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov J P, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin J C, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston R H, Wilson R K, Hillier L W, McPherson J D, Marra M A, Mardis E R, Fulton L A, Chinwalla A T, Pepin K H, Gish W R, Chissoe

S L, Wendl M C, Delehaunty K D, Miner T L, Delehaunty A, Kramer J B, Cook L L, Fulton R S, Johnson D L, Minx P J, Clifton S W, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng J F, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs R A, Muzny D M, Scherer S E, Bouck J B, Sodergren E J, Worley K C, Rives C M, Gorrell J H, Metzker M L, Naylor S L, Kucherlapati R S, Nelson D L, Weinstock G M, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith D R, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee H M, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis R W, Federspiel N A, Abola A P, Proctor M J, Myers R M, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox D R, Olson M V, Kaul R, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans G A, Athanasiou M, Schultz R, Roe B A, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie W R, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey J A, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown D G, Burge C B, Cerutti L, Chen H C, Church D, Clamp M, Copley R R, Doerks T, Eddy S R, Eichler E E, Furey T S, Galagan J, Gilbert J G, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson L S, Jones T A, Kasif S, Kaspryzk A, Kennedy S, Kent W J, Kitts P, Koonin E V, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe T M, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran J V, Mulder N, Pollara V J, Ponting C P, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit A F, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf Y I, Wolfe K H, Yang S P, Yeh R F, Collins F, Guyer M S, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand K A, Patrinos A, Morgan M J, de Jong P, Catanese J J, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S and Chen Y J: Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409: 860-921 (2001)

98 Lane D P: Cancer. p53, guardian of the genome. Nature 358: 15-16 (1992)

99 Lee E, Salic A and Kirschner M W: Physiological regulation of [beta]-catenin stability by Tcf3 and CK1epsilon. J Cell Biol 154: 983-993 (2001)

100 Leibovitz A, Stinson J C, McCombs W B, 3rd, McCoy C E, Mazur K C and Mabry N D: Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. Cancer Res 36: 4562-4569 (1976)

101 Leyns L, Bouwmeester T, Kim S H, Piccolo S and De Robertis E M: Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. Cell 88: 747-756 (1997)

102 Lin R, Beauparlant P, Makris C, Meloche S and Hiscott J: Phosphorylation of IkappaBalpha in the C-terminal PEST domain by casein kinase II affects intrinsic protein stability. Mol Cell Biol 16: 1401-1409 (1996)

103 Lin R C and Scheller R H: Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. Annu Rev Cell Dev Biol 16: 19-49 (2000)

104 Link W T, Dosemeci A, Floyd C C and Pant H C: Bovine neurofilament-enriched preparations contain kinase activity similar to casein kinase I--neurofilament phosphorylation by casein kinase I (CKI). Neurosci Lett 151: 89-93 (1993)

105 Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg G H, Tan Y, Zhang Z, Lin X and He X: Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. Cell 108: 837-847 (2002)

106 Liu W, Xu Z H, Luo D and Xue H W: Roles of OsCKI1, a rice casein kinase I, in root development and plant hormone sensitivity. Plant J 36: 189-202 (2003)

107 Liu Y and Gray N S: Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. Nat Chem Biol 2: 358-364 (2006)

108 Lolli G, Cozza G, Mazzorana M, Tibaldi E, Cesaro L, Donella-Deana A, Meggio F, Venerando A, Franchin C, Sarno S, Battistutta R and Pinna L A: Inhibition of protein kinase CK2 by flavonoids and tyrphostins. A structural insight. Biochemistry 51: 6097-6107 (2012)

109 Longenecker K L, Roach P J and Hurley T D: Three-dimensional structure of mammalian casein kinase I: molecular basis for phosphate recognition. J Mol Biol 257: 618-631 (1996)

110 Lowrey P L, Shimomura K, Antoch M P, Yamazaki S, Zemenides P D, Ralph M R, Menaker M and Takahashi J S: Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. Science 288: 483-492 (2000)

111 Lu P W, Soong C J and Tao M: Phosphorylation of ankyrin decreases its affinity for spectrin tetramer. J Biol Chem 260: 14958-14964 (1985)

112 Mackie K, Sorkin B C, Nairn A C, Greengard P, Edelman G M and Cunningham B A: Identification of two protein kinases that phosphorylate the neural cell-adhesion molecule, N-CAM. J Neurosci 9: 1883-1896 (1989)

113 MacLaine N J, Oster B, Bundgaard B, Fraser J A, Buckner C, Lazo P A, Meek D W, Hollsberg P and Hupp T R: A central role for CK1 in catalyzing phosphorylation of the p53 transactivation domain at serine 20 after HHV-6B viral infection. J Biol Chem 283: 28563-28573 (2008)

114 Manning W J: Kenneth Mellanby Review Award. The Mellanby Review Award for 2002. Environ Pollut 120: 495 (2002)

115 Marchal C, Dupre S and Urban-Grimal D: Casein kinase I controls a late step in the endocytic trafficking of yeast uracil permease. J Cell Sci 115: 217-226 (2002)

116 Marin O, Meggio F, Sarno S, Andretta M and Pinna L A: Phosphorylation of synthetic fragments of inhibitor-2 of protein phosphatase-1 by casein kinase-1 and -2. Evidence that phosphorylated residues are not strictly required for efficient targeting by casein kinase-1. Eur J Biochem 223: 647-653 (1994)

117 Mashhoon N, DeMaggio A J, Tereshko V, Bergmeier S C, Egli M, Hoekstra M F and Kuret J: Crystal structure of a conformation-selective casein kinase-1 inhibitor. J Biol Chem 275: 20052-20060 (2000)

118 Masuda K, Ono M, Okamoto M, Morikawa W, Otsubo M, Migita T, Tsuneyoshi M, Okuda H, Shuin T, Naito S and Kuwano M: Downregulation of Cap43 gene by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein in human renal cancer cells. Int J Cancer 105: 803-810 (2003)

119 McKay R M, Peters J M and Graff J M: The casein kinase I family in Wnt signaling. Dev Biol 235: 388-396 (2001)

120 Milne D M, Looby P and Meek D W: Catalytic activity of protein kinase CK1 delta (casein kinase 1delta) is essential for its normal subcellular localization. Exp Cell Res 263: 43-54 (2001)

121 Mishra S K, Yang Z, Mazumdar A, Talukder A H, Larose L and Kumar R: Metastatic tumor antigen 1 short form (MTA1s) associates with casein

kinase I-gamma2, an estrogen-responsive kinase. Oncogene 23: 4422-4429 (2004)

122 Miyazaki K, Mesaki M and Ishida N: Nuclear entry mechanism of rat PER2 (rPER2): role of rPER2 in nuclear localization of CRY protein. Mol Cell Biol 21: 6651-6659 (2001a)

123 Miyazaki T, Hashimoto S, Masubuchi S, Honma S and Honma K I: Phase-advance shifts of human circadian pacemaker are accelerated by daytime physical exercise. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 281: R197-205 (2001b)

124 Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O and Clevers H: XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos. Cell 86: 391-399 (1996)

125 Murakami A, Kimura K and Nakano A: The inactive form of a yeast casein kinase I suppresses the secretory defect of the sec12 mutant. Implication of negative regulation by the Hrr25 kinase in the vesicle budding from the endoplasmic reticulum. J Biol Chem 274: 3804-3810 (1999)

126 Nakajo S, Nakaya K and Nakamura Y: Phosphorylation of actin-binding proteins by casein kinases 1 and 2. Biochem Int 15: 321-327 (1987)

127 Okano M, Yokoyama T, Miyanaga T and Ohtsuki K: Activation of C-kinase eta through its cholesterol-3-sulfate-dependent phosphorylation by casein kinase I in vitro. Biol Pharm Bull 27: 109-112 (2004)

128 Oumata N, Bettayeb K, Ferandin Y, Demange L, Lopez-Giral A, Goddard M L, Myrianthopoulos V, Mikros E, Flajolet M, Greengard P, Meijer L and Galons H: Roscovitine-derived, dual-specificity inhibitors of cyclin-dependent kinases and casein kinases 1. J Med Chem 51: 5229-5242 (2008)

129 Pal G, Paraz M T and Kellogg D R: Regulation of Mih1/Cdc25 by protein phosphatase 2A and casein kinase 1. J Cell Biol 180: 931-945 (2008)

130 Panek H R, Stepp J D, Engle H M, Marks K M, Tan P K, Lemmon S K and Robinson L C: Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex. Embo J 16: 4194-4204 (1997)

131 Partch C L, Shields K F, Thompson C L, Selby C P and Sancar A: Posttranslational regulation of the mammalian circadian clock by cryptochrome and protein phosphatase 5. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 10467-10472 (2006)

132 Peifer C, Abadleh M, Bischof J, Hauser D, Schattel V, Hirner H, Knippschild U and Laufer S: 3,4-Diaryl-isoxazoles and -imidazoles as potent dual inhibitors of p38alpha mitogen activated protein kinase and casein kinase 1delta. J Med Chem 52: 7618-7630 (2009)

133 Perez D I, Gil C and Martinez A: Protein kinases CK1 and CK2 as new targets for neurodegenerative diseases. Med Res Rev 31: 924-954 (2011)

134 Peters J M, McKay R M, McKay J P and Graff J M: Casein kinase I transduces Wnt signals. Nature 401: 345-350 (1999)

135 Pinna L A: A historical view of protein kinase CK2. Cell Mol Biol Res 40: 383-390 (1994)

136 Plowman G D, Culouscou J M, Whitney G S, Green J M, Carlton G W, Foy L, Neubauer M G and Shoyab M: Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 1746-1750 (1993)

137 Poulter L, Ang S G, Gibson B W, Williams D H, Holmes C F, Caudwell F B, Pitcher J and Cohen P: Analysis of the in vivo phosphorylation state of rabbit skeletal muscle glycogen synthase by fast-atom-bombardment mass spectrometry. Eur J Biochem 175: 497-510 (1988)

138 Price M A: CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling. Genes Dev 20: 399-410 (2006)

139 Pulgar V, Tapia C, Vignolo P, Santos J, Sunkel C E, Allende C C and Allende J E: The recombinant alpha isoform of protein kinase CK1 from Xenopus laevis can phosphorylate tyrosine in synthetic substrates. Eur J Biochem 242: 519-528 (1996)

140 Quintavalle M, Sambucini S, Summa V, Orsatti L, Talamo F, De Francesco R and Neddermann P: Hepatitis C virus NS5A is a direct substrate of casein kinase I-alpha, a cellular kinase identified by inhibitor affinity chromatography using specific NS5A hyperphosphorylation inhibitors. J Biol Chem 282: 5536-5544 (2007)

141 Regad T, Roth M, Bredenkamp N, Illing N and Papalopulu N: The neural progenitor-specifying activity of FoxG1 is antagonistically regulated by CKI and FGF. Nat Cell Biol 9: 531-540 (2007)

142 Rena G, Bain J, Elliott M and Cohen P: D4476, a cell-permeant inhibitor of CK1, suppresses the site-specific phosphorylation and nuclear exclusion of FOXO1a. EMBO Rep 5: 60-65 (2004)

143 Reppert S M and Weaver D R: Coordination of circadian timing in mammals. Nature 418: 935-941 (2002)

144 Reya T and Clevers H: Wnt signalling in stem cells and cancer. Nature 434: 843-850 (2005)

145 Rivers A, Gietzen K F, Vielhaber E and Virshup D M: Regulation of casein kinase I epsilon and casein kinase I delta by an in vivo futile phosphorylation cycle. J Biol Chem 273: 15980-15984 (1998)

146 Robinson L C, Menold M M, Garrett S and Culbertson M R: Casein kinase I-like protein kinases encoded by YCK1 and YCK2 are required for yeast morphogenesis. Mol Cell Biol 13: 2870-2881 (1993)

147 Rodrigues N R, Rowan A, Smith M E, Kerr I B, Bodmer W F, Gannon J V and Lane D P: p53 mutations in colorectal cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 7555-7559 (1990)

148 Rodriguez N, Yang J, Hasselblatt K, Liu S, Zhou Y, Rauh-Hain J A, Ng S K, Choi P W, Fong W P, Agar N Y, Welch W R, Berkowitz R S and Ng S W: Casein kinase I epsilon interacts with mitochondrial proteins for the growth and survival of human ovarian cancer cells. EMBO Mol Med 4: 952-963 (2012)

149 Roof D M, Meluh P B and Rose M D: Kinesin-related proteins required for assembly of the mitotic spindle. J Cell Biol 118: 95-108 (1992)

150 Rowles J, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J and Cobb M H: Purification of casein kinase I and isolation of cDNAs encoding multiple casein kinase I-like enzymes. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 9548-9552 (1991)

151 Rubin G M, Yandell M D, Wortman J R, Gabor Miklos G L, Nelson C R, Hariharan I K, Fortini M E, Li P W, Apweiler R, Fleischmann W, Cherry J M, Henikoff S, Skupski M P, Misra S, Ashburner M, Birney E, Boguski M S, Brody T, Brokstein P, Celniker S E, Chervitz S A, Coates D, Cravchik A, Gabrielian A, Galle R F, Gelbart W M, George R A, Goldstein L S, Gong F,

Guan P, Harris N L, Hay B A, Hoskins R A, Li J, Li Z, Hynes R O, Jones S J, Kuehl P M, Lemaitre B, Littleton J T, Morrison D K, Mungall C, O'Farrell P H, Pickeral O K, Shue C, Vosshall L B, Zhang J, Zhao Q, Zheng X H and Lewis S: Comparative genomics of the eukaryotes. Science 287: 2204-2215 (2000)

152 Rubinfeld B, Tice D A and Polakis P: Axin-dependent phosphorylation of the adenomatous polyposis coli protein mediated by casein kinase 1epsilon. J Biol Chem 276: 39037-39045 (2001)

153 Sakanaka C: Phosphorylation and regulation of beta-catenin by casein kinase I epsilon. J Biochem (Tokyo) 132: 697-703 (2002)

154 Santos J A, Logarinho E, Tapia C, Allende C C, Allende J E and Sunkel C E: The casein kinase 1 alpha gene of Drosophila melanogaster is developmentally regulated and the kinase activity of the protein induced by DNA damage. J Cell Sci 109 (Pt 7): 1847-1856 (1996)

155 Schroy P C, 3rd, Brown-Shimer S, Kim K, Johnson K A, Murnane M J, Yang S, O'Brien M J, Carney W P and Kupchik H Z: Detection of p21ras mutations in colorectal adenomas and carcinomas by enzyme-linked immunosorbent assay. Cancer 76: 201-209 (1995)

156 Shanware N P, Williams L M, Bowler M J and Tibbetts R S: Non-specific in vivo inhibition of CK1 by the pyridinyl imidazole p38 inhibitors SB 203580 and SB 202190. BMB Rep 42: 142-147 (2009)

157 Shuang R, Zhang L, Fletcher A, Groblewski G E, Pevsner J and Stuenkel E L: Regulation of Munc-18/syntaxin 1A interaction by cyclin-dependent kinase 5 in nerve endings. J Biol Chem 273: 4957-4966 (1998)

158 Singh T J, Akatsuka A, Huang K P, Sharma R K, Tam S W and Wang J H: A multifunctional cyclic nucleotide- and Ca2+-independent protein kinase from rabbit skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun 107: 676-683 (1982)

159 Singh T J, Grundke-Iqbal I and Iqbal K: Phosphorylation of tau protein by casein kinase-1 converts it to an abnormal Alzheimer-like state. J Neurochem 64: 1420-1423 (1995)

160 Smelkinson M G, Zhou Q and Kalderon D: Regulation of Ci-SCFSlimb binding, Ci proteolysis, and hedgehog pathway activity by Ci phosphorylation. Dev Cell 13: 481-495 (2007)

161 Soong C J, Lu P W and Tao M: Analysis of band 3 cytoplasmic domain phosphorylation and association with ankyrin. Arch Biochem Biophys 254: 509-517 (1987)

162 Soule H D, Vazguez J, Long A, Albert S and Brennan M: A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. J Natl Cancer Inst 51: 1409-1416 (1973)

163 Stoter M, Bamberger A M, Aslan B, Kurth M, Speidel D, Loning T, Frank H G, Kaufmann P, Lohler J, Henne-Bruns D, Deppert W and Knippschild U: Inhibition of casein kinase I delta alters mitotic spindle formation and induces apoptosis in trophoblast cells. Oncogene 24: 7964-7975 (2005)

164 Sudha G, Yamunadevi S, Tyagi N, Das S and Srinivasan N: Structural and molecular basis of interaction of HCV non-structural protein 5A with human casein kinase 1alpha and PKR. BMC Struct Biol 12: 28 (2012)

165 Sugarman B J, Aggarwal B B, Hass P E, Figari I S, Palladino M A, Jr. and Shepard H M: Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. Science 230: 943-945 (1985)

166 Swiatek W, Tsai I C, Klimowski L, Pepler A, Barnette J, Yost H J and Virshup D M: Regulation of casein kinase I epsilon activity by Wnt signaling. J Biol Chem 279: 13011-13017 (2004)

167 Szabo P, Dam T K, Smetana K, Jr., Dvorankova B, Kubler D, Brewer C F and Gabius H J: Phosphorylated human lectin galectin-3: analysis of ligand binding by histochemical monitoring of normal/malignant squamous epithelia and by isothermal titration calorimetry. Anat Histol Embryol 38: 68-75 (2009)

168 Taipale J and Beachy P A: The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. Nature 411: 349-354 (2001)

169 Taylor S S, Knighton D R, Zheng J, Ten Eyck L F and Sowadski J M: Structural framework for the protein kinase family. Annu Rev Cell Biol 8: 429-462 (1992)

170 Tillement V, Lajoie-Mazenc I, Casanova A, Froment C, Penary M, Tovar D, Marquez R, Monsarrat B, Favre G and Pradines A: Phosphorylation of RhoB by CK1 impedes actin stress fiber organization and epidermal growth factor receptor stabilization. Exp Cell Res 314: 2811-2821 (2008)

171 Tipper J P, Bacon G W and Witters L A: Phosphorylation of acetyl-coenzyme A carboxylase by casein kinase I and casein kinase II. Arch Biochem Biophys 227: 386-396 (1983)

172 Tobin A B, Totty N F, Sterlin A E and Nahorski S R: Stimulus-dependent phosphorylation of G-protein-coupled receptors by casein kinase 1alpha. J Biol Chem 272: 20844-20849 (1997)

173 Trainer D L, Kline T, Hensler G, Greig R and Poste G: Clonal analysis of the malignant properties of B16 melanoma cells treated with the DNA hypomethylating agent 5-azacytidine. Clin Exp Metastasis 6: 185-200 (1988)

174 Tuazon P T and Traugh J A: Casein kinase I and II--multipotential serine protein kinases: structure, function, and regulation. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res 23: 123-164 (1991)

175 Umar S, Wang Y, Morris A P and Sellin J H: Dual alterations in casein kinase I-epsilon and GSK-3beta modulate beta-catenin stability in hyperproliferating colonic epithelia. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 292: G599-607 (2007)

176 Umphress J L, Tuazon P T, Chen C J and Traugh J A: Determinants on simian virus 40 large T antigen are important for recognition and phosphorylation by casein kinase I. Eur J Biochem 203: 239-243 (1992)

177 van Noort M, Meeldijk J, van der Zee R, Destree O and Clevers H: Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin. J Biol Chem 277: 17901-17905 (2002)

178 Vancura A, Sessler A, Leichus B and Kuret J: A prenylation motif is required for plasma membrane localization and biochemical function of casein kinase I in budding yeast. J Biol Chem 269: 19271-19278 (1994)

179 Ventura J J and Nebreda A R: Protein kinases and phosphatases as therapeutic targets in cancer. Clin Transl Oncol 8: 153-160 (2006)

180 Vielhaber E, Eide E, Rivers A, Gao Z H and Virshup D M: Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. Mol Cell Biol 20: 4888-4899 (2000)

181 Vielhaber E and Virshup D M: Casein kinase I: from obscurity to center stage. IUBMB Life 51: 73-78 (2001)

182 von Blume J, Knippschild U, Dequiedt F, Giamas G, Beck A, Auer A, Van Lint J, Adler G and Seufferlein T: Phosphorylation at Ser244 by CK1 determines nuclear localization and substrate targeting of PKD2. EMBO J 26: 4619-4633 (2007)

183 Walczak C E, Anderson R A and Nelson D L: Identification of a family of casein kinases in Paramecium: biochemical characterization and cellular localization. Biochem J 296 (Pt 3): 729-735 (1993)

184 Walter J, Grunberg J, Schindzielorz A and Haass C: Proteolytic fragments of the Alzheimer's disease associated presenilins-1 and -2 are phosphorylated in vivo by distinct cellular mechanisms. Biochemistry 37: 5961-5967 (1998)

185 Walter J, Fluhrer R, Hartung B, Willem M, Kaether C, Capell A, Lammich S, Multhaup G and Haass C: Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. J Biol Chem 276: 14634-14641 (2001)

186 Walton K M, Fisher K, Rubitski D, Marconi M, Meng Q J, Sladek M, Adams J, Bass M, Chandrasekaran R, Butler T, Griffor M, Rajamohan F, Serpa M, Chen Y, Claffey M, Hastings M, Loudon A, Maywood E, Ohren J, Doran A and Wager T T: Selective inhibition of casein kinase 1 epsilon minimally alters circadian clock period. J Pharmacol Exp Ther 330: 430-439 (2009)

187 Wang P C, Vancura A, Mitcheson T G and Kuret J: Two genes in Saccharomyces cerevisiae encode a membrane-bound form of casein kinase-1. Mol Biol Cell 3: 275-286 (1992)

188 Wang X, Hoekstra M F, DeMaggio A J, Dhillon N, Vancura A, Kuret J, Johnston G C and Singer R A: Prenylated isoforms of yeast casein kinase I, including the novel Yck3p, suppress the gcs1 blockage of cell proliferation from stationary phase. Mol Cell Biol 16: 5375-5385 (1996)

189 Wang Y, Sun X, Wu J, Xu B E, Gu C, Wang H, Wang X, Tan F, Peng X, Qiang B, Yuan J and Luo Y: Casein kinase 1alpha interacts with RIP1 and regulates NF-kappaB activation. Biochemistry 47: 441-448 (2008)

190 Winter M, Milne D, Dias S, Kulikov R, Knippschild U, Blattner C and Meek D: Protein kinase CK1delta phosphorylates key sites in the acidic domain of murine double-minute clone 2 protein (MDM2) that regulate p53 turnover. Biochemistry 43: 16356-16364 (2004)

191 Wolff S, Stoter M, Giamas G, Piesche M, Henne-Bruns D, Banting G and Knippschild U: Casein kinase 1 delta (CK1delta) interacts with the SNARE associated protein snapin. FEBS Lett 580: 6477-6484 (2006)

192 Xu S, Wong C C, Tong E H, Chung S S, Yates J R, 3rd, Yin Y and Ko B C: Phosphorylation by casein kinase 1 regulates tonicity-induced osmotic response element-binding protein/tonicity enhancer-binding protein nucleocytoplasmic trafficking. J Biol Chem 283: 17624-17634 (2008)

193 Xu Y, Padiath Q S, Shapiro R E, Jones C R, Wu S C, Saigoh N, Saigoh K, Ptacek L J and Fu Y H: Functional consequences of a CKIdelta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. Nature 434: 640-644 (2005)

194 Yanagawa S, Matsuda Y, Lee J S, Matsubayashi H, Sese S, Kadowaki T and Ishimoto A: Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in Drosophila. EMBO J 21: 1733-1742 (2002)

195 Yang L L, Li G B, Yan H X, Sun Q Z, Ma S, Ji P, Wang Z R, Feng S, Zou J and Yang S Y: Discovery of N6-phenyl-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidine-3,6-diamine derivatives as novel CK1 inhibitors using common-feature pharmacophore model based virtual screening and hit-to-lead optimization. Eur J Med Chem 56: 30-38 (2012)

196 Yasojima K, Kuret J, DeMaggio A J, McGeer E and McGeer P L: Casein kinase 1 delta mRNA is upregulated in Alzheimer disease brain. Brain Res 865: 116-120 (2000)

197 Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J and He X: A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. Nature 438: 873-877 (2005)

198 Zhai L, Graves P R, Robinson L C, Italiano M, Culbertson M R, Rowles J, Cobb M H, DePaoli-Roach A A and Roach P J: Casein kinase I gamma subfamily. Molecular cloning, expression, and characterization of three mammalian isoforms and complementation of defects in the Saccharomyces cerevisiae YCK genes. J Biol Chem 270: 12717-12724 (1995)

199 Zhang J, Yang P L and Gray N S: Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. Nat Rev Cancer 9: 28-39 (2009)

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Domänenstruktur der menschlichen CK1δ-Isoform.

Abb. 2 Einfluss der Compounds 25 – 44 auf die Enzymaktivitäten von GST-CK1δ, CK1δKD und CK1ε.

Abb. 3 IC_{50}-Konzentrationen der getesteten Verbindungen 8, 25, 29, 31 und 34 für CK1δ, CK1δKD und CK1ε.

Abb. 4 IC_{50}-Konzentrationen der getesteten Verbindungen 38, 40, 42 und 44 für CK1δ, CK1δKD und CK1ε.

Abb. 5 EC_{50}-Konzentrationen ausgewählter Inhibitoren für die Zelllinien HT29, SW480 und SW620.

Abb. 6 EC_{50}-Konzentrationen ausgewählter Inhibitoren für die Zelllinien SV52, Rev2, MCF-7 und AC1-M88.

Abb. 7 Einfluss der Compounds 8, 25, 29, 38 und 44 auf die Zellzyklusverteilung der Tumorzelllinie SW480.

Abb. 8 Einfluss der Inhibitoren 8, 25 und 38 auf die Zellzyklusverteilung der Tumorzelllinie MCF-7 und Einfluss von Compound 38 auf die Zellzyklusverteilung der Tumorzelllinie Rev2.

Abb. 9 Einfluss von Compound 38 auf die Zellzyklusverteilung der Tumorzelllinie HL60 nach 24 h und nach 48 h.

Abb. 10 Darstellung des Phosphateinbaus durch CK1δ in GST-$p53^{1-64}$ bei zunehmender Konzentration des jeweiligen Inhibitors.

Abb. 11 Darstellung des Phosphateinbaus durch CK1δKD in GST-$p53^{1-64}$ bei zunehmender Konzentration des jeweiligen Inhibitors.

Abb. 12 Darstellung des Phosphateinbaus durch CK1ε in GST-$p53^{1-64}$ bei zunehmender Konzentration des jeweiligen Inhibitors.

Abb. 13 Einfluss von Compound 38 auf die Zellzyklusverteilung der Tumorzelllinie HL60.

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 CK1-Substrate und ihre physiologischen Funktionen.

Tab. 2 Zusammenstellung einiger CK1- Inhibitoren.

Tab. 3 Beschreibung des verwendeten Kulturmediums für die verschiedenen Zelllinien .

Tab. 4 Zusammensetzung der Reaktionsansätze mit der jeweiligen Inhibitorverdünnung für einen Ansatz à 20 µl.

Tab. 5 Inhibitorverdünnungsreihe.

Tab. 6 Übersicht der ausgewählten Verbindungen.

Tab. 7 Vergleich der IC_{50}-Konzentrationen der getesteten Verbindungen für die CK1 Isoformen CK1δ, CK1δKD und CK1ε.

Tab. 8 Zusammenstellung der EC_{50}-Konzentrationen der ausgewählten Inhibitoren für die verschiedenen Zelllinien.

9. Anhang

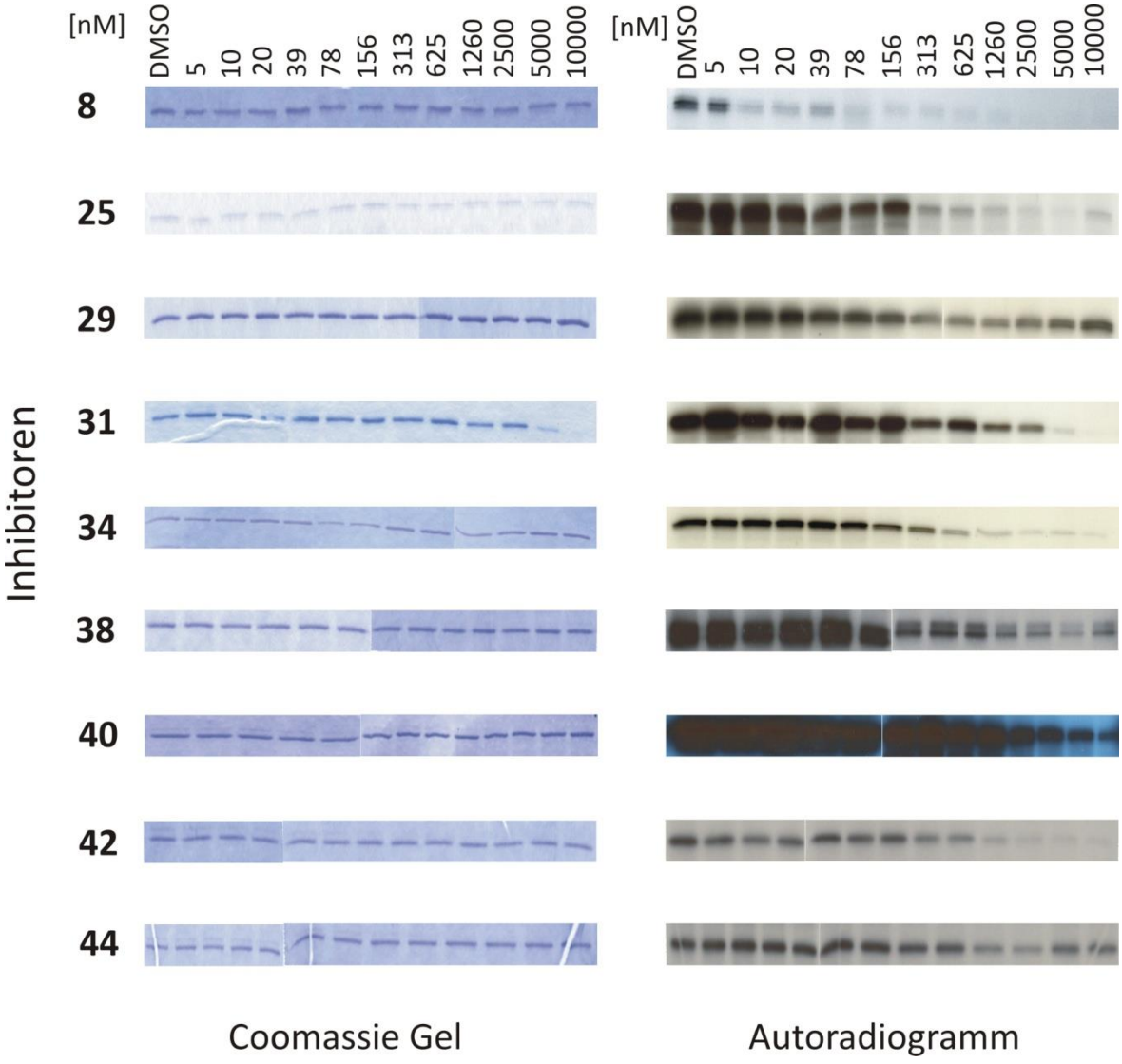


Abb. 10: Darstellung des Phosphateinbaus durch CK1δ in GST-p53$^{1-64}$ bei zunehmender Konzentration des jeweiligen Inhibitors.

Mit Hilfe von *in vitro* Kinaseassays konnten die IC_{50}-Konzentrationen der jeweiligen Substanzen ermittelt werden. Als Kontrolllösung wurde DMSO verwendet. Die phosphorylierten Substrate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Gele anschließend mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Der Phosphateinbau konnte durch Verwendung von radioaktiv markiertem ATP im Autoradiogramm dargestellt werden, die Exposition gegenüber dem Röntgenfilm erfolgte jeweils über eine Nacht (ca. 17 h). In der Abbildung links sind die Coomassie Gele dargestellt, rechts die Autoradiogramme (links benannt). Im Bildrand oben ist die Konzentration (von 5 nM bis 10 µM) der einzelnen Banden ablesbar. Je schwächer die Färbung/Schwärzung des Films, desto effektiver wurde die Kinase durch die entsprechende Substanz inhibiert.
Abkürzungen: DMSO: Dimethylsulfoxid; nM: nanomolar

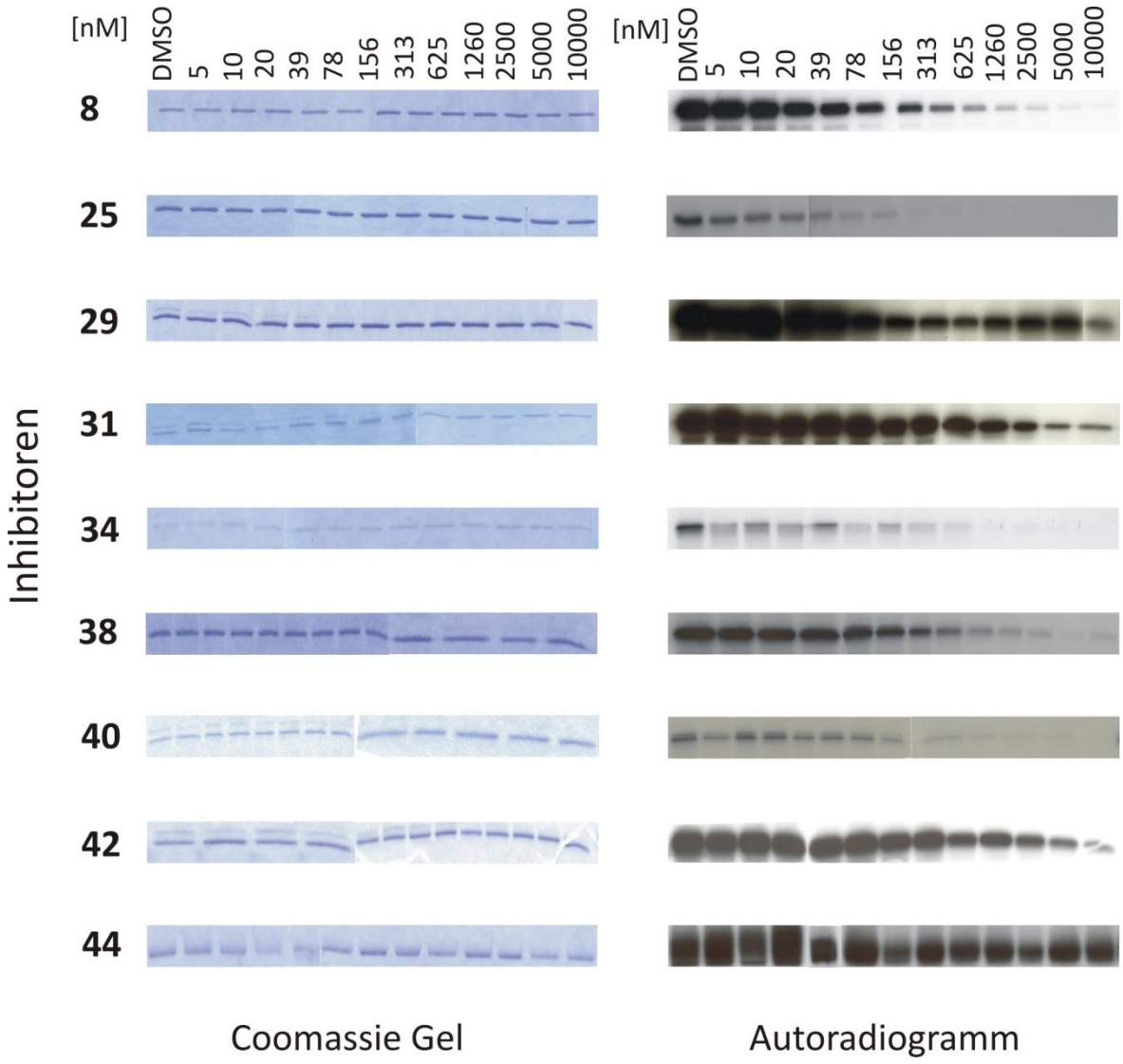


Abb. 11: Darstellung des Phosphateinbaus durch CK1δKD in GST-p53$^{1-64}$ bei zunehmender Konzentration des jeweiligen Inhibitors.

Mit Hilfe von *in vitro* Kinaseassays konnten die IC_{50}-Konzentrationen der jeweiligen Substanzen ermittelt werden. Als Kontrollsubstanz wurde DMSO verwendet. Die phosphorylierten Substrate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Gele anschließend mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Der Phosphateinbau konnte durch Verwendung von radioaktiv markiertem ATP im Autoradiogramm dargestellt werden, die Exposition gegenüber dem Röntgenfilm erfolgte jeweils über eine Nacht (ca. 17 h). In der Abbildung links sind die Coomassie Gele dargestellt, rechts die Autoradiogramme (links benannt). Im Bildrand oben ist die Konzentration (von 5 nM bis 10 µM) der einzelnen Banden ablesbar. Je schwächer die Färbung/Schwärzung des Films, desto effektiver wurde die Kinase durch die entsprechende Substanz inhibiert.
Abkürzungen: DMSO: Dimethylsulfoxid; nM: nanomolar

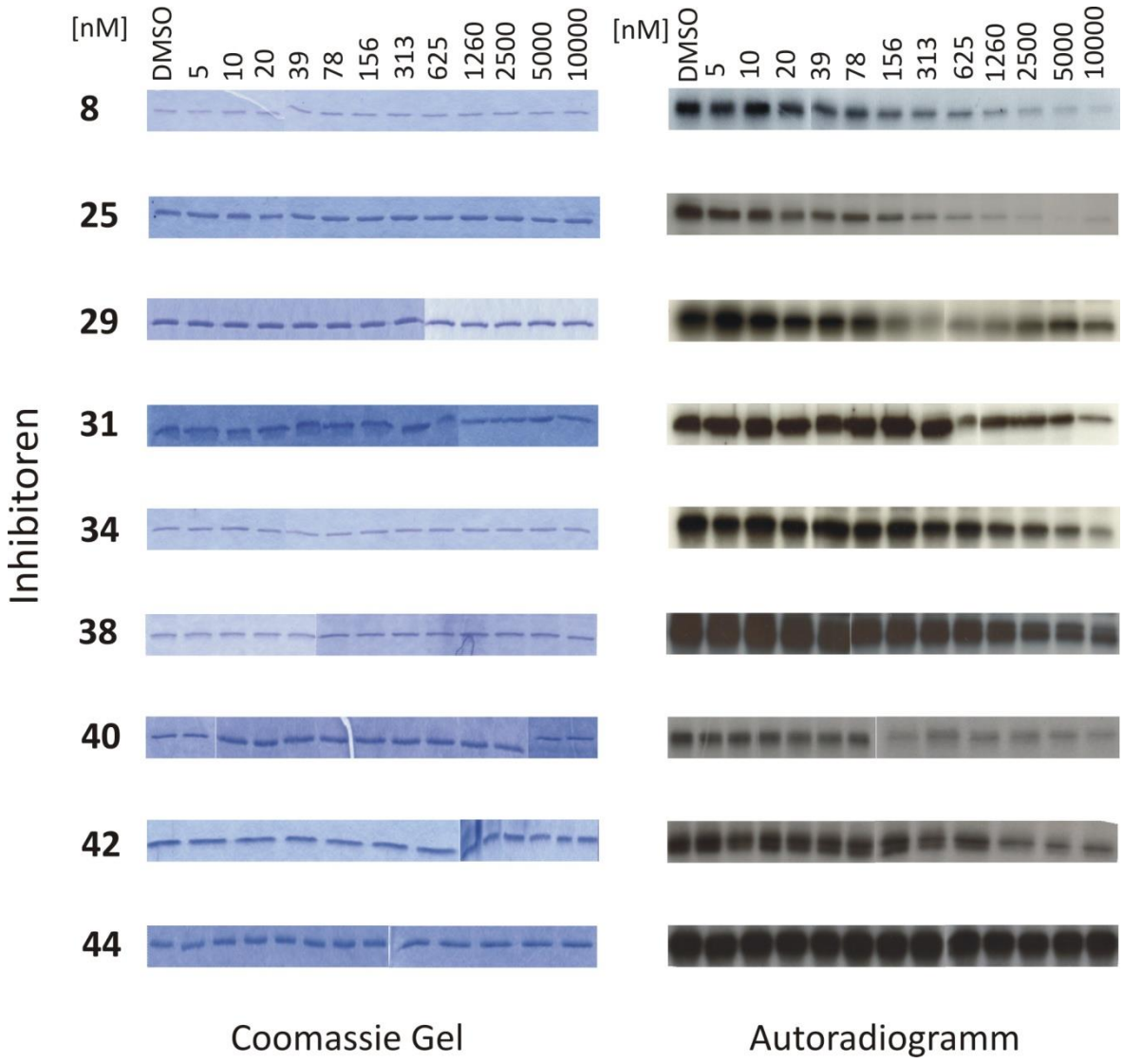


Abb. 12: Darstellung des Phosphateinbaus durch CK1ε in GST-p53$^{1-64}$ bei zunehmender Konzentration des jeweiligen Inhibitors.

Mit Hilfe von *in vitro* Kinaseassays konnten die IC_{50}-Konzentrationen der jeweiligen Substanzen ermittelt werden. Als Kontrolllösung wurde DMSO verwendet. Die phosphorylierten Substrate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Gele anschließend mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Der Phosphateinbau konnte durch Verwendung von radioaktiv markiertem ATP im Autoradiogramm dargestellt werden, die Exposition gegenüber dem Röntgenfilm erfolgte jeweils über eine Nacht (ca. 17 h). In der Abbildung links sind die Coomassie Gele dargestellt, rechts die Autoradiogramme (links benannt). Im Bildrand oben ist die Konzentration (von 5 nM bis 10 µM) der einzelnen Banden ablesbar. Je schwächer die Färbung/Schwärzung des Films, desto effektiver wurde die Kinase durch die entsprechende Substanz inhibiert.
Abkürzungen: DMSO: Dimethylsulfoxid; nM: nanomolar

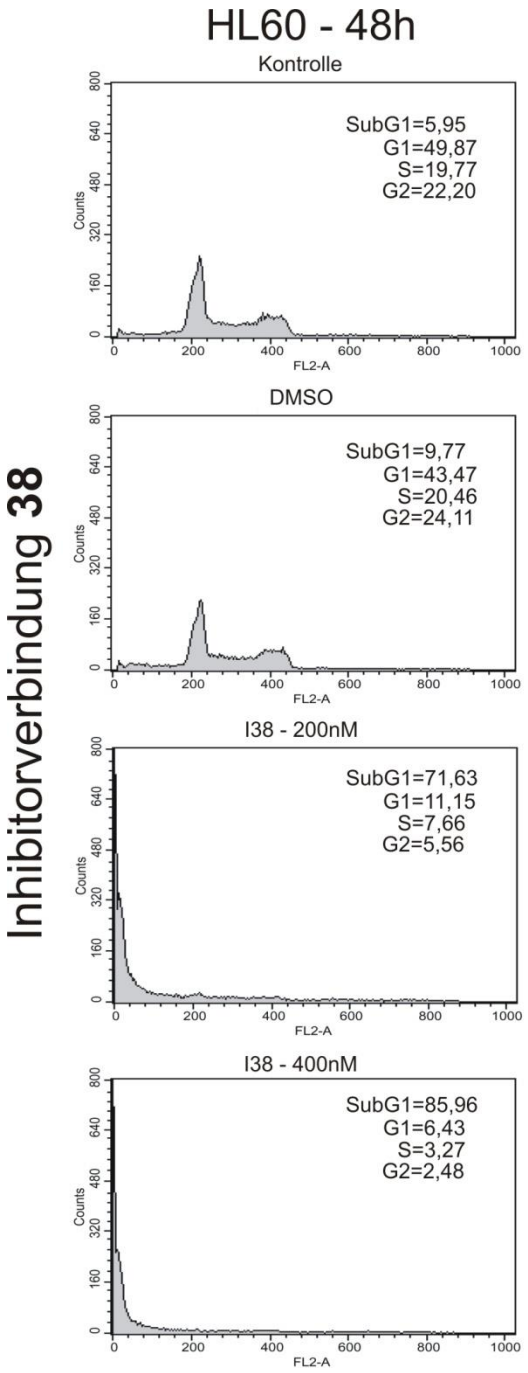


Abb. 13: Einfluss von Compound 38 auf die Zellzyklusverteilung der Tumorzelllinie HL60.
HL60 Zellen wurden für die FACS-Analysen für 48 h mit dem Inhibitor 38 sowie DMSO behandelt. Die Kontrollprobe enthält lediglich das Zellmedium. Die Zellen wurden nach 48 h fixiert, gefärbt (Propidiumiodid), im Durchflusszytometer analysiert und anschließend mittels der Software Cell Quest ausgewertet. Die Angaben zu den einzelnen Fraktionen SubG1, G1, S und G2 sind in % dargestellt.
Abkürzungen: SubG1: Fraktion toter Zellen; G1: postmitotische Phase; S: Synthesephase; G2: prämitotische Phase; DMSO: Dimethylsulfoxid; FACS: flourescence activated cell sorting; µM: mikromolar

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Teile dieser Doktorarbeit bzw. einzelne Ergebnisse wurden in dem unten genannten Fachartikel publiziert. Die Veröffentlichung der Ergebnisse im Rahmen dieser Dissertation wurde durch den Verlag genehmigt. [Reprinted with permission from (Richter J, Bischof J, Zaja M, Kohlhof H, Othersen O, Vitt D, Alscher V, Pospiech I, García-Reyes B, Berg S, Leban J and Knippschild U: Difluoro-dioxolo-benzoimidazol-benzamides As Potent Inhibitors of CK1δ and ε with Nanomolar Inhibitory Activity on Cancer Cell Proliferation. J Med Chem 57 (19): pp 7933-7946 (2014)). Copyright 2014 American Chemical Society. http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm500600b].