

**Untersuchungen an neuartigen  
Serin/Threonin-Kinase-Inhibitoren für die *in vivo*  
Visualisierung von Signaltransduktionswegen  
des quergestreiften Muskels**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
des Fachbereichs Chemie der Universität Dortmund

angefertigt am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund

eingereicht von

**Dipl.-Chem. Gereon Franzen**  
aus Olfen

Dortmund, im Mai 2003

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich diese Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund, den

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom November 1999 bis Mai 2003 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in der Abteilung Physikalische Biochemie unter der Anleitung von Prof. Dr. M. Gautel und Prof. Dr. R. S. Goody durchgeführt.

**1. Gutachter: Prof. Dr. R. S. Goody**

**2. Gutachter: Prof. Dr. W. Kreiser**



**Meiner Familie**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Die Struktur quergestreifter Muskeln .....	1
1.2	Das Sarkomer - die kontraktile Einheit quergestreifter Muskeln .....	3
1.3	Titin - ein molekularer Bauplan für das Sarkomer .....	7
1.4	Die Titin-Kinase .....	11
1.5	Protein-Kinase-Inhibitoren .....	14
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung und Zielsetzung .....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>22</b>
3.1	<b>Synthese eines fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitors für PKA... 22</b>	
3.1.1	Design eines bifunktionellen Inhibitors für PKA.....	23
3.1.2	Synthese von P <sup>3</sup> -(N <sup>ε</sup> -(N-acyl-O-methyl)-lysyl)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>1</b> ....	24
3.1.3	Synthese von P <sup>3</sup> -(N <sup>ε</sup> -(N-FITC-[K5, V6, A7]-CONH <sub>2</sub> -Kemptide)-lysyl)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>2</b> und P <sup>3</sup> -(N <sup>ε</sup> -(N-TRITC-[K5, V6, A7]-CONH <sub>2</sub> -Kemptide)-lysyl)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>3</b> .....	25
3.2	<b>Untersuchung der Inhibition von PKA durch die fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitoren .....</b>	<b>29</b>
3.2.1	Verdrängungsexperiment mit P <sup>3</sup> -(N <sup>ε</sup> -(N-acyl-O-methyl)-lysyl)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>1</b> und N-Fmoc-[K5, V6, A7]-CONH <sub>2</sub> -Kemptide <b>4</b> .....	30
3.2.2	Verdrängungsexperiment mit P <sup>3</sup> -(N <sup>ε</sup> -(N-FITC-[K5, V6, A7]-CONH <sub>2</sub> -Kemptide)-lysyl)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>2</b> und P <sup>3</sup> -(N <sup>ε</sup> -(N-TRITC-[K5, V6, A7]-CONH <sub>2</sub> -Kemptide)-lysyl)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>3</b> .....	32
3.3	<b>Synthese eines neuen fluoreszenzmarkierten ATP-Analogons .....</b>	<b>33</b>
3.3.1	Syntheseversuche der P <sup>3</sup> -(N-FITC-aminoalkyl-amino)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphate <b>10</b> , <b>11</b> und <b>12</b> .....	34
3.3.2	Synthese von P <sup>3</sup> -(4-(N-FITC-Aminoethyl)-phenylamino)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>19</b> .....	38
3.3.3	Verdrängungsexperiment mit P <sup>3</sup> -(4-(N-FITC-Aminoethyl)-phenylamino)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>19</b> .....	41
3.4	<b>Transfektion von P<sup>3</sup>-(4-(N-FITC-Aminoethyl)-phenylamino)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat <b>19</b> und P<sup>3</sup>-(N<sup>ε</sup>-(N-FITC-[K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide)-lysyl)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat <b>2</b> mittels Streptolysin-O .....</b>	<b>42</b>
3.4.1	Transfektion von P <sup>3</sup> -(4-(N-FITC-Aminoethyl)-phenylamino)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>19</b> in HeLa-Zellen .....	43

3.4.2	Transfektion von P <sup>3</sup> -(N <sup>ε</sup> -(N-FITC-[K5, V6, A7]-CONH <sub>2</sub> -Kemptide)-lysyl)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>2</b> in Hela-Zellen.....	44
3.4.3	Transfektion von P <sup>3</sup> -(N <sup>ε</sup> -(N-FITC-[K5, V6, A7]-CONH <sub>2</sub> -Kemptide)-lysyl)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>2</b> in Herzmuskelzellen aus neonatalen Ratten.....	46
<b>3.5</b>	<b>Synthese fluoreszenzmarkierter bifunktioneller Inhibitoren für MLCK aus Skelettmuskel und glatter Muskulatur.....</b>	<b>47</b>
3.5.1	Design fluoreszenzmarkierter bifunktioneller Inhibitoren für skmMLCK und smMLCK (1) .....	48
3.5.2	Synthese von β-Iodethylamin <b>17</b> .....	51
3.5.3	Synthese von P <sup>3</sup> -(β-Iodethylamino)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>20</b> .....	51
3.5.4	Synthese von [C14, A20]skm-rMLC(3-19) <b>21</b> .....	52
3.5.5	Syntheseversuch von P <sup>3</sup> -([C14, A20]skm-rMLC(3-19)-cysteyl-S-ethylamino)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>22</b> .....	52
3.5.6	Design fluoreszenzmarkierter bifunktioneller Inhibitoren für skmMLCK und smMLCK (2) .....	54
3.5.7	Synthese von [Bromaceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19) <b>23</b> .....	57
3.5.8	Synthese von [Bromaceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24) <b>24</b> .....	58
3.5.9	Synthese von P <sup>3</sup> -Thio-(S-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19))-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>25</b> .....	58
3.5.10	Synthese von P <sup>3</sup> -Thio-(S-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24))-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>26</b> .....	59
3.5.11	Synthese von P <sup>3</sup> -Thio-(S-(N-FITC-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19)))-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>27</b> .....	60
3.5.12	Synthese von P <sup>3</sup> -Thio-(S-(N-FITC-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24)))-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>28</b> .....	61
3.5.13	Synthese von [A20]skm-rMLC(1-19) <b>29</b> .....	61
3.5.14	Synthese von [A14, A20]skm-rMLC(1-19) <b>30</b> .....	62
<b>3.6</b>	<b>Untersuchung der Inhibition von skmMLCK durch die fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitoren .....</b>	<b>63</b>
3.6.1	Verdrängungsexperiment mit P <sup>3</sup> -Thio-(S-(N-FITC-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19)))-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>27</b> .....	63
3.6.2	Verdrängungsexperiment mit P <sup>3</sup> -Thio-(S-(N-FITC-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24)))-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>28</b> .....	65
3.6.3	Verdrängungsexperiment mit [A20]skm-rMLC(1-19) <b>29</b> und [A14, A20]skm-rMLC(1-19) <b>30</b> .....	66
<b>3.7</b>	<b>Kinetische Untersuchung der Inhibition von skmMLCK .....</b>	<b>68</b>
3.7.1	Synthese von [Bromaceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(2-19) <b>23a</b> .....	68

3.7.2	Synthese von P <sup>3</sup> -Thio-(S-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(2-19))-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>25a</b> .....	69
3.7.3	Ermittlung des K <sub>m</sub> für die Phosphorylierung von rMLC durch skmMLCK.....	70
3.7.4	Ermittlung des K <sub>i</sub> für die Inhibition von skmMLCK durch den bifunktionellen skmMLCK-Inhibitor <b>25a</b> .....	70
<b>3.8</b>	<b>Untersuchung der Lokalisation von fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitoren für skmMLCK und smMLCK in H9C2-Zellen</b> .....	<b>75</b>
3.8.1	Synthese von [A25]sm-rMLC(7-24) <b>31</b> .....	76
3.8.2	Synthese von N-Cy5-[A25]sm-rMLC(7-24) <b>32</b> .....	77
3.8.3	Lokalisation von N-Cy5-[A25]sm-rMLC(7-24) <b>32</b> in H9C2-Zellen.....	78
3.8.4	Synthese von P <sup>3</sup> -Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19)))-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>33</b> .....	81
3.8.5	Synthese von P <sup>3</sup> -Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24)))-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>34</b> .....	82
3.8.6	Lokalisation von P <sup>3</sup> -Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24)))-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>34</b> und P <sup>3</sup> -Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19)))-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>33</b> in H9C2-Zellen .....	83
3.8.7	Lokalisation von P <sup>3</sup> -Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24)))-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>34</b> in H9C2-Zellen in Gegenwart von Ca/CaM.....	86
<b>3.9</b>	<b>Synthese eines fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitors für die Titin-Kinase</b> .....	<b>88</b>
3.9.1	Design eines fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitors für die Titin-Kinase .....	88
3.9.2	Synthese von [Bromaceto-Dpr156]Telethonin(143-163) <b>35</b> .....	89
3.9.3	Synthese von P <sup>3</sup> -Thio-(S-[aceto-Dpr156]Telethonin(143-163))-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>36</b> .....	90
3.9.4	Synthese von P <sup>3</sup> -Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr156]Telethonin(143-163)))-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>37</b> .....	90
<b>3.10</b>	<b>Versuche zur Lokalisation der Cy5-markierten Inhibitoren für skmMLCK und smMLCK in lebenden Fibroblasten</b> .....	<b>92</b>
3.10.1	Synthese von P <sup>3</sup> -(4-(N-Cy5-Aminoethyl)-phenylamino)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>38</b> .....	93
3.10.2	Mikroinjektion .....	93
<b>3.11</b>	<b>Verwendung bifunktioneller Kinase-Inhibitoren für die Affinitätschromatographie</b> .....	<b>98</b>
3.11.1	Herstellung der Affinitätsmatrixes.....	99

3.11.2	Versuche zur Identifizierung nativer kardialer MLCK aus Zelllysaten durch Western-Blot-Analyse.....	100
3.11.3	Isolierung rekombinanter skmMLCK aus einem Zelllysate-Gemisch .....	102
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>107</b>
4.1	<b>Synthese fluoreszenzmarkierter bifunktioneller Protein-Kinase-Inhibitoren.....</b>	<b>108</b>
4.2	<b>Synthese eines fluoreszenzmarkierten ATP-Analogons .....</b>	<b>111</b>
4.3	<b>Untersuchungen zur Affinität und Spezifität der bifunktionellen Inhibitoren.....</b>	<b>113</b>
4.4	<b>Zelluläre Lokalisation der Inhibitoren .....</b>	<b>116</b>
4.5	<b>Verwendung bifunktioneller Inhibitoren für die Affinitätschromatographie.....</b>	<b>119</b>
4.6	<b>Ausblick .....</b>	<b>120</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>122</b>
<b>6</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>124</b>
6.1	<b>Verwendete Materialien .....</b>	<b>124</b>
6.1.1	Chemikalien.....	124
6.1.2	Proteine und Peptide .....	127
6.1.3	Antikörper .....	127
6.1.4	Zelllinien und Primärzellen .....	127
6.1.5	Medien und Reagenzien für die Zellkultur .....	128
6.1.6	Allgemeine Geräte.....	128
6.2	<b>Spektroskopische und spektrometrische Methoden.....</b>	<b>129</b>
6.2.1	NMR-Spektroskopie .....	129
6.2.2	Massenspektrometrie .....	129
6.2.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung .....	129
6.3	<b>Chromatographische Methoden .....</b>	<b>130</b>
6.3.1	Dünnschichtchromatographie.....	130
6.3.2	Säulenchromatographie .....	130
6.3.3	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC).....	130
6.3.4	Anionenaustauscher-Chromatographie.....	131
6.3.5	Affinitätschromatographie.....	132
6.4	<b>Proteinchemische Methoden .....</b>	<b>133</b>
6.4.1	SDS-Gelelektrophorese .....	133
6.4.2	Herstellung von Zelllysaten .....	134

6.4.3	Permeabilisierung von Zellen mit Streptolysin-O und Transfektion fluoreszenzmarkierter Analoga.....	135
6.4.4	Phosphorylierungsexperimente mit [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP .....	135
6.4.4.1	Verdrängungsexperimente mit PKA-C .....	136
6.4.4.2	Verdrängungsexperimente mit skmMLCK.....	136
6.4.4.3	Kinetische Untersuchungen an skmMLCK.....	136
<b>6.5</b>	<b>Immunologische Methoden.....</b>	<b>137</b>
6.5.1	Western-Blot.....	137
6.5.2	Immunanfärbungen .....	138
6.5.2.1	Immunanfärbung von HeLa-Zellen.....	138
6.5.2.2	Immunanfärbung von Herzmuskelzellen aus neonatalen Ratten .....	139
<b>6.6</b>	<b>Mikroinjektionen in Fibroblasten.....</b>	<b>139</b>
<b>6.7</b>	<b>Kolokalisationsexperimente in H9C2-Zellen.....</b>	<b>140</b>
<b>6.8</b>	<b>Kultur von Primärzellen und Zelllinien.....</b>	<b>140</b>
6.8.1	Präparation und Kultur von Herzmuskelzellen aus neonatalen Ratten .....	140
6.8.2	Kultur von HeLa-Zellen.....	140
6.8.3	Herstellen von HeLa-Stocks.....	141
6.8.4	Kultur von H9C2-Zellen .....	141
<b>6.9</b>	<b>Chemische Methoden .....</b>	<b>142</b>
6.9.1	Synthese von P <sup>3</sup> -(N <sup>ε</sup> -(N-acyl-O-methyl)-lysyl)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>1</b> ..	142
6.9.2	Synthese von P <sup>3</sup> -(N <sup>ε</sup> -([K5, V6, A7]-CONH <sub>2</sub> -Kemptide)-lysyl)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>6</b> .....	143
6.9.3	Synthese von P <sup>3</sup> -(N <sup>ε</sup> -(N-FITC-[K5, V6, A7]-CONH <sub>2</sub> -Kemptide)-lysyl)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>2</b> und P <sup>3</sup> -(N <sup>ε</sup> -(N-TRITC-[K5, V6, A7]-CONH <sub>2</sub> -Kemptide)-lysyl)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>3</b> .....	144
6.9.4	P <sup>3</sup> -(Aminohexyl-amino)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>9</b> .....	144
6.9.5	P <sup>3</sup> -(Aminobutyl-amino)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>8</b> .....	146
6.9.6	P <sup>3</sup> -(Aminoethyl-amino)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>7</b> .....	147
6.9.7	N-FITC-aminohexyl-amin <b>12</b> .....	148
6.9.8	N-FITC-aminobutyl-amin <b>11</b> .....	149
6.9.9	N-FITC-aminoethyl-amin <b>10</b> .....	149
6.9.10	4-(Trifluoracetamido-ethyl)-phenylamin <b>16</b> .....	150
6.9.11	P <sup>3</sup> -(4-Aminoethyl-phenylamino)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>18</b> .....	151
6.9.12	P <sup>3</sup> -(4-(N-FITC-Aminoethyl)-phenylamino)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>19</b> .....	152
6.9.13	P <sup>3</sup> -(4-(N-Cy5-Aminoethyl)-phenylamino)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>38</b> .....	153
6.9.14	$\beta$ -Iodethylamin <b>17</b> .....	153
6.9.15	P <sup>3</sup> -( $\beta$ -Iodethylamino)-P <sup>1</sup> -adenosin-triphosphat <b>21</b> .....	154

---

6.9.16 Festphasensynthese von Peptiden .....	155
6.9.17 Bromoacylierung von Peptiden mit Bromessigsäure/DIC.....	156
6.9.18 Entschützung und Abspaltung der Peptide .....	156
6.9.19 Reinigung der Rohpeptide.....	156
6.9.20 Kopplung der bromoacylierten Peptide mit ATP $\gamma$ S.....	157
6.9.21 Synthese von Fluorescein-markierten Peptiden.....	157
6.9.22 Synthese von Cy5-markierten Peptiden .....	158
6.9.23 Peptidanalytik .....	158
<b>7 Literatur.....</b>	<b>159</b>

---

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ac	Acyl
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Boc	tert-Butoxycarbonyl
BSA	Rinderblutalbumin
Ca	Calcium
ca.	zirka
CaM	Calmodulin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-propansulfonsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	1,3-Dicyclohexylcarbodiimid
DIC	1,3-Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Diisopropylethylamin
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dpr	Diaminopropionsäure
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EGTA	Ethylenglykol-bis-2-aminoethyl-tetraessigsäure
ESI	Elektrosprayionisierung
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FN3	Fibronectin Typ 3
GC	Gaschromatographie
Gdn/HCl	Guanidiniumhydrochlorid

---

GIA	Glutaraldehyd
h	Stunde(n)
HBTU	2-[(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HCl	Salzsäure
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Histag	sechs Histidine in Folge (HHHHHH)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IRK	Insulin-Rezeptor-Kinase
KDa	Kilodalton
iv(Dde)	4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)-3-methylbutyl
konz.	konzentriert
m	relative Masse (in Massenspektren)
MDa	Megadalton
Me	Methyl
min	Minute(n)
MLCK	Myosin-Leichtketten-Kinase
MS	Massenspektrometrie bzw. -spektrum
MyBP	Myosin-bindendes Protein
NGS	Ziegennormalserum
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	Kernresonanzspektroskopie bzw. -spektrum
NRC	Herzmuskelzellen aus neonatalen Ratten
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PKA	cAMP-abhängige Protein-Kinase, Protein-Kinase A
PKA-C	katalytische Untereinheit von PKA
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	Teile pro Millionen
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
rMLC	regulatorische leichte Myosinketten
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
skm	Skelettmuskel

---

sm	glatte Muskulatur
tBu	tert-Butyl
TEA	Triethylamin
TEAAc	Triethylammoniumacetat
TEAHCO <sub>3</sub>	Triethylammoniumhydrogencarbonat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TK	Titin-Kinase
TMS	Tetramethylsilan
Tn	Troponin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Trityl
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
U/ml	Einheit/ml

---

**Ein- und Dreibuchstaben-Code für Aminosäuren**

A	Ala	Alanin
B	Asx	Asparagin oder Asparaginsäure
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparaginsäure
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
Z	Glx	Glutamin oder Glutaminsäure

# 1 Einleitung

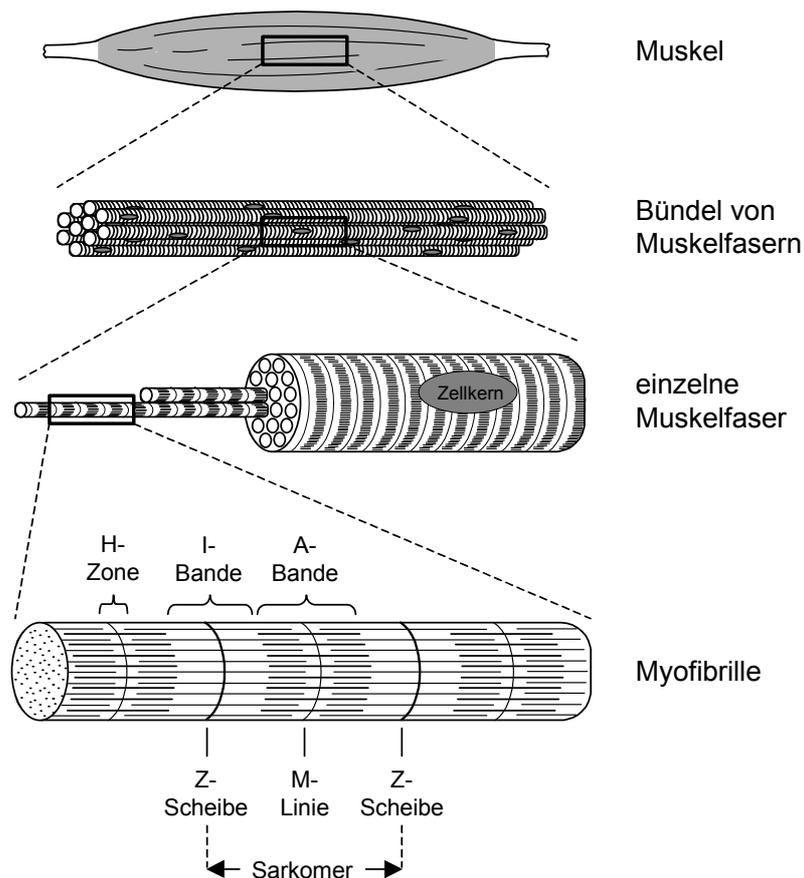
Eine der auffälligsten Eigenschaften lebender Organismen ist die Fähigkeit koordinierte Bewegungen auszuführen. Bewegungsphänomene gibt es auf allen Strukturebenen: Hierzu zählen so unterschiedliche gerichtete Prozesse wie die Auftrennung von Chromosomen während der Zellteilung, das Schlagen von Cilien und Flagellen, der aktive Transport von Ionen und Molekülen, die Wanderung der DNA-Polymerase entlang der DNA und, wohl am deutlichsten erkennbar, die Kontraktion von Muskeln. Muskeln sind molekulare Maschinen, die chemische Energie in mechanische Kraft umwandeln. Das kontraktile System basiert auf ineinandergreifenden Proteinfilamenten, die sich gegeneinander verschieben können. Die für die Kontraktion benötigte Energie stammt aus der Hydrolyse von ATP. Die Regulation erfolgt über die Änderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Die Muskelkontraktion ist die bekannteste und am besten verstandene aller Bewegungsarten, zu denen Tiere in der Lage sind.

## 1.1 Die Struktur quergestreifter Muskeln

Bei Wirbeltieren lassen sich aufgrund ihrer Morphologie und ihrer Funktion drei Arten von Muskeln unterscheiden: die Skelettmuskulatur, die Herz- oder kardiale Muskulatur und die glatte Muskulatur. Der Skelettmuskel und der Herzmuskel zeigen aufgrund ihrer hoch geordneten Struktur bei Betrachtung im Lichtmikroskop ein charakteristisches Streifenmuster. Sie werden daher auch als quergestreifte Muskulatur bezeichnet. Die glatte Muskulatur besitzt keine geordnete Struktur und zeigt im Lichtmikroskop entsprechend kein charakteristisches Muster.

Die willkürlich kontrahierbaren Skelettmuskeln sind vorwiegend direkt mit den Knochen verbunden und für die schnellen, koordinierten Bewegungen des Skelettapparates verantwortlich. Ein Skelettmuskel besteht aus langen Bündeln parallel angeordneter Muskelfasern. Diese haben einen Durchmesser von 10-100  $\mu\text{m}$  und erstrecken sich meist über die gesamte Länge des Muskels. An beiden Enden des Muskels gehen sie in bindegewebige Sehnen über. Die Muskelfaser besteht nicht aus Einzelzellen, sondern ist eine riesige Zelle mit vielen peripher liegenden Zellkernen. Diese entsteht dadurch, dass während der Muskelentwicklung zahlreiche Vorläuferzellen Ende an Ende miteinander verschmelzen. Eine einzelne Muskelfaser wiederum besteht aus einem Bündel von etwa tausend Myofibrillen (griech. *myos*, Muskel) mit einem Durchmesser von je ca. 1-2  $\mu\text{m}$ . Innerhalb der Muskelfaser liegen die Myofibrillen alle auf der selben Höhe. Die

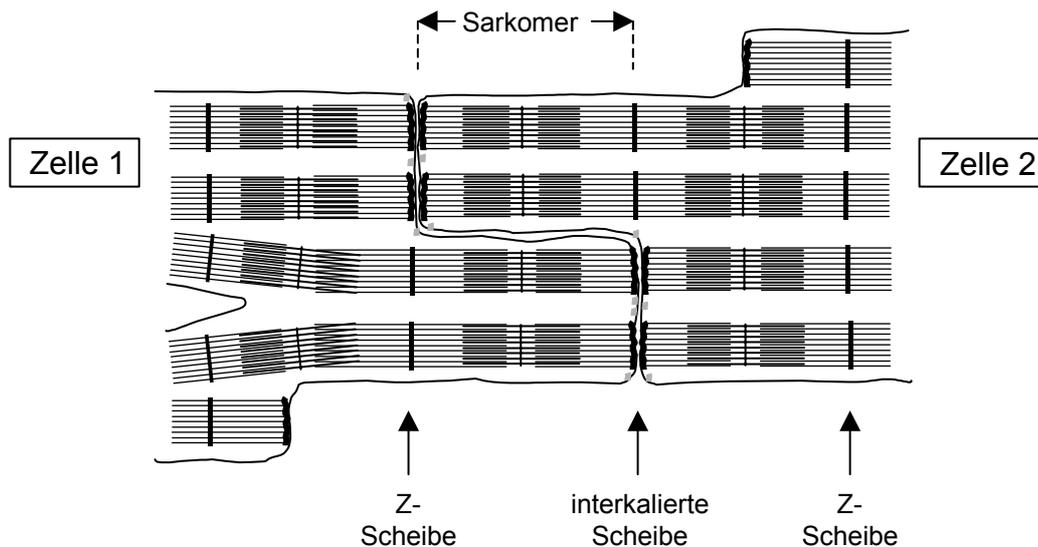
funktionelle Einheit der Myofibrille ist das Sarkomer (griech. *sarkos*, Fleisch). Ein Sarkomer hat im entspannten Muskel eine Länge von etwa 2-3  $\mu\text{m}$ . Die regelmäßige Anordnung der, sich teilweise überlappenden, dicken und dünnen Proteinfilamente innerhalb des Sarkomers bildet die molekulare Basis für die charakteristische Querstreifung von Muskeln.



**Abb. 1:** Struktureller Aufbau eines Skelettmuskels von Wirbeltieren. Der Muskel besteht aus Muskelfasern, die wiederum aus einzelnen Myofibrillen zusammengesetzt sind. Die kleinste funktionelle Einheit der Myofibrille ist das Sarkomer. Die strukturell unterscheidbaren Bereiche des Sarkomers, welche die molekulare Grundlage der Querstreifung von Muskeln bilden, sind zusätzlich benannt (siehe Kapitel 1.2).

Die nicht unter willkürlicher Kontrolle stehenden Herzmuskeln sind für das kontinuierliche Schlagen des Herzens und den Transport des Blutes zuständig. Der Herzmuskel ist, ähnlich wie der Skelettmuskel, quergestreift. Dies spiegelt eine sehr ähnliche Anordnung der Proteinfilamente und der kontraktile Einheiten wieder. Die Zellen des Herzmuskels sind jedoch nicht vielkernig, sondern bestehen aus diskreten Zellen mit jeweils eigenem Zellkern. Die einzelnen Zellen sind an ihren Enden durch besondere Strukturen, den sogenannten Interkalationsscheiben, miteinander verbunden. Die Interkalationsscheiben haben mindestens drei Funktionen: (1) sie heften eine Zelle an die nächste; (2) sie

verbinden die dünnen Proteinfilamente der Myofibrillen von aneinandergrenzenden Zellen miteinander (diese Funktion ist analog zu der der Z-Scheiben im Inneren der Zelle); (3) sie enthalten *gap junctions* (spezielle tubuläre Partikel, die bestimmte Regionen benachbarter Zellmembranen verbinden), die es einem Aktionspotential ermöglichen, sich schnell von einer Zelle zur nächsten auszubreiten, wodurch die Kontraktionen der Herzmuskelzellen synchronisiert werden.



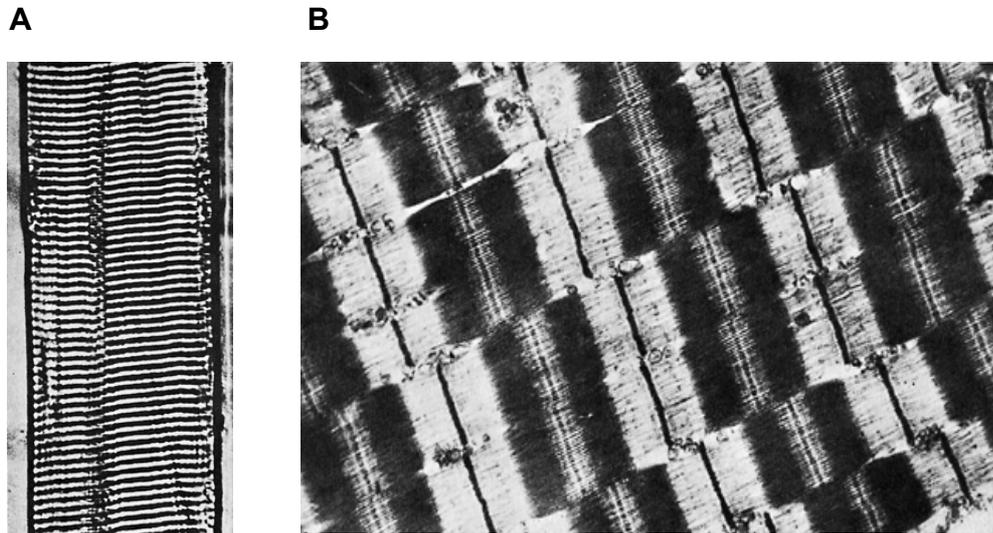
**Abb. 2:** Schematische Darstellung zweier angrenzender Herzmuskelzellen. Die Zellen sind Ende an Ende durch sogenannte interkalierte Scheiben miteinander verknüpft. So laufen die Myofibrillen - ohne Beachtung der Zellgrenzen - ununterbrochen durch den Muskel.

Die glatten Muskeln umgeben die inneren Organe und befinden sich im gesamten Magen-Darm-Trakt, dem Urogenitaltrakt, den Bronchien und den Gefäßen. Sie stehen nicht unter willkürlicher Kontrolle und kontrahieren sich wesentlich langsamer als Skelett- oder Herzmuskeln. Die glatte Muskulatur besteht aus einzelnen Zellen, in denen die Proteinfilamente einen eher locker angeordneten kontraktilen Apparat bilden, und zeigt daher auch keine Querstreifung.

## 1.2 Das Sarkomer - die kontraktile Einheit quergestreifter Muskeln

Im Lichtmikroskop zeigt sich bei longitudinal geschnittenen Skelett- oder Herzmuskeln die charakteristische Querstreifung als periodische Abfolge von hellen und dunklen Banden. Die dunklen Banden werden als A-Banden bezeichnet, weil sie in polarisiertem Licht

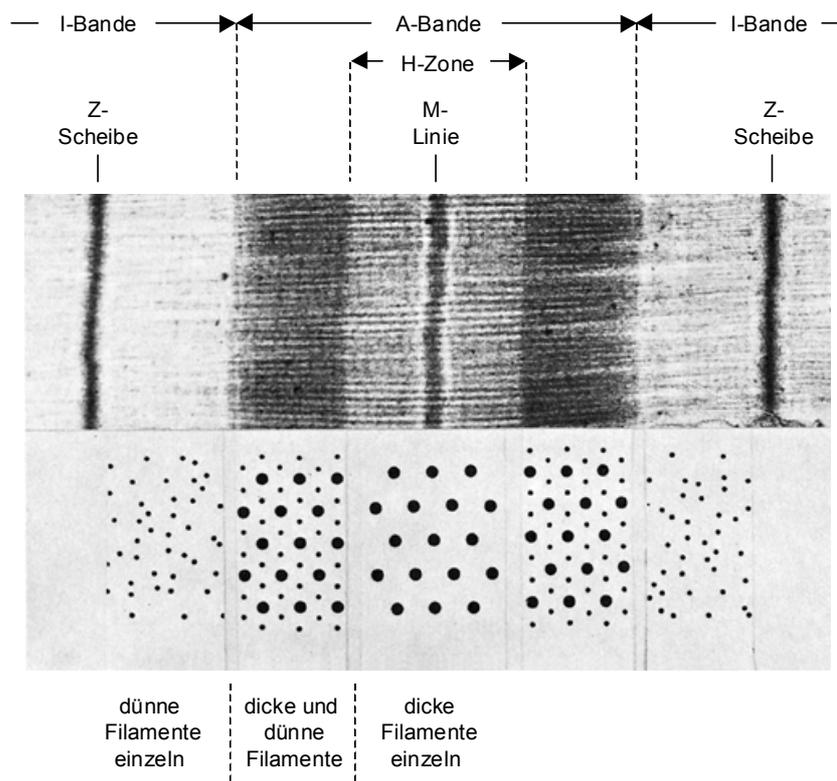
anisotrop erscheinen (d.h., ihr Refraktionsindex ändert sich mit der Polarisationssebene). Die hellen Banden sind in polarisiertem Licht verhältnismäßig isotrop und werden daher auch I-Banden genannt.



**Abb. 3:** (A) Längsschnitt einer Skelettmuskelfaser (Durchmesser ca. 50  $\mu\text{m}$ ) unter einem Phasenkontrast-Lichtmikroskop. Man erkennt die dunklen A-Banden und die hellen I-Banden (aus Stryer, 1975). (B) Längsschnitt einer Skelettmuskelfaser unter einem Elektronenmikroskop. Strukturelle Details wie H-Zone, M-Linie und Z-Scheiben werden erkennbar (aus Stryer, 1975).

Betrachtet man das Muskelgewebe unter dem Elektronenmikroskop, so werden auch strukturelle Details des Sarkomers, welches die kleinste kontraktile Einheit in quergestreiften Muskeln darstellt, sichtbar. Der zentrale Bereich der dunklen A-Banden, der als H-Zone bezeichnet wird, ist etwas heller als der Rest der A-Bande. In der Mitte der H-Zone befindet sich eine dunkle Linie, die M-Linie genannt wird. Die hellen I-Banden werden durch dunkle Linien, die sogenannten Z-Scheiben, unterteilt. In hochaufgelösten elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennt man weiterhin zwei Arten von Proteinfilamenten: dicke Filamente mit einem Durchmesser von ca. 15 nm und dünne Filamente mit einem Durchmesser von ca. 8 nm. Die dicken Filamente bestehen vorwiegend aus Myosin, der Hauptbestandteil der dünnen Filamente ist Aktin. In den I-Banden befinden sich nur die von den Z-Scheiben ausgehenden dünnen Filamente. Die H-Zone innerhalb der A-Banden enthält nur dicke Filamente. Im übrigen dunklen Bereich der A-Banden greifen beide Proteinfilamente ineinander und wechselwirken dort über Querbrücken (*cross bridges*) miteinander, die in regelmäßigen Abständen von den dicken Filamenten ausgehen. Auf der Grundlage von Röntgen-, lichtmikroskopischen- und elektronenmikroskopischen Studien wurde bereits 1954 ein Gleitfasermodell aufgestellt, welches die bei der Kontraktion von Muskeln auftretenden Kräfte durch ein aktives

aneinander Vorbeigleiten der ineinandergreifenden dicken und dünnen Filamente erklärt (Huxley und Hanson, 1954; Huxley und Niedergerke, 1954). Die gerichteten Kräfte der Muskelkontraktion entstehen dabei durch das abwechselnde Binden und Freisetzen von Aktin und Myosin. Die für die Wechselwirkungen zwischen den Myosin-Querbrücken und den dünnen Filamenten notwendige chemische Energie stammt aus der Hydrolyse von ATP zu ADP und anorganischem Phosphat. Die ATP-Hydrolyse wird durch Aktomyosin, einem Komplex aus Aktin und Myosin, katalysiert (Voet und Voet, 1994).



**Abb. 4:** Elektronenmikroskopische Aufnahme des Längsschnittes einer Skelettmuskelfaser. Man erkennt ein einzelnes Sarkomer mit seinen strukturellen Details. Zusätzlich zeigen Querschnitte die Verteilung von dünnen und dicken Filamenten innerhalb der verschiedenen Bereiche des Sarkomers (aus Stryer, 1975).

Neben den beiden Haupt-Proteinkomponenten Myosin und Aktin, die zusammen etwa 80 % der Proteinmasse des Muskels ausmachen, sind noch eine Reihe weiterer Struktur- und regulatorischer Proteine für die Aufrechterhaltung der präzisen Organisation und Funktion des kontraktile Apparates verantwortlich.

Zusammen mit den dünnen Filamenten sind vorwiegend zwei regulatorische Proteine assoziiert. Das Erste ist Tropomyosin, ein stabförmiges Protein, das schraubenförmig entlang der Aktin-Filamente bindet. Das zweite Protein ist Troponin (Tn), ein globuläres Protein, das in regelmäßigen Abständen an die dünnen Filamente gebunden ist. Troponin

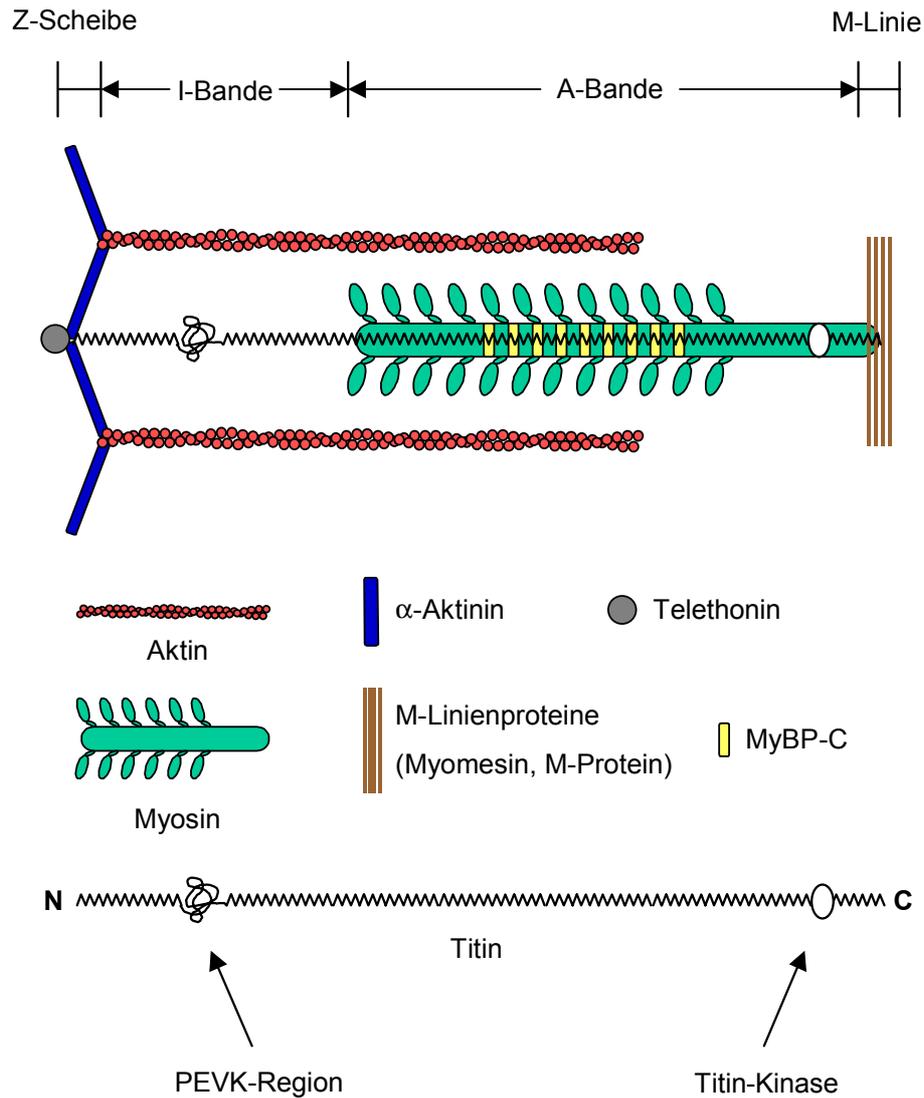
besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten, die jeweils nach ihren Funktionen benannt sind: Tn-C (Calcium-bindende Untereinheit), Tn-I (Inhibitorische Untereinheit) und Tn-T (Tropomyosin-bindende Untereinheit). Der Komplex aus Troponin und Tropomyosin steuert über die Inhibierung der Wechselwirkung von Myosin und Aktin die Kontraktion der Muskeln. Steigt aufgrund eines Nervenimpulses die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration innerhalb des Sarkomers von  $10^{-7}$  M auf etwa  $10^{-5}$  M an, bindet Calcium an die Tn-C-Untereinheit. Dadurch erfolgt eine Konformationsänderung des Troponin-Tropomyosin-Komplexes, die dann die Wechselwirkung von Myosin und Aktin ermöglicht. Dies führt, so lange diese höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aufrechterhalten wird, zur Muskelkontraktion und ATP-Hydrolyse (Voet und Voet, 1994). Weitere mit den dünnen Filamenten assoziierte Proteine sind Nebulin und  $\alpha$ -Aktinin. Nebulin ist ein längliches, nicht-dehnbares Protein, welches an die Z-Scheiben geheftet und parallel zu den Aktin-Filamenten ausgerichtet ist, wobei es die gesamte Länge der dünnen Filamente überspannt. Nebulin wird nur in Skelettmuskeln exprimiert und ist vermutlich für die Längenregulierung der dünnen Filamente verantwortlich (Kruger *et al.*, 1991; Littlefield und Fowler, 1998). Die Längenregulierung der dünnen Filamente in Herzmuskeln muss auf anderem Wege erfolgen, da das homologe Protein zu Nebulin, Nebulette, zu kurz ist um die gesamte Länge der Filamente überspannen zu können (Moncman und Wang, 1995).  $\alpha$ -Aktinin ist ein dimeres stäbchenförmiges Protein und bildet den Hauptbestandteil der Z-Scheibe. Es ist eine Art Aktin-Bündelungsprotein und verknüpft die einzelnen Aktin-Filamente mit der Z-Scheibe (Vigoreaux, 1994).

Die dicken Filamente sind ebenfalls mit einer Reihe von Proteinen assoziiert. Im Bereich der M-Linie findet man vorwiegend die Proteine Myomesin und M-Protein, die analog dem  $\alpha$ -Aktinin die Myosin-Filamente mit der M-Linie verknüpfen (Vinkemeier *et al.*, 1993). Die Myosin-bindenden Proteine (MyBP) MyBP-C, -H und -X sind innerhalb der A-Bande im Bereich beidseitig der M-Linie in Form von Streifen in gleichmäßigen Abständen an die dicken Filamente gebunden. Sie besitzen vermutlich sowohl strukturgebende als auch regulatorische Funktionen (Moos *et al.*, 1975; Starr and Offer, 1978; Gautel *et al.*, 1995; Weisberg und Winegrad, 1996, 1998; Winegrad, 1999). Ein weiteres eng mit den Myosin-Filamenten assoziiertes Protein ist Titin. Titin ist ein sehr großes und flexibles Protein, welches die dicken Filamente mit den Z-Scheiben verbindet und sowohl für den Aufbau als auch für die Elastizität von Muskeln von großer Bedeutung ist.

### 1.3 Titin - ein molekularer Bauplan für das Sarkomer

Titin, auch Connectin genannt, wurde vor mehr als 20 Jahren als hochmolekulare Komponente von quergestreiften Muskeln identifiziert (Maruyama *et al.*, 1977; Wang *et al.*, 1979). Mit einem Massenanteil von ca. 10 % ist es neben Myosin und Aktin das dritthäufigste Muskelprotein. Das Titin-Molekül hat eine Länge von über 1  $\mu\text{m}$  und erstreckt sich von der Z-Scheibe bis zur M-Linie, wobei es die Hälfte eines Sarkomers überspannt (Fürst *et al.*, 1988). Titin wird in Mäusen und Menschen durch ein einzelnes Gen codiert, welches sich auf dem langen Arm von Chromosom 2 befindet (Müller-Seitz *et al.*, 1994; Pelin *et al.*, 1997). Es codiert für ein Polypeptid mit etwa 27000 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von ca. 3 MDa entspricht (Labeit und Kolmerer, 1995). Damit ist es das bis heute größte identifizierte Protein. Wie viele andere sarkomerische Proteine ist auch Titin vorwiegend modular aufgebaut. 90 % des Proteins bestehen aus Domänen mit repetitiven Einheiten von etwa 90-100 Aminosäuren, die strukturell den Klassen der Immunglobuline (Ig) und Fibronektine Typ 3 (FN3) zugeordnet werden können. Zusammen mit den nicht-repetitiven Sequenzen bilden diese eine Vielzahl spezifischer Bindungsstellen für andere sarkomerische Proteine wie Myosin, Aktin,  $\alpha$ -Aktinin, MyBP-C und Myomesin. Da die jeweiligen Bindungsstellen die Abstände aller Bindungspartner untereinander automatisch festlegen, kann Titin als molekularer Bauplan des Sarkomers verstanden werden. Titin wird daher auch oft als „*molecular ruler*“ bezeichnet. Schon kleine Deletionen innerhalb des Titin-Gens führen zu schwerwiegenden Defekten bei der Sarkomerbildung, auch wenn andere sarkomerische Proteine vollständig exprimiert werden (van der Ven *et al.*, 2000). Dies zeigt, dass ein so komplexes makromolekulares System wie das Sarkomer neben selbst-assemblierenden Proteinuntereinheiten einer weiteren Organisationsebene bedarf. Neben seiner Funktion als „*molecular ruler*“ ist Titin ebenfalls für die passive Elastizität der Muskeln und die Zentrierung der dicken Filamente während der Generierung aktiver Kraft verantwortlich (Maruyama, 1994; Trinick, 1994; Gregorio *et al.*, 1999).

Angefangen mit dem N-Terminus, der in der Z-Scheibe lokalisiert ist, erstreckt sich Titin über die halbe Distanz eines Sarkomers und endet mit seinem C-Terminus in der M-Linie. Im Nachfolgenden werden einige strukturelle und funktionelle Details der verschiedenen Regionen von Titin aufgeführt:



**Abb. 5:** Schematische Darstellung eines halben Sarkomers. Das Titin-Molekül erstreckt sich über die Länge eines halben Sarkomers von der Z-Scheibe bis zur M-Linie. Dabei ist es neben den Aktin- und Myosin-Filamenten mit einer Reihe weiterer sarkomerischer Proteine wie  $\alpha$ -Aktinin, Telethonin, MyBP-C und den M-Linienproteinen assoziiert.

Der N-terminale Bereich von Titin ist in der Z-Scheibe verankert und setzt sich aus Ig-ähnlichen Bereichen und einzigartigen insertierten Sequenzen zusammen. In Lokalisationsexperimenten mit Antikörpern konnte gezeigt werden, dass es in diesem Bereich zu einer nahezu vollständigen Überlappung der Titin-Moleküle zweier angrenzender Sarkomere kommt, was vermutlich einen entscheidenden Einfluss auf die mechanische Stabilität der Z-Scheiben hat (Gregorio *et al.*, 1998). Innerhalb der Z-Scheibe wechselwirkt Titin in komplexer Weise mit  $\alpha$ -Aktinin, welches den Hauptbestandteil der Z-Scheibe ausmacht (Sorimachi *et al.*, 1997; Ohtsuka *et al.*, 1997; Young *et al.*, 1998). Der Ausgangspunkt bei der Entwicklung von Muskelzellen ist der Aufbau der Z-Scheiben (Vigoreaux, 1994; Fürst und Gautel, 1995). In differenzierenden Muskelzellen

erscheint Titin als eines der ersten sarkomerischen Proteine und kolokalisiert in punktförmigen Gebilden mit  $\alpha$ -Aktinin (Tokuyasu und Maher, 1987a, b). Diese punktförmigen Aggregate richten sich entlang von Stressfaser-ähnlichen Strukturen aus und organisieren sich im weiteren Verlauf der Zellentwicklung zu Z-Scheiben (van der Ven *et al.*, 1993). Diese Beobachtungen unterstreichen die These, dass Titin während der Entwicklung quergestreifter Muskeln die Funktion eines „*molecular ruler*“ übernimmt. Ein weiterer Interaktionspartner von Titin ist Telethonin, auch T-Cap genannt, das wahrscheinlich ebenfalls an der Verankerung des N-Terminus innerhalb der Z-Scheibe beteiligt ist und als Substrat für die Titin-Kinase identifiziert wurde (Valle *et al.*, 1997; Mues *et al.*, 1998; Mayans *et al.*, 1998; Gregorio *et al.*, 1998).

Eine wichtige physiologische Funktion von Titin ist die elastische Verbindung der dicken und dünnen Filamentsysteme untereinander (Horowitz *et al.*, 1986). Dabei wirkt es als eine „molekulare Feder“, die unter anderem für die Elastizität entspannter Myofibrillen verantwortlich ist. Aus der Sequenzierung von Titin geht hervor, dass der Bereich der I-Bande sehr komplex aufgebaut ist und neben den charakteristischen Ig-ähnlichen Domänen eine Vielzahl sehr verschiedener Strukturelemente aufweist (Labeit und Kolmerer, 1995). Ein elastischer Bereich wird als N2-Region bezeichnet und enthält einige einzigartige Sequenz-Insertionen. Von der N2-Region existieren verschiedene Isoformen (N2A und N2B). In Skelettmuskeln liegt die N2A-Isoform vor, die je nach Gewebetyp in der Länge variiert. In Herzmuskeln werden die N2A- und N2B-Isoformen koexprimiert. Ein zweiter Bereich besteht zu fast 70 % aus den Aminosäuren Prolin (P), Glutaminsäure (E), Valin (V) und Lysin (K), daher auch als PEVK-Region bezeichnet, und zeigt keine regelmäßigen Sekundär- oder Tertiärstrukturelemente. In stark gestreckten Skelettmuskeln beruht das elastische Verhalten von Titin vorwiegend auf der schrittweisen Entfaltung dieses Bereiches (Linke *et al.*, 1999). Mit der N2- und der PEVK-Region als elastische Bereiche ist Titin eine „molekulare Feder“ mit zwei in Reihe geschalteten Federsegmenten.

Mit ca. 1900 kDa und einer Länge von etwa 0.8  $\mu\text{m}$  befindet sich der größte Teil von Titin innerhalb der A-Bande (Labeit und Kolmerer, 1995). Dieser Teil von Titin ist vorwiegend aus FN3-ähnlichen Bereichen aufgebaut, die zusammen mit einigen regelmäßig insertierten Ig-ähnlichen Bereichen riesige Wiederholungseinheiten von je sieben und elf Domänen bilden. Dieser regelmäßige Aufbau wird nur im Übergangsbereich zur I-Bande und zum M-Linien-nahen Anteil der A-Bande unterbrochen, wo FN3- und Ig-ähnliche Bereiche ohne eine erkennbare übergeordnete Struktur vorliegen (Labeit und Kolmerer, 1995). Natives Titin ist in der Lage einzelne Myosin-Moleküle zu aggregieren und ist unter

physiologischen Bedingungen fest an die dicken Filamente gebunden (Maruyama *et al.*, 1985). Diese Assoziation mit den dicken Filamenten, die ein hoch geordnetes System mit präziser Länge darstellen, scheint ebenfalls ein Hinweis auf die „*molecular ruler*“-Funktion von Titin zu sein (Whiting *et al.*, 1989; Trinick, 1994). Da Titin im Bereich der A-Bande vorwiegend aus FN3-ähnlichen Domänen aufgebaut ist, wird vermutet, dass diese vorwiegend für die Wechselwirkungen mit Titin verantwortlich sind. Dies wird durch die Beobachtungen gestützt, dass rekombinante Multi-Modul-Fragmente von Titin an Myosin binden und die Affinität zu Myosin mit der Anzahl der FN3-ähnlichen Domänen zunimmt (Labeit *et al.*, 1992). Im Gegensatz dazu sind die Ig-ähnlichen Domänen über die gesamte Länge des Titin-Moleküls verteilt und daher wahrscheinlich für die Wechselwirkungen mit anderen Liganden als Myosin verantwortlich (Labeit und Kolmerer, 1995). Ein weiteres mit der A-Bande assoziiertes Protein ist das Myosin-bindende Protein C (MyBP-C), das zusammen mit Myosin und Titin einen stabilen ternären Komplex bildet. MyBP-C ist dabei in neun der elf regulär angeordneten Querstreifen zu finden (die zwei anderen Streifen sind MyBP-H und -X zuzuordnen) (Offer *et al.*, 1973; Dennis *et al.*, 1984; Bennet *et al.*, 1986). Neben seiner Funktion als Strukturprotein innerhalb der dicken Filamente scheint das Myosin-bindende Protein C auch regulatorische Funktionen zu haben. MyBP-C aus Herzmuskel enthält beispielsweise drei Phosphorylierungsstellen für die cAMP-abhängige Protein-Kinase (PKA). Die Phosphorylierung von MyBP-C hat eine erhöhte Frequenz und Kraft der Kontraktion zur Folge und könnte somit eine wichtige Rolle bei der Modulation der Herzmuskelkontraktion spielen (Gautel *et al.*, 1995a).

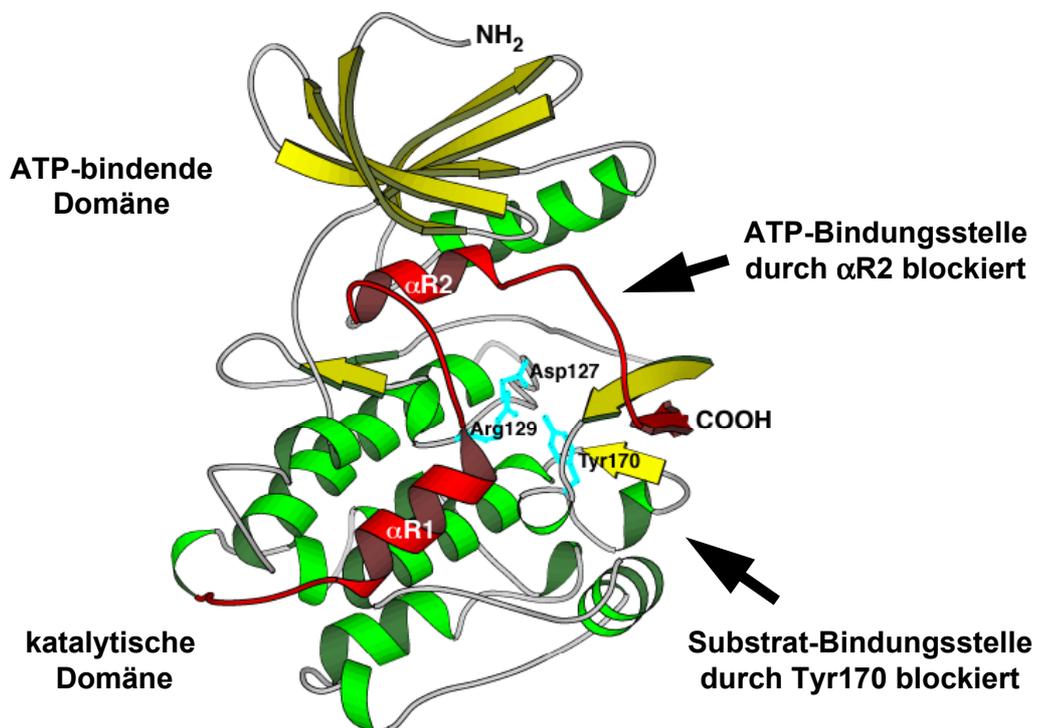
Der C-terminale Bereich von Titin befindet sich in der M-Linie und ist ähnlich komplex aufgebaut wie der N-terminale Bereich innerhalb der Z-Scheibe. Er besteht vorwiegend aus Ig-ähnlichen Domänen, die durch nicht modulare Sequenzen verschiedener Längen miteinander verbunden werden. Am Rand der M-Linie befindet sich zusätzlich eine Ser/Thr-Kinase-Domäne (siehe Kapitel 1.4). Innerhalb der M-Linie findet man, neben Myosin und Titin, vorwiegend die M-Linienproteine M-Protein und Myomesin. Beide Proteine sind ausschließlich in der M-Linie zu finden und werden nur in quergestreiften Muskeln exprimiert (Eppenberger *et al.*, 1981; Grove *et al.*, 1984; Grove *et al.*, 1985). Sowohl M-Protein als auch Myomesin interagieren mit Myosin und Titin und sind wahrscheinlich an der Verbindung zwischen Titin und den dicken Filamenten beteiligt (Nave *et al.*, 1989; Vinkemeyer *et al.*, 1993). Im Bereich der M-Linie kommt es zu einer vollständigen Überlappung von Titin-Molekülen aus beiden Hälften des Sarkomers. Ob diese Überlappung jedoch auf einer Dimerisierung von Titin-Molekülen oder auf Wechselwirkungen mit M-Protein oder Myomesin beruht, ist noch unklar.

## 1.4 Die Titin-Kinase

Im C-terminalen Bereich nahe der M-Linie enthält Titin eine Ser/Thr-Kinase-Domäne, die auch als Titin-Kinase (TK) bezeichnet wird. Die Titin-Kinase zeigt strukturelle Verwandtschaft mit der Familie der Myosin-Leichtketten-Kinasen (MLCK: *myosin light chain kinase*) (Labeit *et al.*, 1992; Kemp *et al.*, 1994). Die meisten dieser Kinasen besitzen eine hohe Substratspezifität und phosphorylieren einen einzigen Aminosäurerest in den regulatorischen leichten Ketten des Myosins (rMLC: *regulatory myosin light chain*). Da Titin in quergestreiften Muskeln eng mit Myosin assoziiert ist, liegt die Vermutung nahe, dass Myosin ebenfalls ein Substrat der Titin-Kinase sein könnte. Für Twitchin, das zu Titin homologe Enzym in wirbellosen Tieren, konnte gezeigt werden, dass dieses MLC-Peptide phosphoryliert und eine Aktivierung der Kinase in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  durch eine dimere Form des S100A1-Proteins erfolgen kann (Heierhorst *et al.*, 1996a, b). Für Titin hingegen konnte unter diesen Bedingungen keine Phosphorylierung nachgewiesen werden und Myosin scheint somit kein Substrat für die Titin-Kinase zu sein. Mit Hilfe von in Muskelzellen exprimierten TK-Fragmenten konnte zwar ebenfalls keine Aktivität gegenüber Myosin nachgewiesen werden, man beobachtete jedoch die Phosphorylierung eines 22 kDa-Protein in Muskelzellextrakten (Mayans *et al.*, 1998). Dieses Protein konnte später als Telethonin identifiziert werden und ist bis heute das einzig bekannte Substrat der Titin-Kinase. Erstaunlicherweise ist Telethonin innerhalb des Sarkomers in der Z-Scheibe lokalisiert und damit etwa 1  $\mu\text{m}$  von der Titin-Kinase-Domäne entfernt. Es stellt sich daher die Frage, wie Kinase und Substrat über eine solche Distanz miteinander wechselwirken können. Eine mögliche Erklärung dafür basiert auf der Beobachtung, dass der C-Terminus von Titin und das Substrat Telethonin in differenzierenden Muskelzellen anfangs in punktförmigen Aggregaten entlang Stressfaser-ähnlichen Strukturen kolokalisieren (Mayans *et al.*, 1998). Diese Daten weisen darauf hin, dass die Titin-Kinase und die resultierende Phosphorylierung von Telethonin einen Einfluss auf die Organisation des Cytoskeletts während der Differenzierung von Muskelzellen haben. Eine Beteiligung von TK an der Regulation der Muskelkontraktion in vollständig differenzierten Myofibrillen, wie früher vermutet wurde, scheint somit sehr unwahrscheinlich.

Die Kinasen der MLCK-Familie werden durch Calcium/Calmodulin (Ca/CaM) reguliert. Calmodulin (*calcium-modulating protein*) ist ein ubiquitäres und hoch konserviertes Protein mit vier hochaffinen Bindungsstellen für Calcium. Die Bindung von Calcium bewirkt eine konformelle Änderung des Proteins, wodurch die Affinität von Calmodulin zu einer Vielzahl von regulatorischen Proteinen erhöht wird. In Abwesenheit von Ca/CaM werden die Substrat-Bindungsstellen der MLCK durch ein Aktivierungssegment blockiert. Durch Bindung von Ca/CaM wird diese intrasterische Autoinhibition aufgehoben und die

Kinase aktiviert (Kobe *et al.*, 1996). Andere Kinasen dieser Familie, wie die Ca/CaM-abhängige Protein-Kinase I (CaMKI), werden durch einen dualen Mechanismus aktiviert. Die Bindung von Ca/CaM führt zur Aufhebung der Autoinhibition, wobei ein Aminosäurerest innerhalb des Aktivierungssegments freigelegt wird. Dieser Aminosäurerest, im Falle von CaMKI ein Threonin, wird anschließend durch eine übergeordnete Kinase phosphoryliert (Haribabu, *et al.*, 1995). Die Phosphorylierung führt zu einer Konformationsänderung innerhalb des Aktivierungssegments, die eine Wechselwirkung des Substrats mit dem an der Katalyse beteiligten Aspartat (D) ermöglicht. In allen Ser/Thr-Kinasen, die durch Phosphorylierung reguliert werden, befindet sich vor dem katalytischen Aspartat ein hoch konserviertes Arginin (R), welches mit dem phosphorylierten Aminosäurerest des Aktivierungssegments wechselwirkt. Diese Kinasen werden aufgrund der beiden konservierten Aminosäuren auch als RD-Kinasen bezeichnet (Johnson *et al.*, 1996). Die Titin-Kinase ist die einzige bekannte Ser/Thr-Kinase die durch Phosphorylierung reguliert wird und nicht das RD-Motiv enthält. Sie ist damit keine RD-Kinase.



**Abb. 6:** Struktur der autoinhibierten Form der Titin-Kinase (Mathias Gautel, King's College, London). Das autoregulatorische Segment mit den beiden Helices  $\alpha R1$  und  $\alpha R2$  ist in rot dargestellt. Die an der Inhibition und Katalyse beteiligten Aminosäurereste sind in cyan hervorgehoben.

Der vollständige Mechanismus der Aktivierung der Titin-Kinase ist noch nicht geklärt. Aufgrund der Kristallstruktur der Titin-Kinase und aus Daten von Phosphorylierungsexperimenten mit modifizierten TK-Fragmenten wurde jedoch ein Modell für einen neuartigen dualen Aktivierungsmechanismus abgeleitet (Mayans *et al.*, 1998; Means, 1998). In der Struktur der autoinhibierten Titin-Kinase erkennt man im oberen Bereich die ATP-bindende Domäne und im unteren Bereich die katalytische Domäne, die das C-terminale autoregulierende Segment (rot) enthält. Die Helix  $\alpha R1$  aus dem C-terminalen Segment enthält die Bindungsstelle für Calmodulin (Gautel *et al.*, 1995b). Man findet dort Kluster von basischen und hydrophoben Aminosäureresten auf der Oberfläche, was charakteristisch für Ca/CaM-bindende Sequenzen ist (Crivici und Ikura, 1995). Die zweite Helix,  $\alpha R2$ , liegt innerhalb der ATP-Bindungsstelle und blockiert im autoinhibierten Zustand die Bindung des Nukleotid-Substrats. Analog zu dem dualen Aktivierungsmechanismus von CaMKI könnte die Bindung von Ca/CaM der erste Schritt zur Aktivierung sein, wodurch die Helix  $\alpha R2$  aus der blockierten ATP-Bindungsstelle herausbewegt wird. Dabei wird ebenfalls ein Aminosäurerest freigelegt, der durch eine höhergeordnete Kinase phosphoryliert werden kann. Anders als bei CaMKI, wo ein Threonin phosphoryliert wird, findet man hier jedoch ein Tyrosin (Tyr170). Außerdem stammt das Tyrosin nicht aus dem Aktivierungssegment sondern aus der P+1-Schleife. Die P+1-Schleife bildet in anderen Kinasen eine Bindungstasche für die P+1-Position (P=0: Phosphorylierungsstelle) des Substrats aus. Im Gegensatz zu anderen Kinasen, in denen die Phosphorylierung innerhalb des Aktivierungssegments einen Übergang von einer „geschlossenen“ in eine „offene“ Konformation bewirkt, liegt das Aktivierungssegment in der autoinhibierten Titin-Kinase bereits in einer „offenen“ Konformation vor. Dafür bildet Tyr170 mit Arg129 und der Carboxyl-Gruppe der katalytischen Base Asp127 ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen, wodurch die Substrat-Bindungsstelle (P+1-Position) blockiert wird. Arg129, in allen andern MLCK-ähnlichen Kinasen ein konserviertes Lysin, agiert dabei als Brückenglied zwischen Tyr170 und Asp127. Die Phosphorylierung von Tyr170 führt *in vivo* schließlich zur Aufhebung der Inhibierung der Substrat-Bindungsstelle und damit vermutlich zur vollständigen Aktivierung der Titin-Kinase. Die entsprechende höhergeordnete Tyr-Kinase und eventuelle Kofaktoren sind bisher noch nicht identifiziert worden. Es konnte jedoch *in vitro* gezeigt werden, dass die Basalaktivität gegenüber Telethonin bei Titin-Y170E-Mutanten (das Glutamat soll hierbei ein Phospho-Tyrosin imitieren) mehr als zehnfach höher als bei dem Wildtyp-Enzym ist und durch Stimulation mit Ca/CaM sogar bis auf das Hundertfache ansteigt (Mayans *et al.*, 1998). Ob das Tyr170 aus der P+1-Schleife nach Phosphorylierung und Freigabe der Substrat-Bindungsstelle zusätzlich an Wechselwirkungen mit dem P+1-Aminosäurerest (oder anderen Aminosäureresten) des

Substrats beteiligt ist und dadurch die Substratspezifität der Kinase beeinflusst wird, muss noch gezeigt werden.

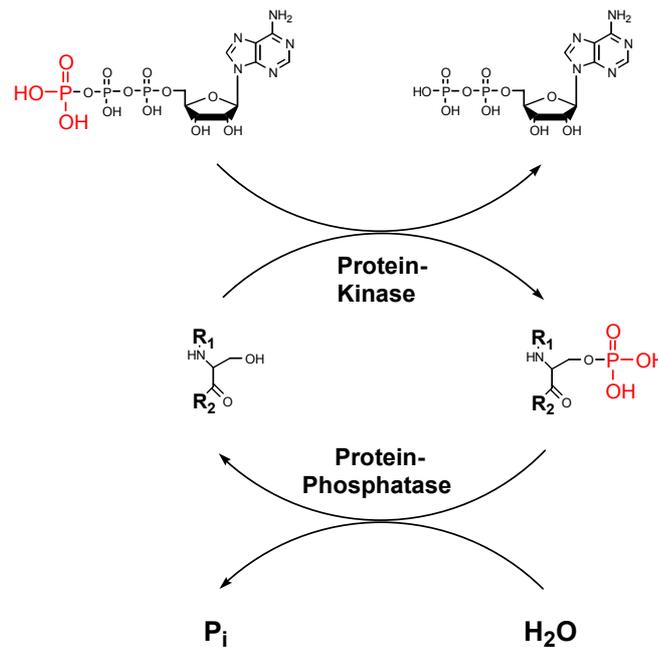
Bei dem hier diskutierten dualen Aktivierungsmechanismus scheint es aber, dass die Bindung von Ca/CaM für die Phosphorylierung von TK nicht erforderlich ist bzw. dieser nicht zwingend vorausgeht (Wilmanns *et al.*, 2000). Der tatsächliche Mechanismus der vollständigen Aktivierung der Titin-Kinase ist daher wahrscheinlich weitaus komplexer und involviert auch zusätzliche Kofaktoren (persönliche Mitteilung M. Gautel, King's College, London). Ein solcher dualer Aktivierungsmechanismus, wie er für TK beobachtet wird, scheint sehr selten zu sein. In Sequenzdatenbanken ist bisher nur eine weitere Kinase gefunden worden, die ebenfalls ein Arginin in der selben Position relativ zu dem katalytischen Aspartat aufweist und gleichzeitig ein Tyrosin innerhalb der P+1-Schleife enthält (Means, 1998).

Titin enthält neben der Kinase-Domäne auch Phosphorylierungsstellen für andere Protein-Kinasen sowie Bindungsstellen für verschiedene sarkomerische Proteine. Daher liegt die Vermutung nahe, dass Titin und im Besonderen die Titin-Kinase eine entscheidende Rolle innerhalb der Signaltransduktion des Sarkomers spielen. Da man bis heute jedoch nur sehr wenig über Regulatoren und Substrate der Titin-Kinase weiß, ist ihre exakte Funktion innerhalb dieser Signalwege weitgehend unbekannt.

## **1.5 Protein-Kinase-Inhibitoren**

Die reversible Phosphorylierung von Proteinen ist essentiell für die Signaltransduktion und zelluläre Regulation in eukaryontischen Zellen. Der reversible Transfer des  $\gamma$ -Phosphats von ATP auf die alkoholischen (Ser, Thr) und/oder phenolischen (Tyr) Proteingruppen der zugehörigen Substrate erfolgt dabei durch Protein-Kinasen, die Dephosphorylierung durch Protein-Phosphatasen.

Die Suche nach Substanzen, die in der Lage sind, die Kinase-vermittelte Phosphorylierung von Proteinen zu inhibieren, ist von besonderem Interesse. Durch Überaktivierung oder Mutation von Protein-Kinasen treten Defekte in der Regulation von Signaltransduktionswegen auf, wodurch verschiedene humane Krankheiten entstehen. Somit sind Kinase-Inhibitoren als Medikamente von großer Bedeutung. Daneben sind sie aber auch geeignete biochemische Werkzeuge, um Signaltransduktionswege einzelner Enzyme in Zellen untersuchen zu können.



**Abb. 7:** Protein-Phosphorylierungszyklus. Die Phosphorylierung des Aminosäurerests (hier: Serin) erfolgt durch spezifische Protein-Kinasen, die Dephosphorylierung durch spezifische Protein-Phosphatasen.

Kinase-Inhibitoren sollten idealer Weise die Eigenschaft besitzen, spezifisch nur eine einzelne Kinase zu inhibieren und dabei gleichzeitig mit hoher Affinität an das Enzym zu binden. Aus verschiedenen Gründen ist das Design solcher spezifischer und hochaffiner Kinase-Inhibitoren eine große Herausforderung:

- Die Familie der Protein-Kinasen bildet eine der größten bekannten Proteinfamilien und es wird vermutet, dass alleine das menschliche Genom für mehr als zweitausend Protein-Kinasen kodiert (Hunter, 1987; Knighton *et al.*, 1991; Hanks und Hunter, 1995). Es erscheint daher schwierig, unter einer so großen Anzahl strukturell verwandter Kinasen spezifisch ein Enzym zu inhibieren.
- Alle Kinasen nutzen ATP als gemeinsames Nukleotid-Substrat und die Aminosäuresequenzen der ATP-bindenden Region sind innerhalb dieser Proteinfamilie hoch konserviert.
- Die intrazelluläre Konzentration von ATP liegt im millimolaren Bereich, die  $K_m$ -Werte der Kinasen für ATP jedoch im unteren mikromolaren Bereich. Damit ist unter physiologischen Bedingungen die ATP-Bindungsstelle in der Kinase vollständig abgesättigt. Ein geeignetes ATP-Analogon muss also zwischen verschiedenen Protein-Kinasen diskriminieren können und gleichzeitig mit einer so hohen Affinität an die Kinase binden, dass es den großen ATP-Überschuss überwinden kann.
- Protein-Kinasen katalysieren nur die Phosphorylierung bestimmter Aminosäurereste, nämlich Serin, Threonin und Tyrosin. Ähnlich zu der ATP-bindenden Region sind die

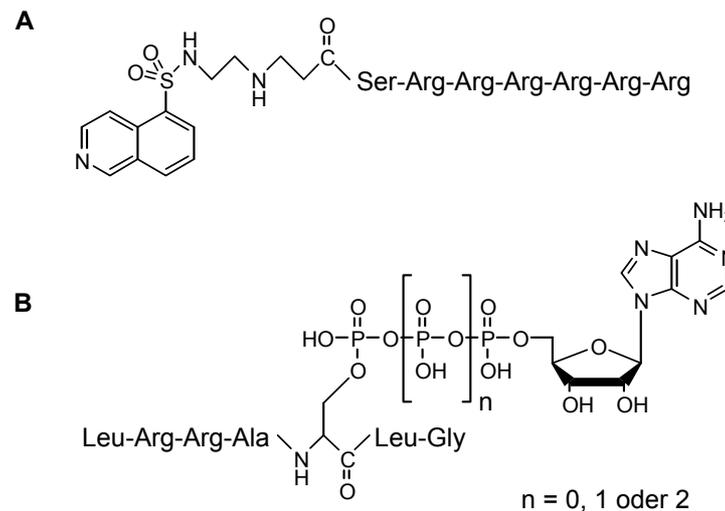
Bereiche um die Phosphorylierungsstellen der Substrate ebenfalls hoch konserviert und einige nahe verwandte Protein-Kinasen zeigen in ihrer Sequenzspezifität teilweise sogar Überlagerungen. Ein geeignetes nicht-phosphorylierbares Peptid-Analogon muss also mit hoher Affinität spezifisch an die Substrat-Bindungsstelle einer einzelnen Protein-Kinase binden.

Die Strategien für das Design spezifischer und hochaffiner Kinase-Inhibitoren basieren auf dem Verständnis des Mechanismus der Phosphorylierungsreaktion und der Bildung des aktivierten Bisubstrat-Komplexes aus ATP und dem entsprechenden Peptid- oder Protein-Substrat innerhalb der katalytischen Region des Enzyms. Die bisher gelösten Kristallstrukturen von Protein-Kinasen haben dabei entscheidend zum Verständnis der Reaktionsmechanismen beigetragen und wichtige Informationen zu den strukturellen Anforderungen an mögliche Inhibitoren geliefert. Je nach Wirkungsweise lassen sich Kinase-Inhibitoren in vier unterschiedliche Klassen einteilen:

- 1.) Inhibitoren, die mit ATP konkurrieren,
- 2.) Inhibitoren, die mit dem Peptid- oder Protein-Substrat konkurrieren,
- 3.) Inhibitoren, die sowohl mit ATP als auch mit dem Peptid- oder Protein-Substrat konkurrieren und
- 4.) Inhibitoren die auf verschiedene Weise die zelluläre Lokalisation von Protein-Kinasen und ihren Substraten blockieren.

Die ersten synthetisierten Kinase-Inhibitoren waren Substanzen, die mit ATP um die Nukleotid-Bindungsstelle konkurrieren. Dazu gehören Substanzen wie Isochinolinsulfonamid-Derivate, Staurosporin-Derivate und einige andere Substanzklassen (Hidaka *et al.*, 1984; Meyer *et al.*, 1989; Davis *et al.*, 1989; Takahashi *et al.*, 1990). Danach wurden Inhibitoren synthetisiert, die mit dem Peptid- oder Protein-Substrat um die Bindungsstelle konkurrieren (Kemp *et al.*, 1991). Diese Klasse von Inhibitoren bestand vorwiegend aus modifizierten Peptiden, die Consensus-Sequenzen des jeweiligen Substrats enthielten. Für PKA konnte jedoch gezeigt werden, dass Peptide mit minimalen Consensus-Sequenzen nur schlechte Inhibitoren sind und erst längere Peptid-Analoga mit den Sequenzen endogener Substrate von PKA einen signifikanten Inhibitionseffekt haben (Walsh und Glass, 1991). Als nächstes wurden Inhibitoren synthetisiert, die eine Kombination der ersten beiden Inhibitor-Klassen darstellen und sowohl mit ATP als auch dem Peptid- oder Protein-Substrat um die Bindungsstellen konkurrieren. Solche Inhibitoren werden als bi- oder multifunktionelle Inhibitoren bezeichnet. Das besondere Interesse an bifunktionellen Inhibitoren beruht auf der Tatsache, dass einerseits ATP-

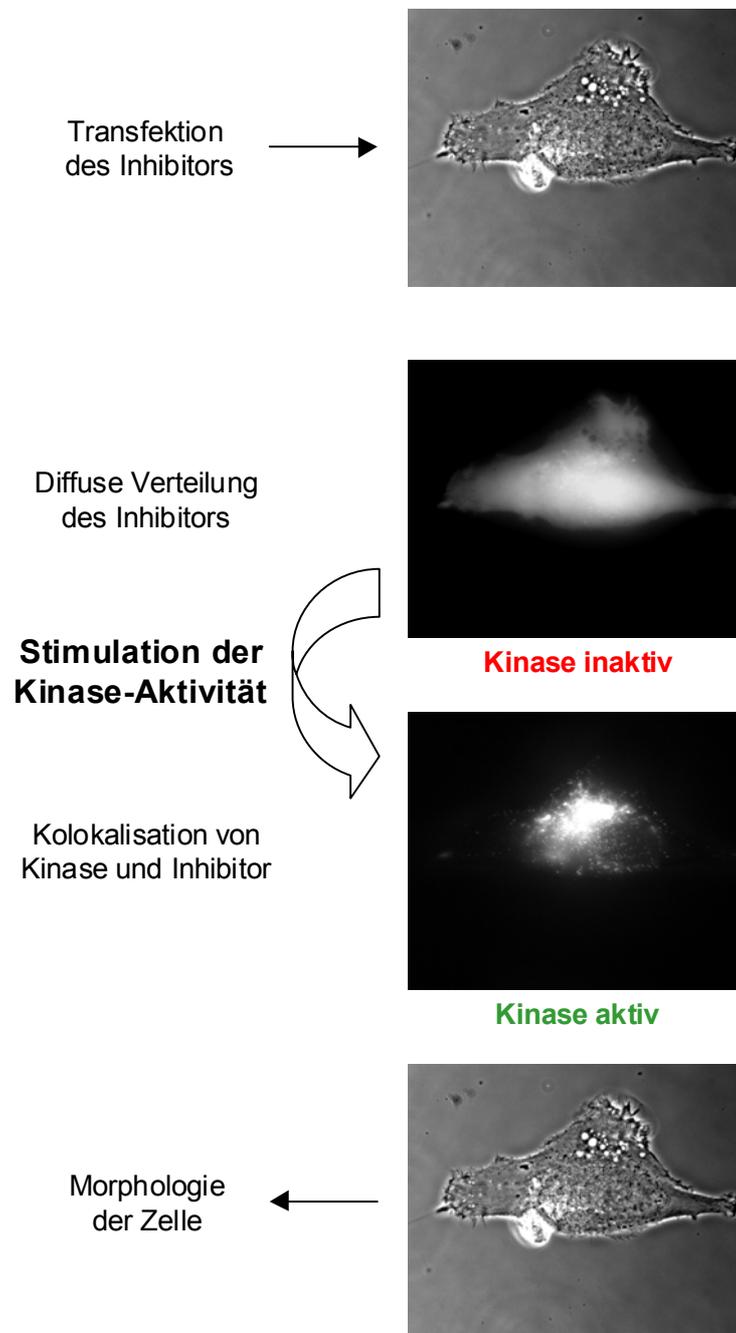
Analoga eine hohe Affinität zu ihren Ziel-Enzymen besitzen und andererseits Peptid-Analoga oftmals spezifisch zwischen eng verwandten Protein-Kinasen diskriminieren können. Ein Inhibitor, der gleichzeitig mit der ATP- und der Peptid- oder Protein-Bindungsstelle konkurriert, sollte daher eine hohe Affinität und eine hohe Spezifität für das Ziel-Enzym besitzen. Im Idealfall würde das Peptid-Analogon des Inhibitors nach Erkennung der Kinase das ATP-Analogon in die zugehörige Bindungsstelle dirigieren.



**Abb. 8:** Strukturen zweier bifunktionaler Inhibitoren der Ser/Thr-Kinase PKA. Einer der ersten synthetisierten bifunktionalen Inhibitoren (A) besteht aus Isoquinolinsulfonsäure, die durch einen Linker kovalent an ein basisches Hepta-Peptid gekoppelt ist. Bei einem neueren Inhibitor (B) ist ein Peptid mit einer Erkennungssequenz für PKA kovalent über eine Phosphodiesterbindung mit Adenosin-Nukleotiden verknüpft.

Die Pionierarbeit basierend auf diesem Prinzip fand auf dem Gebiet der Ser/Thr-Kinasen statt und war die kovalente Kopplung von Isochinolinsulfonsäure und Hexa-Arginin mittels einer Linker-Gruppe (Ricouart *et al.*, 1991). Einige dieser Substanzen inhibieren PKA und Protein-Kinase C (PKC) bei sub-mikromolaren Konzentrationen. Um ein exakteres Modell des Bisubstrat-Komplexes aus ATP und dem Peptid- oder Protein-Substrat zu erhalten, versuchte man den Serin-Rest eines spezifischen PKA-Substrats über eine Phosphodiesterbindung direkt mit Adenosin-Nukleotiden zu koppeln. Diese Substanzen zeigen aber nur mäßige Inhibitionseffekte mit sub-millimolaren  $IC_{50}$ -Werten (Medzihradszky *et al.*, 1994). Daran wird deutlich, dass die Struktur und die Länge des Linkers zur kovalenten Verknüpfung von ATP und dem Peptid-Fragment einen entscheidenden Einfluss auf die Effizienz des Inhibitors haben. Die letzte Klasse von Inhibitoren ist relativ neu und unterscheidet sich durch ihre Wirkungsweise von den anderen Inhibitoren. Hier findet keine Konkurrenz des Inhibitors mit den Bindungsstellen der Protein-Kinase statt, sondern der Inhibitor wechselwirkt mit dem Substrat der Kinase und inhibiert dadurch die Phosphorylierungsreaktion (Lawrence und Niu, 1998).

Protein-Kinase-Inhibitoren haben sich als nützliche biochemische Werkzeuge erwiesen, um Signaltransduktionswege in Zellen zu untersuchen. Neue Methoden zur Visualisierung von Signalwegen in lebenden Zellen können dabei wichtige Informationen über den regulatorischen Einfluss einzelner Protein-Kinasen innerhalb von Signalketten geben.



**Abb. 9:** Idealisierendes Modell zur Visualisierung von Signaltransduktionswegen in lebenden Zellen mittels bifunktionaler Kinase-Inhibitoren. Gezeigt sind Phasenkontrastaufnahmen sowie fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Fibroblasten nach Mikroinjektion verschiedener fluoreszenzmarkierter Substanzen. Durch die unterschiedliche zelluläre Verteilung der Substanzen soll hier eine Kolokalisation von Inhibitor und Kinase nach Aktivierung verdeutlicht werden.

Eine wichtige Voraussetzung für die Visualisierung eines solchen Signalweges ist die Möglichkeit, die Kinase innerhalb der Zelle zu aktivieren und im „angeschalteten“ Zustand zu fixieren. Mit Hilfe mikroskopischer Techniken können die Zellen dann vor und nach Aktivierung der Kinase beobachtet werden, um die Auswirkungen der gezielten Inhibierung dieser Kinase, beispielsweise morphologische Veränderungen, zu untersuchen.

Bifunktionelle Kinase-Inhibitoren scheinen für derartige Anwendungen besonders geeignet zu sein. Ein solcher Inhibitor sollte in lebenden Zellen aufgrund seiner hohen Spezifität und hohen Affinität gezielt an die zu untersuchende Protein-Kinase binden können. Da ein bifunktioneller Inhibitor außerdem den aktivierten Bisubstrat-Komplex aus ATP und dem Peptid- oder Protein-Substrat simuliert, aber gleichzeitig die Übertragung des  $\gamma$ -Phosphats von ATP auf das Substrat verhindert, sollte die Kinase nach Aktivierung und Binden des Inhibitors in ihrem „angeschalteten“ Zustand fixiert bleiben. Um die Lokalisation des Inhibitors und der aktivierten Kinase in der Zelle optisch verfolgen zu können, ist es notwendig, den Inhibitor zusätzlich mit einem geeigneten Fluorophor zu versehen. Mit einem solchen fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Kinase-Inhibitor sollte demnach die Visualisierung entsprechender Signaltransduktionswege möglich sein.

## 2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Titin, auch Connectin genannt, ist das größte bekannte Protein und neben Myosin und Aktin das dritthäufigste Protein in quergestreiften Muskeln. Mit einer Länge von über 1  $\mu\text{m}$  überspannt es die Hälfte eines Sarkomers, wobei der N-Terminus in der Z-Scheibe und der C-Terminus in der M-Linie lokalisiert ist. Titin hat die Funktion einer „molekularen Feder“, die den entspannten Muskeln ihre Elastizität verleiht. Daneben wird vermutet, dass Titin als ein „*molecular ruler*“ während der Myofibrillogenese entscheidend an der zeitlichen und örtlichen Positionierung anderer sarkomerischer Proteine beteiligt ist. Im C-terminalen Bereich von Titin befindet sich eine Ser/Thr-Kinase-Domäne, die auch als Titin-Kinase bezeichnet wird. Neben dieser Kinase-Domäne besitzt Titin noch Phosphorylierungsstellen für andere Kinasen und Bindungsstellen für eine Reihe weiterer sarkomerischer Proteine. Damit scheint Titin in besonderem Maße an der Signaltransduktion innerhalb des Sarkomers beteiligt zu sein. Über die natürlichen Regulatoren und Substrate der Titin-Kinase ist jedoch nur sehr wenig bekannt und ihre genaue Einbindung in Signaltransduktionswege des Muskels ist daher weitgehend unverstanden. Eine Methode zur Visualisierung von Signalwegen in lebenden Muskelzellen könnte daher wertvolle Informationen über die Beteiligung der Titin-Kinase an Signalwegen des Sarkomers liefern. Aufgrund ihrer Eigenschaften scheinen bifunktionelle Kinase-Inhibitoren ideale biochemische Werkzeuge für solche Untersuchungen zu sein. Entsprechende fluoreszenzmarkierte Analoga könnten dabei eine Visualisierung dieser Signalwege mittels mikroskopischer Techniken ermöglichen.

Ziel dieser Arbeit ist es, für ausgesuchte Enzyme aus der Gruppe der Ser/Thr-Kinasen fluoreszenzmarkierte bifunktionelle Inhibitoren zu synthetisieren und zu untersuchen, ob diese für eine Visualisierung von Signalwegen in lebenden Muskelzellen verwendet werden können. Die Synthese der Inhibitoren soll dabei über eine kovalente Verknüpfung von ATP und Peptid-Fragmenten mittels eines geeigneten Linkers erfolgen. Um fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen in Zellen durchführen zu können, sollen die Inhibitoren zusätzlich mit einem Fluorophor markiert werden. Stellvertretend für die Klasse der Ser/Thr-Kinasen soll anhand der cAMP-abhängigen Protein-Kinase (PKA) als Modellsystem untersucht werden, ob das Bisubstrat-Prinzip zu einer erhöhten Affinität des Inhibitors gegenüber der Kinase führt und eine Kolo-kalisierung des fluoreszenzmarkierten Inhibitors und der Ziel-Kinase in Zellen beobachtet werden kann. An einem zweiten Modellsystem, der MLCK aus Skelettmuskel (skmMLCK) und glatter Muskulatur (smMLCK) soll weiterhin untersucht werden, ob durch gezielte Auswahl der Peptid-Fragmente eine Diskriminierung nahe verwandter Protein-Kinasen möglich ist und damit

neben einer hohen Affinität auch eine hohe Spezifität der Inhibitoren erreicht werden kann. Dies soll ebenfalls anhand von Lokalisationsexperimenten in Zellen überprüft werden.

Aufgrund ihrer Eigenschaften sollten bifunktionelle Inhibitoren auch geeignete Liganden für die Affinitätschromatographie von Protein-Kinasen darstellen. Daher soll untersucht werden, ob die Generierung einer spezifischen Inhibitor-Affinitätsmatrix möglich ist, die zur Reinigung oder Identifizierung von Protein-Kinasen aus Zelllysaten genutzt werden kann.

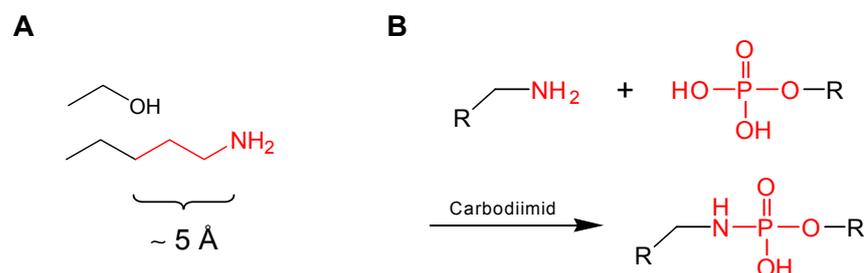
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Synthese eines fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitors für PKA

Als Modellsystem für die Synthese eines fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitors für ein Enzym der Gruppe der Ser/Thr-Kinasen wird die cAMP-abhängige Protein-Kinase (PKA) ausgewählt, da sie eine der biochemisch am besten untersuchten Kinasen ist und einige ihrer natürlichen Substrate bekannt sind. In der Literatur finden sich verschiedene Ansätze für die Synthese von bifunktionellen Ser/Thr- und Tyr-Kinase-Inhibitoren, die sich jedoch zum Teil erheblich in der Auswahl der einzelnen Inhibitor-Komponenten sowie der beobachteten Inhibition unterscheiden (Kruse *et al.*, 1988a, b; Ricouart *et al.*, 1991; Medzihradzky *et al.*, 1994; Mett *et al.*, 1997; Loog *et al.*, 1999; Parang *et al.*, 2001). Bei einem dieser Inhibitoren ist ein Adenosin-Nukleotid über Phosphodiesterbindungen kovalent an das Serin des Kemptide-Peptids, welches ein Substrat für PKA darstellt, gekoppelt (Medzihradzky *et al.*, 1994). Im Vergleich zu anderen bifunktionellen Inhibitoren simuliert dieser von seiner Struktur ein genaueres Modell des Bisubstrat-Komplexes aus ATP und dem Peptid- oder Protein-Substrat während des Phosphoryltransfers. Der Abstand zwischen dem Peptid-Fragment und dem Nukleotid wird hier durch die Anzahl der Phosphodiesterbindungen variiert (siehe Abbildung 8). Die größte Inhibition von PKA erhält man für zwei Phosphodiesterbindungen ( $n=2$ ), also für das entsprechende Tetraphosphat. Der Abstand des Serin-Sauerstoffatoms des Peptids zum  $\gamma$ -Phosphoratom des Nukleotids beträgt hier etwa 5 Å. Die entsprechenden Verbindungen mit einer ( $n=1$ ) und keiner ( $n=0$ ) Phosphodiesterbindung zeigen für die Inhibition von PKA  $IC_{50}$ -Werte, die um das drei- bzw. vierzehnfache größer sind. Der Linker ist in diesen Fällen möglicherweise zu kurz, um eine gleichzeitige Wechselwirkung mit beiden Bindungsstellen des Enzyms zu ermöglichen. Als Ansatzpunkt für die Synthese eines neuen bifunktionellen Inhibitors für PKA soll der Linker zwischen dem Peptid-Fragment und ATP daher ebenfalls eine Länge von etwa 5 Å haben um einen geeigneten Donor-Akzeptor-Abstand zu ermöglichen. Dadurch soll sichergestellt werden, dass der Linker lang genug ist, um die Distanz beider Bindungsstellen zu überbrücken. Wahrscheinlich spielt neben dem Abstand aber auch die Art und Struktur des Linkers eine erhebliche Rolle. Daher soll ein flexibler und sterisch anspruchloser Linker verwendet werden.

### 3.1.1 Design eines bifunktionellen Inhibitors für PKA

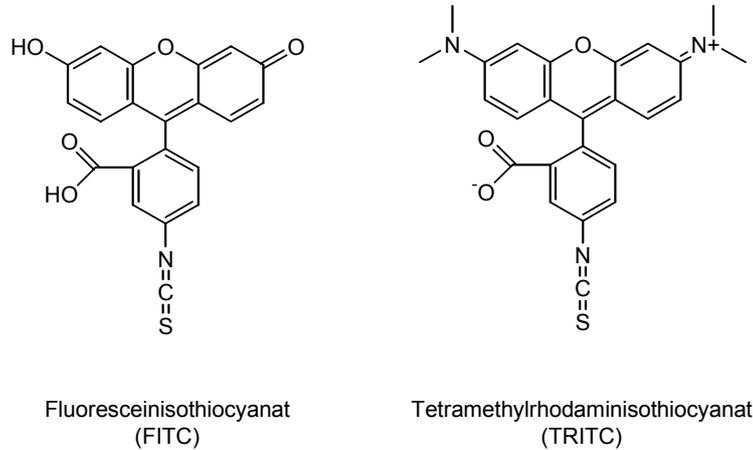
Das Peptid-Fragment des Inhibitors soll eine Erkennungssequenz für die ausgewählte Protein-Kinase enthalten. Als Peptid-Substrat wird das synthetische Peptid [V6, A7]-Kemptide ausgesucht. Von der AS-Sequenz entspricht das Peptid der Phosphorylierungsregion der Pyruvat-Kinase (aus Leber) und ist ein geeignetes Substrat für PKA (Edlund *et al.*, 1977; Berglund *et al.*, 1977). Um den aktivierten Bisubstrat-Komplex des Peptid-Substrats und ATP zu simulieren, soll der kovalente Linker einen geeigneten Donor-Akzeptor-Abstand ermöglichen, der in Näherung dem Abstand des Serin-Sauerstoffatoms zum  $\gamma$ -Phosphoratom während des Phosphoryltransfers entspricht. Außerdem soll der Linker flexibel und sterisch anspruchslos sein. Dies kann durch den Austausch des zu phosphorylierenden Serin-Restes innerhalb des [V6, A7]-Kemptide-Peptids gegen ein Lysin erreicht werden, da die Aminobutyl-Seitenkette des Lysins diese Anforderungen erfüllt. Gleichzeitig enthält die Seitenkette mit der primären Aminogruppe eine geeignete Funktionalität zur Vernüpfung mit dem  $\gamma$ -Phosphat des Nukleotids. Die kovalente Verknüpfung beider Inhibitor-Teile sollte beispielsweise über eine Carbodiimid-Kopplung möglich sein.



**Abb. 10:** Verwendung von Lysin als kovalenten Linker zwischen der Peptid- und Nukleotid-Komponente des bifunktionellen Inhibitors. (A) Die Aminobutyl-Gruppe des Lysins fixiert die beiden Komponenten in einem Abstand der ungefähr dem Donor-Akzeptor-Abstand während des Phosphoryltransfers entspricht. (B) Die primäre Aminogruppe der Lysin-Seitenkette erlaubt eine Carbodiimid-vermittelte Kopplung mit dem  $\gamma$ -Phosphat-Rest von ATP.

Um Nebenreaktionen mit der freien Carboxyl-Gruppe des Alanins während einer Carbodiimid-Kopplung zu verhindern, wird das Peptid C-terminal amidiert. Die Markierung mit dem Fluorophor soll am freien N-Terminus des Peptids erfolgen, um einen größtmöglichen Abstand zu der Linkerregion zu erreichen. Die N-terminale primäre Aminogruppe des Leucins muss daher während einer Carbodiimid-Kopplung ebenfalls geschützt werden. Als geeignete Schutzgruppe wird die Fmoc-Gruppe ausgewählt, da diese unter milden, leicht basischen Bedingungen abgespalten werden kann. Als Fluorophore sollen Fluorescein und Tetramethylrhodamin verwendet werden. Eine

Fluoreszenzmarkierung des Inhibitors kann nach Fmoc-Abspaltung durch Umsetzung der N-terminalen primären Aminogruppe mit entsprechenden Isothiocyanaten erreicht werden.



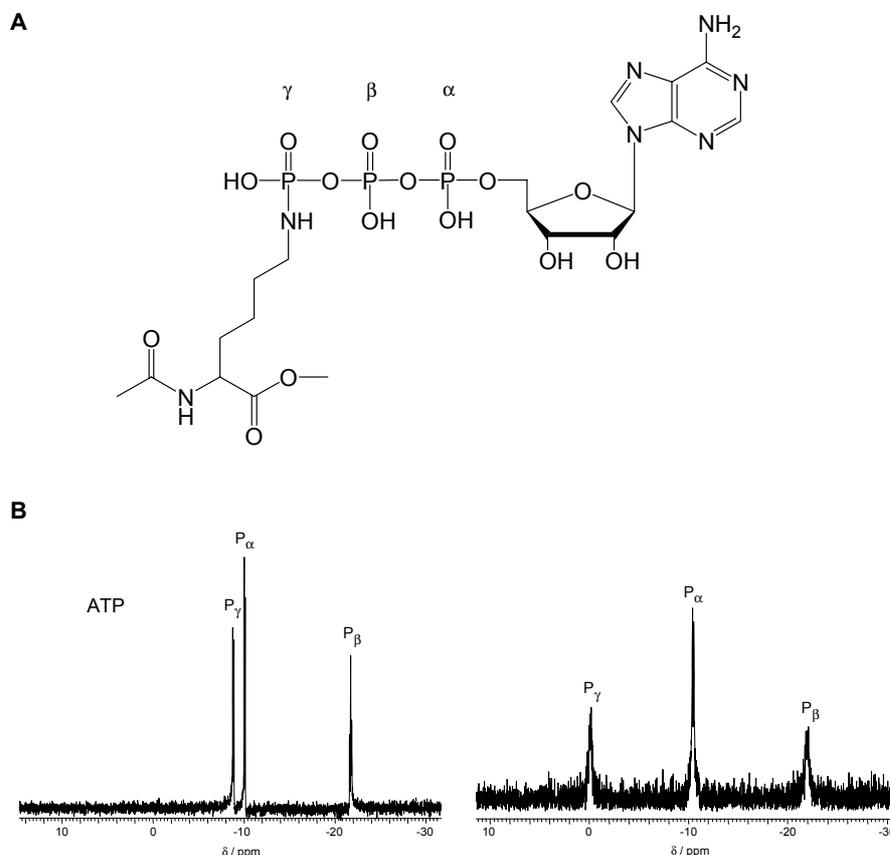
**Abb. 11:** Strukturen von Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC).

### 3.1.2 Synthese von P<sup>3</sup>-(N<sup>ε</sup>-(N-acyl-O-methyl)-lysyl)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat 1

Das Peptid-Fragment soll über die primäre Aminogruppe des Lysin-Linkers kovalent mit dem  $\gamma$ -Phosphat von ATP verknüpft werden. Eine solche Kopplung ist mit Hilfe von Carbodiimiden möglich, die neben Carboxyl-Gruppen auch Phosphat-Gruppen für eine Kondensation mit primären Aminen aktivieren können. Das bekannteste und am häufigsten verwendete Carbodiimid ist Dicyclohexylcarbodiimid (DCC). Die Bildung eines Phosphoramidats aus einer primären Aminogruppe und dem  $\gamma$ -Phosphat von ATP ist mit diesem Reagenz möglich (Knorre *et al.*, 1976). Der Nachteil liegt jedoch darin, dass DCC wasserunlöslich ist und die Reaktion in wasserfreien organischen Lösungsmitteln erfolgen muss. Daher wird für die durchgeführten Kopplungen das gut wasserlösliche 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) ausgewählt, um eine Reaktion in wässrigen Puffern zu ermöglichen.

Um sicherzustellen, dass die gewünschte Carbodiimid-Kopplung des Peptid-Fragments und ATP über die  $\epsilon$ -Aminogruppe der Lysin-Seitenkette möglich ist, wird zuerst eine Umsetzung mit Lysin durchgeführt. Zur Vermeidung von Nebenreaktionen ist das Lysin N-terminal acetyliert und C-terminal O-methyliert. Für die Kopplung wird ATP mit EDC aktiviert und anschließend mit dem geschützten Lysin (Ac-Lys-OMe) umgesetzt. Nach Reinigung mit Anionenaustauscher-Chromatographie und weiterer Aufarbeitung erhält

man das Phosphoramidat **1** mit einer Ausbeute von 44 %. Die Identifizierung von  $P^3$ -( $N^\epsilon$ -(N-acyl-O-methyl)-lysyl)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **1** erfolgt mittels HPLC, MS,  $^1H$ - und  $^{31}P$ -NMR.



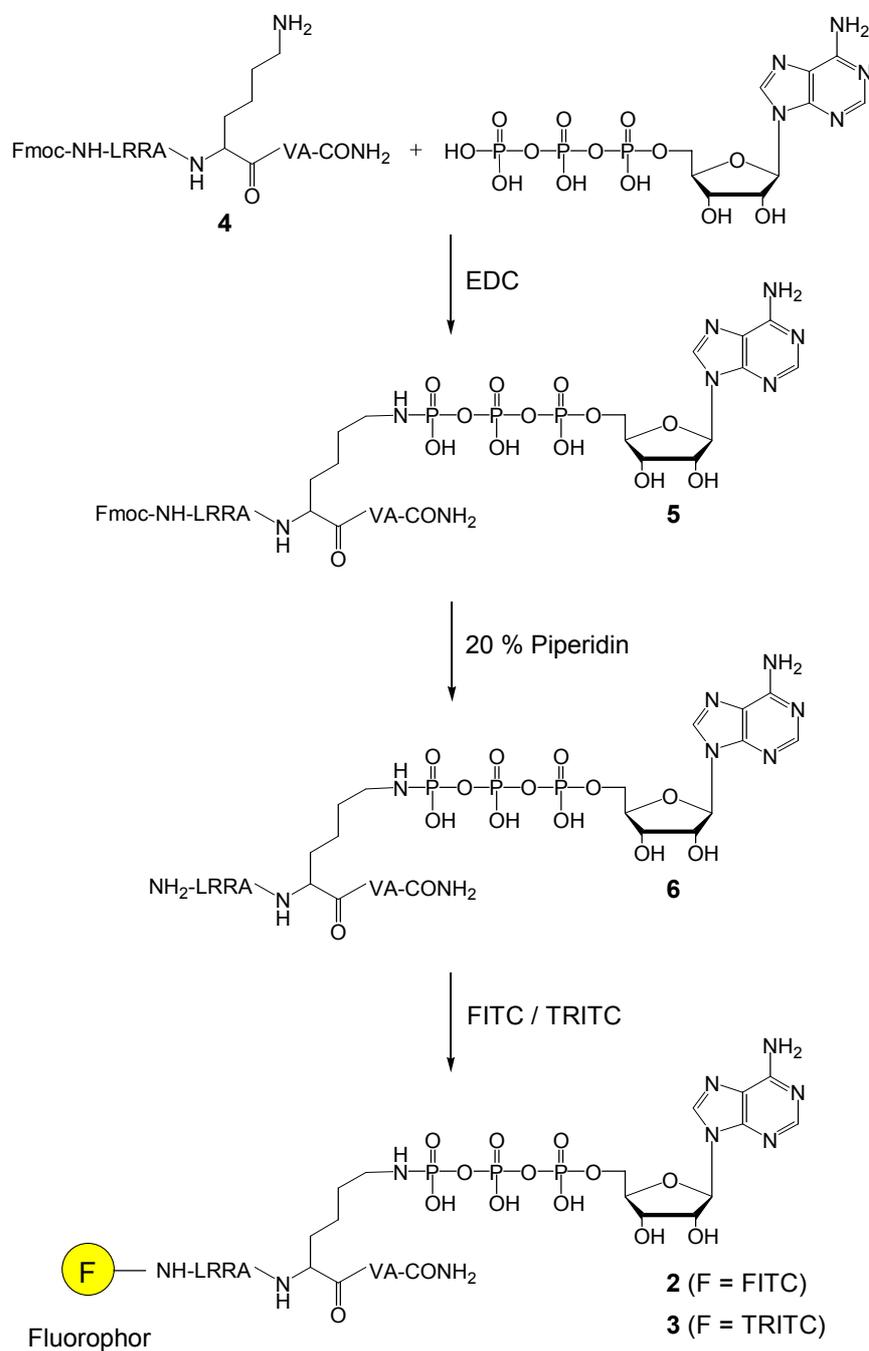
**Abb. 12:** (A) Struktur von  $P^3$ -( $N^\epsilon$ -(N-acyl-O-methyl)-lysyl)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **1**. (B)  $^{31}P$ -NMR-Spektren von ATP und dem Phosphoramidat **1**, welches eine deutliche Tieffeldverschiebung des Signals für das  $P_\gamma$ -Atom aufgrund der  $\gamma$ -Phosphat-Modifikation zeigt.

Die Modifikation von ATP am  $\gamma$ -Phosphat ist an der Tieffeldverschiebung des Signals für das  $\gamma$ -Phosphoratom im  $^{31}P$ -NMR-Spektrum deutlich zu erkennen. Die beobachtete relative Masse von 690.1 für **1** stimmt gut mit der berechneten Molmasse überein.

### 3.1.3 Synthese von $P^3$ -( $N^\epsilon$ -(N-FITC-[K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide)-lysyl)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **2** und $P^3$ -( $N^\epsilon$ -(N-TRITC-[K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide)-lysyl)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **3**

Die Synthese der beiden fluoreszenzmarkierten Inhibitoren erfolgt ausgehend von dem N-Fmoc-[K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide-Peptid **4**. Für die Kopplung wird ATP mit EDC aktiviert und anschließend mit Peptid **4** umgesetzt. Für eine Testabspaltung der Fmoc-

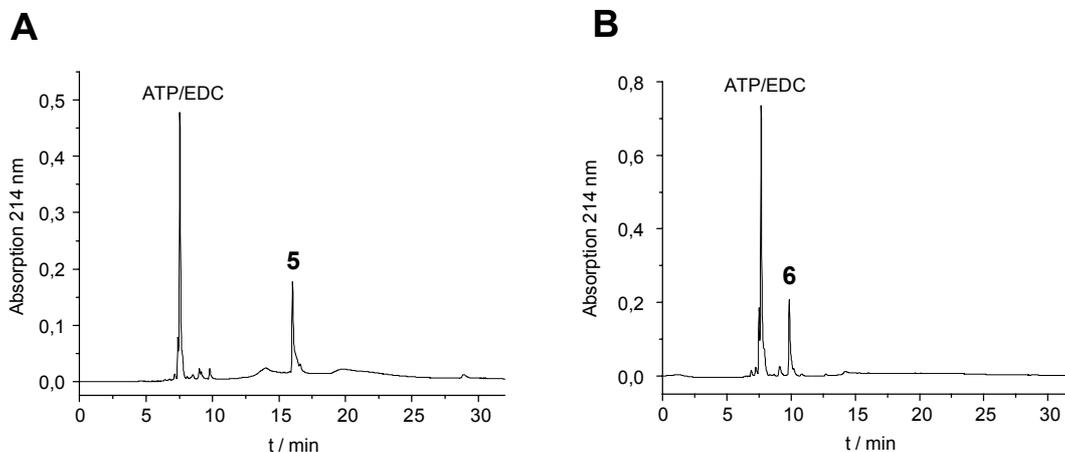
Gruppe wird dem Reaktionsansatz vor Reinigung ein Aliquot entnommen und mit 20 % Piperidin versetzt.



**Abb. 13:** Syntheschema für P<sup>3</sup>-(N<sup>ε</sup>-(N-FITC-[K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide)-lysyl)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **2** und P<sup>3</sup>-(N<sup>ε</sup>-(N-TRITC-[K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide)-lysyl)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **3**.

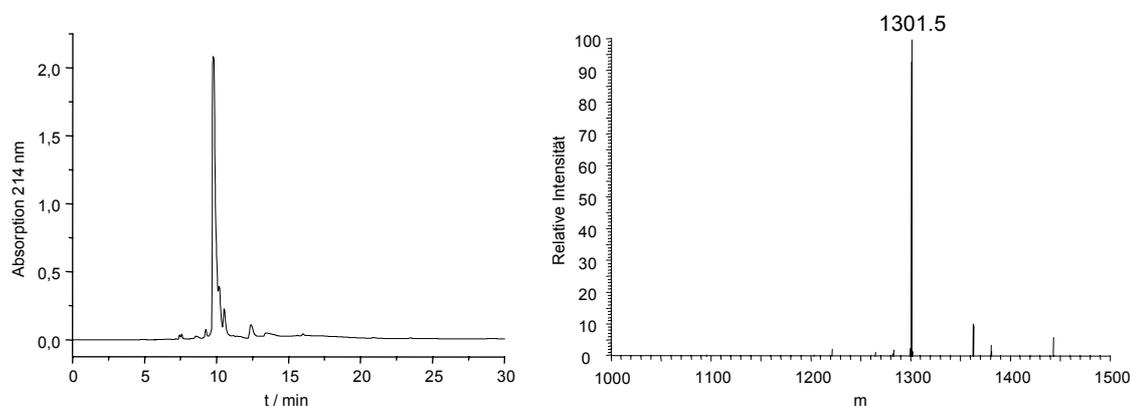
Im HPLC-Chromatogramm des Reaktionsansatzes erkennt man einen Peak bei 7.5 min, der von nicht umgesetzten ATP/EDC stammt. Der Peak bei 16.0 min ist dem geschützten P<sup>3</sup>-(N<sup>ε</sup>-(N-Fmoc-[K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide)-lysyl)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **5** zuzuordnen. Nach 30 min wird das mit 20 % Piperidin versetzte Aliquot mit HPLC analysiert. Im

HPLC-Chromatogramm erkennt man einen neuen Peak bei 9.8 min, der dem entschützten  $P^3$ -( $N^{\epsilon}$ -([K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide)-lysyl)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **6** zugeordnet werden kann.



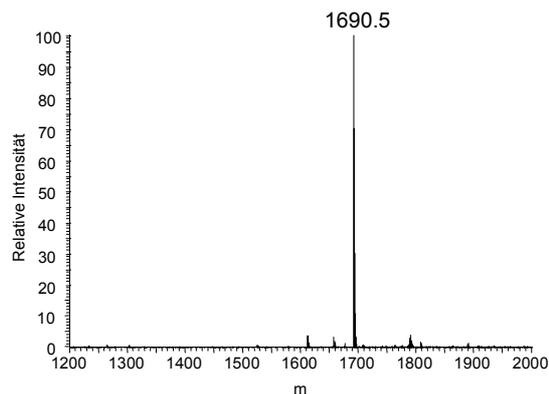
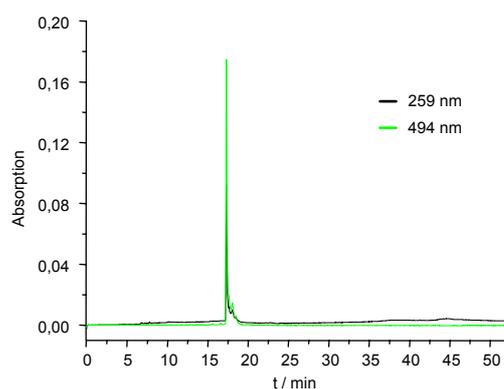
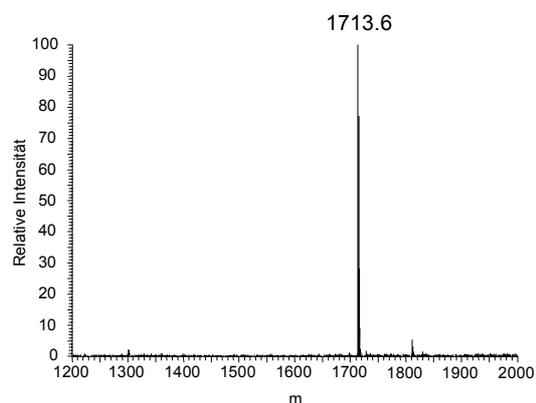
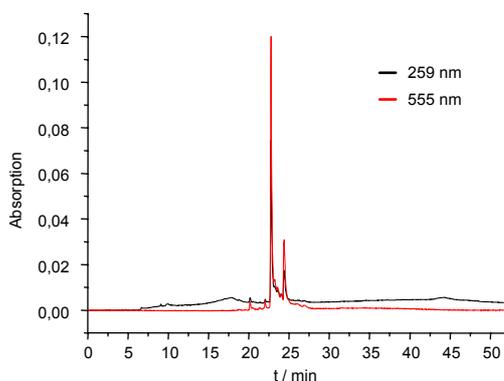
**Abb. 14:** HPLC-Chromatogramme der Testabspaltung der Fmoc-Gruppe. (A) Kopplung von ATP/EDC mit Petid **4** führt zu dem geschützten Addukt **5**. (B) Bildung des entschützten Addukts **6** nach Behandeln mit 20 % Piperidin für 30 min.

Die Entschützung verläuft unter diesen Bedingungen nahezu vollständig. Die beiden Peaks bei 16.0 min und 9.8 min werden gesammelt und die Verbindungen mittels MS identifiziert. Die beobachteten relativen Massen von 1523.5 für **5** und 1301.7 für **6** stimmen gut mit den berechneten Molmassen überein. Der Reaktionsansatz wird nach der Kopplung mit HPLC gereinigt. Zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe wird **5** mit 20 % Piperidin behandelt. Nach Reinigung mit HPLC erhält man das entschützte Addukt **6**. Die Ausbeute wird nicht bestimmt. Die Identifizierung von  $P^3$ -( $N^{\epsilon}$ -([K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide)-lysyl)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **6** erfolgt mittels HPLC und MS.



**Abb. 15:** HPLC-Chromatogramm und Massenspektrum von  $P^3$ -( $N^{\epsilon}$ -([K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide)-lysyl)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **6** nach Reinigung.

Die N-terminale Fluoreszenzmarkierung des entschützten Addukts **6** erfolgt sowohl mit FITC als auch mit TRITC. Dazu wird **6** mit dem jeweiligen Isothiocyanat umgesetzt. Nach Reinigung mit HPLC erhält man die fluoreszenzmarkierten Verbindungen **2** und **3**. Die Ausbeuten werden nicht bestimmt. Die Identifizierung der fluoreszenzmarkierten Inhibitoren erfolgt mittels HPLC und MS.

**A****B**

**Abb. 16:** HPLC-Chromatogramme und Massenspektren von (A)  $P^3$ -( $N^\epsilon$ -(N-FITC-[K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide)-lysyl)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **2** und (B)  $P^3$ -( $N^\epsilon$ -(N-TRITC-[K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide)-lysyl)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **3** nach Reinigung.

Der Peak im HPLC-Chromatogramm (A) bei 17.3 min zeigt Absorption bei 259 nm und 494 nm und kann eindeutig dem Fluorescein-markierten  $P^3$ -( $N^\epsilon$ -(N-FITC-[K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide)-lysyl)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **2** zugeordnet werden. Der Peak im HPLC-Chromatogramm (B) bei 22.8 min zeigt Absorption bei 259 nm und 555 nm und ist eindeutig dem Tetramethylrhodamin-markierten  $P^3$ -( $N^\epsilon$ -(N-TRITC-[K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide)-lysyl)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **3** zuzuordnen. Daneben ist bei 24.4 min eine fluoreszierende Verunreinigung zu erkennen, die jedoch nicht identifiziert werden kann.

Von den fluoreszenzmarkierten Addukten werden Massenspektren aufgenommen. Die beobachteten relativen Massen von 1690.5 für **2** und 1713.6 für **3** stimmen gut mit den berechneten Molmassen überein.

Für die HPLC-Reinigungen der Inhibitoren wird ein Puffersystem mit TEAHCO<sub>3</sub> verwendet, da die acide Pufferkomponente besonders leicht flüchtig ist. Bei anderen Puffersystemen, wie zum Beispiel TEAAc, wird ein Zerfall der säurelabilen Phosphoramidate beim Lyophilisieren beobachtet.

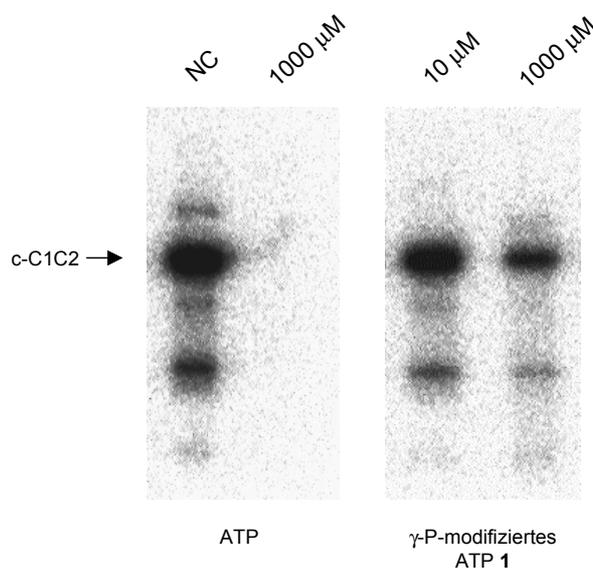
### **3.2 Untersuchung der Inhibition von PKA durch die fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitoren**

Um die Inhibition von PKA durch die synthetisierten fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitoren **2** und **3** zu untersuchen, werden Verdrängungsexperimente mit radioaktiv markiertem [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP durchgeführt. Es wird dabei die Inhibierung der Phosphorylierung eines PKA-Substrats durch die katalytische Untereinheit von PKA (PKA-C) untersucht. Die verwendete PKA-C stammt aus eigener Präparation (Franzen, 1999). Als Kinase-Substrat wird das c-C1C2-Fragment (34.8 kD) des Myosin-bindenden Protein C (MyBP-C) verwendet (Mathias Grün, MPI, Dortmund). Dieses Fragment enthält das Phosphorylierungsmotiv von MyBP-C und wird *in vivo* von PKA phosphoryliert (Gautel *et al.*, 1995a). Aus der beobachteten Verdrängung von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP durch die nicht radioaktiv markierten Substrate kann dabei die Inhibierung der Phosphorylierungsreaktion qualitativ abgeschätzt werden.

Ein Inhibitor der auf dem Bisubstrat-Prinzip beruht, sollte eine höhere Affinität für seine Ziel-Kinase haben als die entsprechenden monovalenten Inhibitoren. Im Vergleich zu dem natürlichen Peptid-Substrat und ATP werden die beiden Komponenten des Inhibitors durch die kovalente Verknüpfung modifiziert. Dies sollte zu einer Erniedrigung der Affinität der Einzelkomponenten des Inhibitors gegenüber der Protein-Kinase führen. Im Idealfall sollte aber das gleichzeitige Binden des bifunktionellen Inhibitors an beide Substrat-Bindungsstellen diese Affinitätsverluste um ein Vielfaches ausgleichen. Um die Inhibition von PKA-C durch das  $\gamma$ -Phosphat-modifizierte Nukleotid **1** und das modifizierte Peptid **4** mit den synthetisierten fluoreszenzmarkierten Inhibitoren **2** und **3** vergleichen zu können, werden daher zuerst Verdrängungsexperimente mit den modifizierten Inhibitor-Komponenten durchgeführt.

### 3.2.1 Verdrängungsexperiment mit $P^3$ -( $N^\epsilon$ -(N-acyl-O-methyl)-lysyl)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **1** und N-Fmoc-[K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide **4**

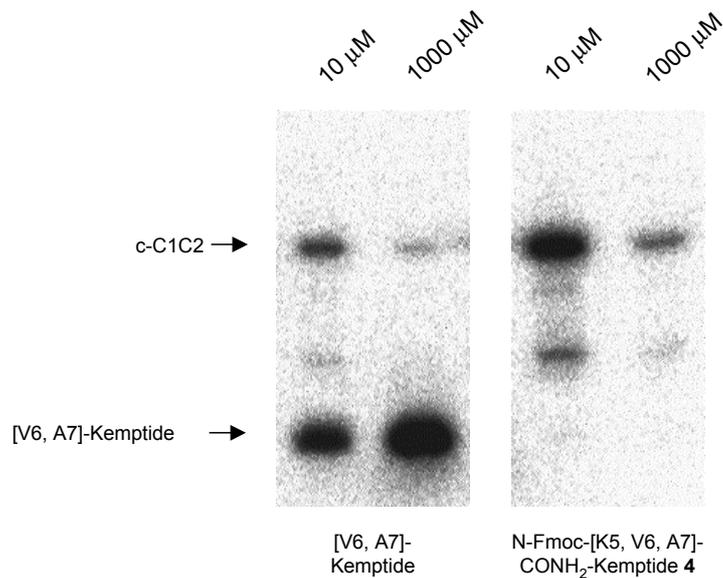
Die Phosphorylierungsansätze enthalten das c-C1C2-Fragment, radioaktiv markiertes [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP und 10 bzw. 1000  $\mu$ M der nicht radioaktiv markierten Verbindungen **1** und **4** in Phosphorylierungspuffer. Als Vergleichsproben dienen ATP und das nicht modifizierte [V6, A7]-Kemptide-Peptid. Die Expositionszeit für die Autoradiogramme beträgt jeweils 5 min.



**Abb. 17:** Autoradiogramme der Verdrängung von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP durch ATP und  $P^3$ -( $N^\epsilon$ -(N-acyl-O-methyl)-lysyl)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **1** bei der Phosphorylierung von c-C1C2 durch PKA-C.

In den Autoradiogrammen in Abbildung 17 ist die Verdrängung von radioaktiv markiertem [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP durch ATP und das  $\gamma$ -Phosphat-modifizierte  $P^3$ -( $N^\epsilon$ -(N-acyl-O-methyl)-lysyl)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **1** bei der Phosphorylierungsreaktion des c-C1C2-Fragments durch PKA-C zu erkennen. Als Vergleich wird die Phosphorylierung auch in Abwesenheit von ATP durchgeführt. Man sieht deutlich die Bande für das <sup>32</sup>P-phosphorylierte c-C1C2-Fragment. Die anderen schwächeren Banden sind auf phosphorylierte Verunreinigungen, die aus der verwendeten PKA-C stammen, zurückzuführen. In Gegenwart von 1000  $\mu$ M ATP ist keine Bande mehr für das c-C1C2-Fragment zu beobachten. Bei dieser Konzentration findet eine vollständige Verdrängung des radioaktiv markierten [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP durch das natürliche Nukleotid-Substrat ATP statt. Für das  $\gamma$ -Phosphat-modifizierte  $P^3$ -( $N^\epsilon$ -(N-acyl-O-methyl)-lysyl)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **1** ist bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M eine ganz schwache, bei 1000  $\mu$ M eine stärkere Verdrängung zu erkennen. Im Vergleich

zu ATP ist die Verdrängung durch das modifizierte Nukleotid **1** bei gleicher Konzentration jedoch viel geringer.

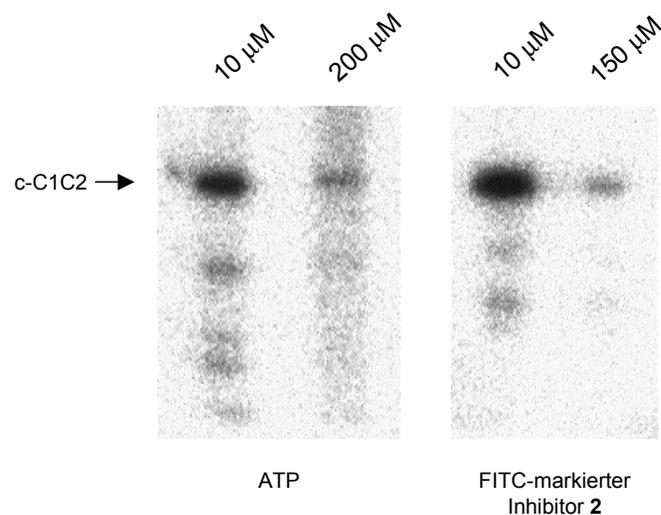


**Abb. 18:** Autoradiogramme der Verdrängung von  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  durch [V6, A7]-Kemptide und N-Fmoc-[K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide **4** bei der Phosphorylierung von c-C1C2 durch PKA-C.

In den Autoradiogrammen in Abbildung 18 ist die Verdrängung von radioaktiv markiertem  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  durch das [V6, A7]-Kemptide-Peptid und das modifizierte N-Fmoc-[K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide-Peptid **4** bei der Phosphorylierungsreaktion des c-C1C2-Fragments durch PKA-C zu erkennen. In Gegenwart von 10 und 1000 μM des [V6, A7]-Kemptide-Peptids beobachtet man eine starke bzw. sehr starke Abschwächung der Bande für das <sup>32</sup>P-phosphorylierte c-C1C2-Fragment. Daneben sind im unteren Teil des Autoradiogramms neue, intensive Bande zu sehen. Diese Banden sind dem <sup>32</sup>P-phosphorylierten [V6, A7]-Kemptide-Peptid zuzuordnen, welches ein gutes Substrat für PKA ist und mit dem c-C1C2-Fragment um die Bindungsstelle des Enzyms konkurriert. In Gegenwart von 10 und 1000 μM des modifizierten N-Fmoc-[K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide-Peptids **4** ist eine schwache bzw. starke Abschwächung der Bande für das <sup>32</sup>P-phosphorylierte c-C1C2-Fragment zu erkennen. Bei gleichen Konzentrationen ist die Abschwächung der Banden durch das [V6, A7]-Kemptide-Peptid jedoch stärker als durch das modifizierte N-Fmoc-[K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide-Peptid **4**.

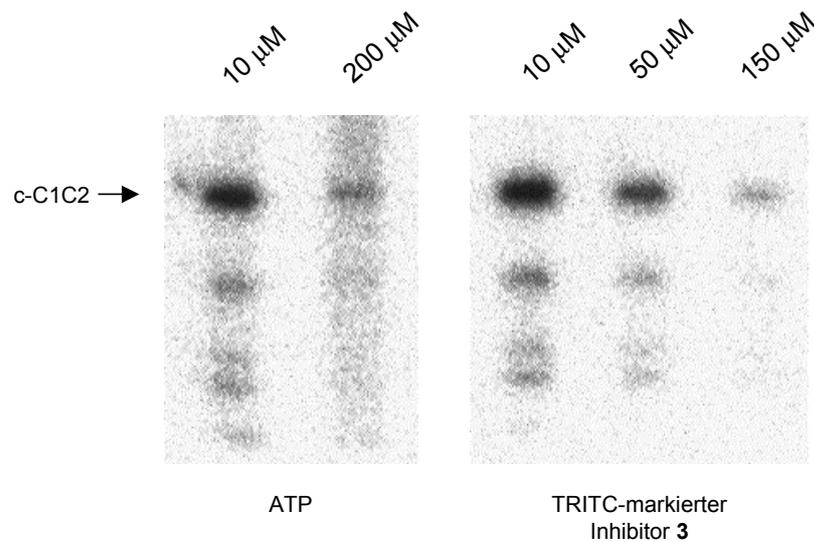
### 3.2.2 Verdrängungsexperiment mit $P^3$ -( $N^\epsilon$ -(N-FITC-[K5, V6, A7]- $CONH_2$ -Kemptide)-lysyl)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **2** und $P^3$ -( $N^\epsilon$ -(N-TRITC-[K5, V6, A7]- $CONH_2$ -Kemptide)-lysyl)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **3**

Um zu sehen, ob bei den synthetisierten bifunktionellen Inhibitoren **2** und **3** die Kopplung über das Lysin ebenfalls einen erheblichen abschwächenden Einfluss auf die Affinität zu PKA-C hat oder aufgrund des Bisubstrat-Prinzips diese Affinitätsverluste ausgeglichen werden können, werden ebenfalls Verdrängungsexperimente durchgeführt.



**Abb. 19:** Autoradiogramme der Verdrängung von  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  durch ATP und  $P^3$ -( $N^\epsilon$ -(N-FITC-[K5, V6, A7]- $CONH_2$ -Kemptide)-lysyl)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **2** bei der Phosphorylierung von c-C1C2 durch PKA-C.

In den Autoradiogrammen in Abbildung 19 ist die Verdrängung von radioaktiv markiertem  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  durch ATP und  $P^3$ -( $N^\epsilon$ -(N-FITC-[K5, V6, A7]- $CONH_2$ -Kemptide)-lysyl)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **2** bei der Phosphorylierungsreaktion des c-C1C2-Fragments durch PKA-C zu erkennen. Bei einer Konzentration von 10 µM beobachtet man für ATP eine schwache Verdrängung. Dagegen ist bei einer Konzentration von 200 µM ATP bereits eine sehr starke Verdrängung zu erkennen, was die hohe Affinität des natürlichen Nukleotid-Substrats für die Protein-Kinase widerspiegelt. Für den Fluorescein-markierten bifunktionellen Inhibitor **2** ist bei 10 µM ebenfalls eine schwache Verdrängung und bereits bei 150 µM eine sehr starke Verdrängung zu sehen. Im Vergleich zu ATP scheint der Inhibitor **2** die Phosphorylierung des c-C1C2-Fragments auch bei der etwas kleineren Konzentration in gleichem Maße zu inhibieren.



**Abb. 20:** Autoradiogramme der Verdrängung von  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  durch ATP und  $\text{P}^3\text{-(N}^\epsilon\text{-(N-TRITC-[K5, V6, A7]-CONH}_2\text{-Kemptide)-lysyl)-P}^1\text{-adenosin-triphosphat 3}$  bei der Phosphorylierung von c-C1C2 durch PKA-C.

In den Autoradiogrammen in Abbildung 20 ist die Verdrängung von radioaktiv markiertem  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  durch ATP und  $\text{P}^3\text{-(N}^\epsilon\text{-(N-TRITC-[K5, V6, A7]-CONH}_2\text{-Kemptide)-lysyl)-P}^1\text{-adenosin-triphosphat 3}$  bei der Phosphorylierungsreaktion des c-C1C2-Fragments durch PKA-C zu erkennen. Hier zeigt sich für **3** bei 10  $\mu\text{M}$  ebenfalls eine schwache Verdrängung. Bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  beobachtet man eine stärkere Verdrängung und bei 150  $\mu\text{M}$ , wie bereits zuvor bei dem Fluorescein-markierten Inhibitor **2**, eine sehr starke Inhibition der Phosphorylierungsreaktion.

Sowohl der FITC- als auch der TRITC-markierte bifunktionelle Inhibitor führt zu einer Inhibition der Phosphorylierungsreaktion eines Protein-Substrats von PKA, die vergleichbar mit der Verdrängung durch das natürliche Nukleotid-Substrat ATP ist.

### 3.3 Synthese eines neuen fluoreszenzmarkierten ATP-Analogs

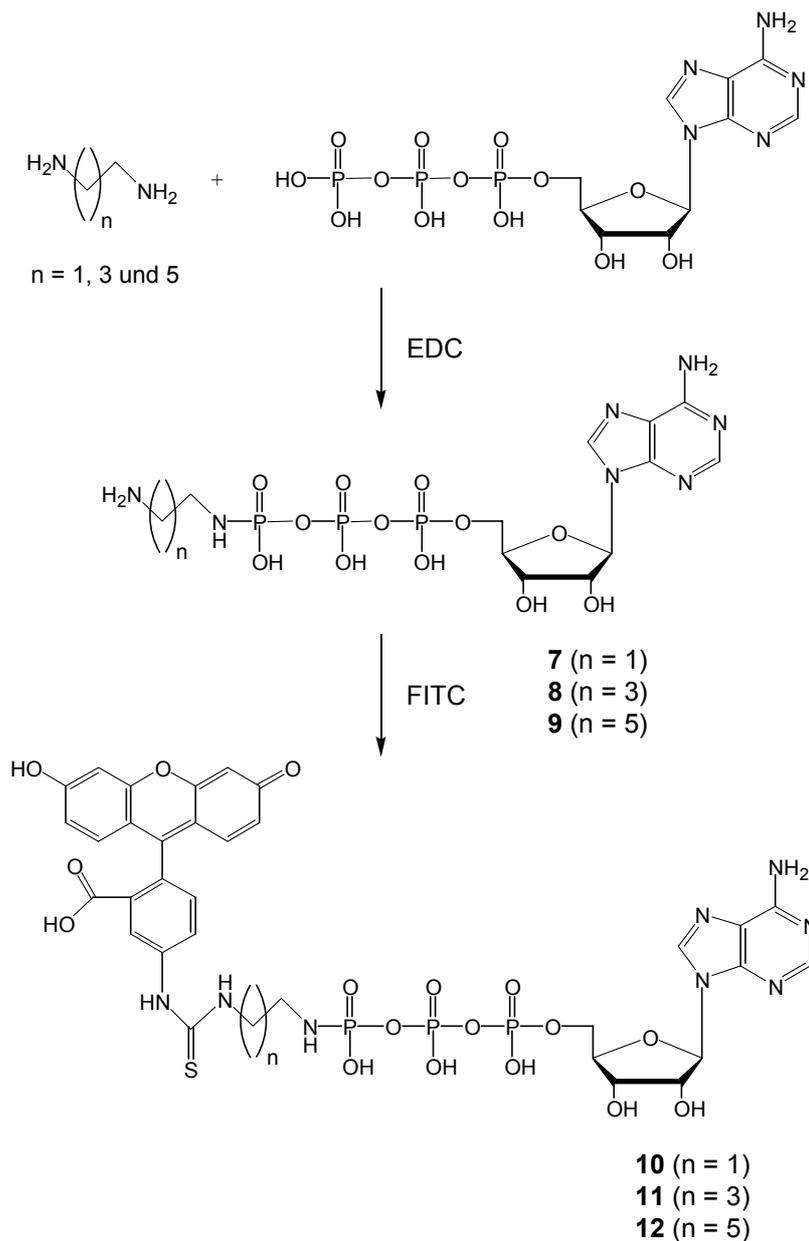
Um eine Lokalisation der fluoreszenzmarkierten Inhibitoren in Zellen zu ermöglichen, ist die Ausarbeitung einer geeigneten Methode zur Transfektion dieser Substanzen notwendig. Da aber nur begrenzte Mengen der fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitoren **2** und **3** zur Verfügung stehen, soll für die notwendigen Transfektionstests eine fluoreszenzmarkierte Substanz in größeren Mengen synthetisiert werden. Da die

Inhibitoren aufgrund der Nukleotid-Komponente sehr polare Substanzen darstellen und die Transfektionsraten empfindlich von der Polarität der zu transfizierenden Substanzen abhängen, sollte die Modellsubstanz ähnliche Eigenschaften besitzen. Ein Fluorescein-markiertes ATP-Analogon würde diesen Voraussetzungen näherungsweise entsprechen, da die Inhibitoren ebenfalls ATP als Inhibitor-Komponente enthalten. Die mit einem solchen Analogon erhaltenen Transfektionsergebnisse sollten daher in Näherung auf die Transfektion der fluoreszenzmarkierten Inhibitoren übertragen werden können.

Daneben stellen fluoreszierende Nukleotid-Analoga geeignete Substanzen für kinetische Untersuchungen von Enzymen und ihren Reaktionsmechanismen dar. Ein neues fluoreszenzmarkiertes ATP-Analogon, welches im Idealfall trotz einer Modifikation noch hohe Affinität für ATP-bindende Enzyme zeigt, wäre daher auch von allgemeinem Interesse.

### **3.3.1 Syntheseversuche der P<sup>3</sup>-(N-FITC-aminoalkyl-amino)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphate 10, 11 und 12**

Die Synthesen der fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitoren zeigen, dass der  $\gamma$ -Phosphatrest von ATP durch Aktivierung mit EDC an ein primäres Amin gekoppelt werden kann und die Fluoreszenzmarkierung ebenfalls durch Umsetzung einer primären Aminogruppe mit Fluoresceinisothiocyanat möglich ist. Verbindungen mit zwei primären Aminogruppen, wie zum Beispiel Diaminoalkane, scheinen daher geeignete Linker zu sein, um ATP über den  $\gamma$ -Phosphatrest kovalent mit Fluorescein zu koppeln. Dabei soll im ersten Schritt die Kopplung des Diaminoalkans an das Nukleotid erfolgen. Um eine Zweifachsubstitution zu verhindern, muss das Diamin dabei in großem Überschuss eingesetzt werden. Im zweiten Schritt soll die Markierung des  $\gamma$ -Phosphat-modifizierten ATP mit Fluoresceinisothiocyanat durchgeführt werden. Um einen möglichen Einfluss der Kettenlänge des Diaminoalkans auf die Carbodiimid-Kopplung, die Umsetzung mit dem Isothiocyanat und die Affinität des Analogons zu Protein-Kinasen zu untersuchen, werden als Linker Diaminohexan, Diaminobutan und Ethylendiamin eingesetzt.

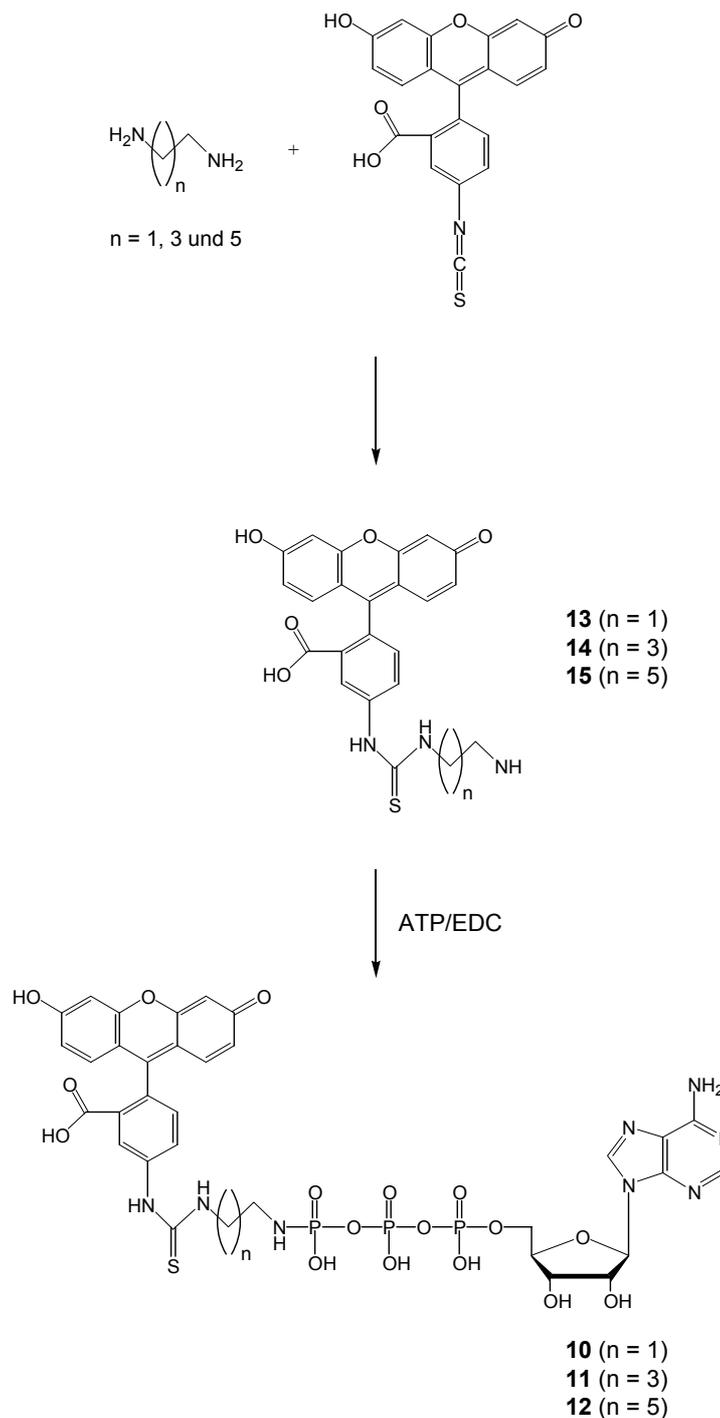


**Abb. 21:** Syntheschema für die P<sup>3</sup>-(N-FITC-aminoalkyl-amino)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphate **10**, **11** und **12**.

ATP wird mit EDC aktiviert und anschließend mit dem jeweiligen Diaminoalkan umgesetzt. Nach Reinigung mit Anionenaustauscher-Chromatographie und HPLC erhält man die P<sup>3</sup>-(Aminoalkyl-amino)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphate **7**, **8** und **9** in den folgenden Ausbeuten: **7** (Ethylen) 31 %, **8** (Butylen) 49 % und **9** (Hexylen) 37 %. Die Identifizierung der γ-Phosphat-modifizierten Nucleotide erfolgt mittels HPLC, MS, <sup>1</sup>H- und <sup>31</sup>P-NMR. Die in den Massenspektren beobachteten relativen Massen von 548.2 für **7**, 576.3 für **8** und 604.1 für **9** stimmen gut mit den berechneten Molmassen überein. Die Modifikation von ATP am γ-Phosphat ist wiederum deutlich an der Tieffeldverschiebung des Signals für das γ-Phosphoratom im <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum zu erkennen. Die chemischen Verschiebungen für

das  $\gamma$ -Phosphoratom betragen für **7** (Ethylen)  $\delta = - 0.28$  ppm, **8** (Butylen)  $\delta = - 0.04$  ppm und **9** (Hexylen)  $\delta = 0.42$  ppm. Die entsprechende chemische Verschiebung für ATP liegt bei  $\delta = - 9.61$  ppm. Die modifizierten Nukleotide werden anschließend unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie bei der Fluoreszenzmarkierung des Inhibitors **2** mit Fluoresceinisothiocyanat umgesetzt. In den HPLC-Chromatogrammen der Reaktionskontrolle ist jedoch für alle drei Substanzen nahezu keine Bildung der Fluorescein-markierten Analoga zu erkennen und auch in Massenspektren der Reaktionsansätze sind die gewünschten Produkte nur in Spuren nachweisbar. Die Änderung von pH-Wert, Temperatur und Reaktionszeit sowie die Verwendung anderer wässriger Puffer führt dabei zu keinen höheren Reaktionsumsätzen.

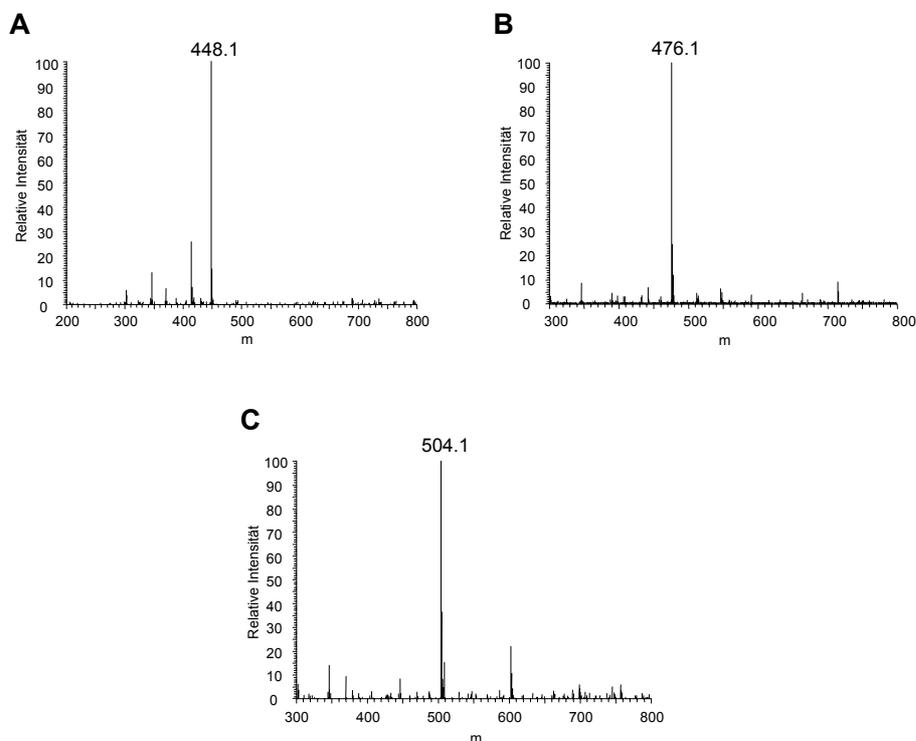
Alternativ dazu wird versucht, zuerst die Diaminoalkane mit Fluoresceinisothiocyanat umzusetzen und dann im zweiten Schritt die Kopplung mit dem  $\gamma$ -Phosphatrest des Nukleotids durchzuführen. Um diesen alternativen Reaktionsweg zur Synthese der Fluorescein-markierten ATP-Analoga **10**, **11** und **12** zu testen, werden Diaminohexan, Diaminobutan und Ethylendiamin mit Fluoresceinisothiocyanat umgesetzt. Die Reaktionen werden in Anlehnung an eine Vorschrift für die Synthese von N-FITC-aminoethyl-amin durchgeführt (Cotte *et al.*, 1999). Für die Fluoreszenzmarkierung der Diaminoalkane wird FITC mit Ethylendiamin, Diaminobutan und Diaminohexan umgesetzt. Nach Aufarbeitung und Reinigung mit Säulenchromatographie erhält man die N-FITC-aminoalkyl-amine **13**, **14** und **15**. Die Ausbeute für **13** (Ethylen) beträgt 33 % und die Identifizierung erfolgt mittels MS,  $^1\text{H-NMR}$  und DC. Die Ausbeuten für **14** (Butylen) und **15** (Hexylen) werden nicht bestimmt und die Identifizierung erfolgt nur mittels MS und DC. Die in den Massenspektren beobachteten relativen Massen von 448.1 für **13**, 476.1 für **14** und 504.1 für **15** stimmen gut mit den berechneten Molmassen überein.



**Abb. 22:** Alternatives Syntheschema für die  $\text{P}^3$ -(N-FITC-aminoalkyl-amino)- $\text{P}^1$ -adenosin-triphosphate **10**, **11** und **12** über die N-FITC-aminoalkyl-amine **13**, **14** und **15**.

Die modifizierten Fluoresceine **13**, **14** und **15** werden anschließend unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie bei den zuvor durchgeführten Carbodiimid-Kopplungen mit ATP/EDC umgesetzt. In den HPLC-Chromatogrammen der Reaktionskontrolle ist jedoch ebenfalls für alle drei Substanzen nahezu keine Bildung der Fluorescein-markierten ATP-Analoga zu erkennen und auch in Massenspektren der Reaktionsansätze sind die gewünschten Produkte nur in Spuren nachweisbar. Die Änderung von pH-Wert,

Temperatur und Reaktionszeit sowie die Verwendung anderer wässriger Puffer führt dabei zu keinen höheren Reaktionsumsätzen. Auch eine Umsetzung in DMF mit TEA als Hilfsbase führt nicht zu den gewünschten Produkten.

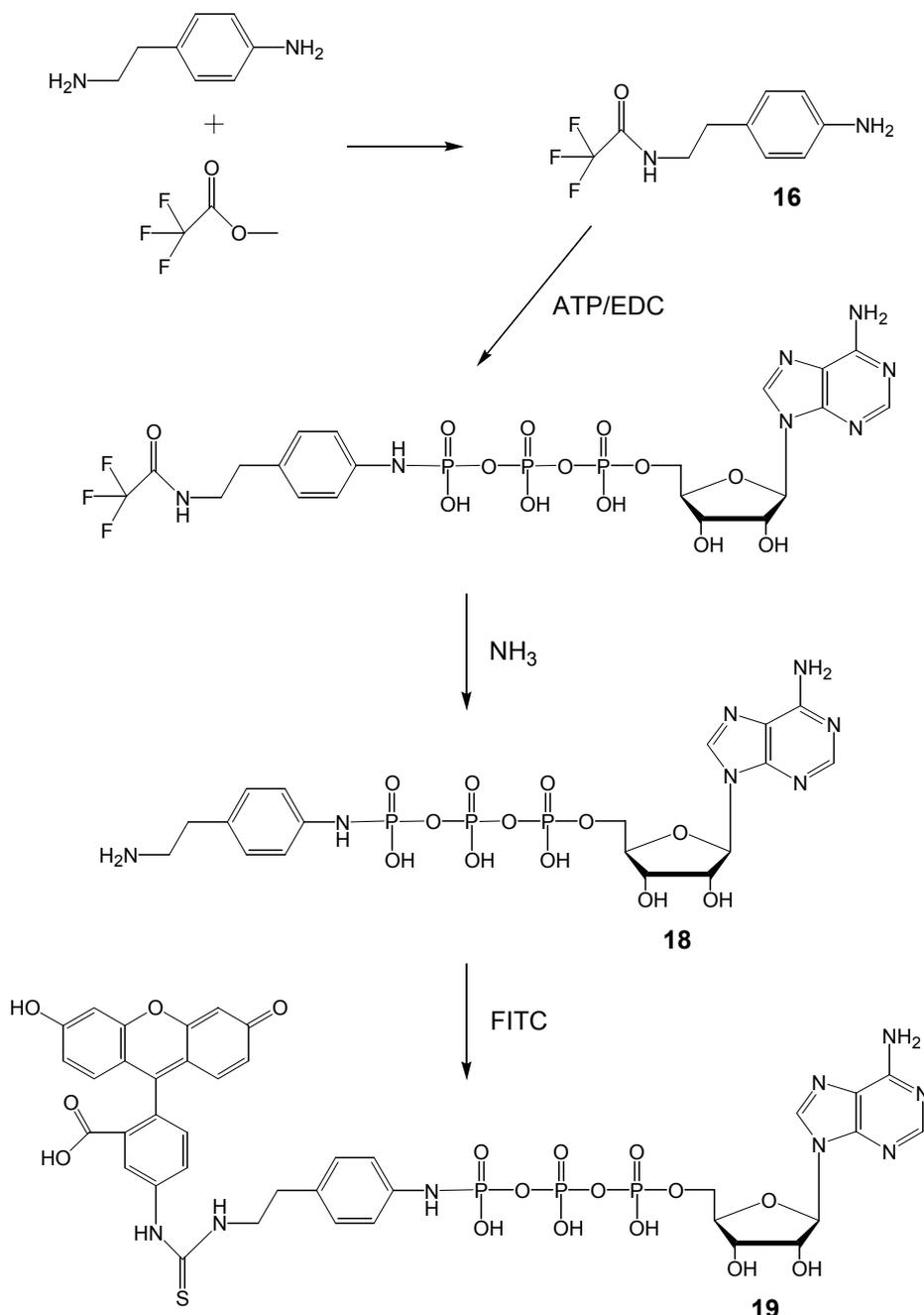


**Abb. 23:** Massenspektren der N-FITC-aminoalkyl-amine (A) **13**, (B) **14** und (C) **15**.

### 3.3.2 Synthese von P<sup>3</sup>-(4-(N-FITC-Aminoethyl)-phenylamino)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **19**

Da auch der zweite Syntheseweg nicht zu einem fluoreszenzmarkierten ATP-Analogen führt, wird basierend auf der ersten Synthesestrategie ein weiterer Syntheseversuch unternommen. Da möglicherweise eine Abschirmung der Aminogruppe des Linkers durch die negativ geladenen Phosphatreste stattfindet, wird diesmal ein sterisch anspruchsvollerer Diamino-Linker ausgewählt, der die freie primäre Aminogruppe räumlich etwas von den Phosphatgruppen trennt. Als Linker für die Synthese des Fluorescein-markierten ATP-Analogons wird in diesem Fall  $\beta$ -(4-Aminophenyl)-ethylamin verwendet. Die Kopplung des Linkers an ATP wird in Anlehnung an eine Vorschrift von Desaubry durchgeführt (Desaubry und Johnson, 1997). Da Isothiocyanate im Gegensatz zu Carbodiimiden nur mit aliphatischen primären Aminogruppen reagieren, muss die Ethylamino-Gruppe während der Carbodiimid-Kopplung geschützt werden. Zum Schutz der Aminoethyl-Gruppe kann Trifluoressigsäuremethylester verwendet werden. Das

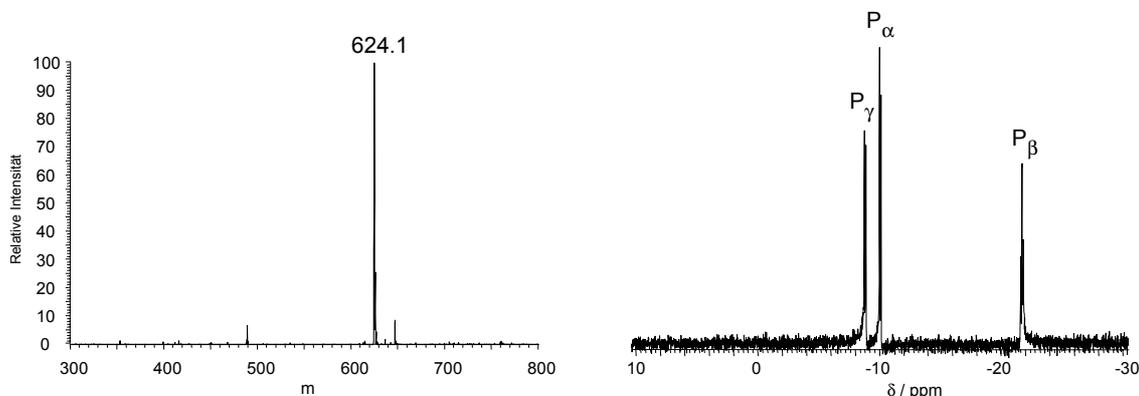
erhaltene Trifluoressigsäureamid kann nach der Carbodiimid-Kopplung unter basischen Bedingungen wieder abgespalten werden.



**Abb. 24:** Syntheschema für  $\text{P}^3$ -(4-(N-FITC-Aminoethyl)-phenylamino)- $\text{P}^1$ -adenosin-triphosphat **19**.

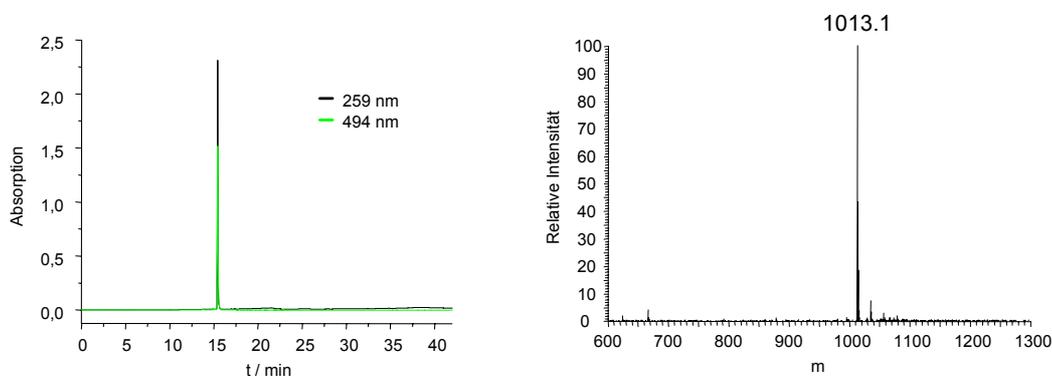
Für die Synthese des trifluoressigsäuregeschützten Diamins **16** wird  $\beta$ -(4-Aminophenyl)ethylamin mit Trifluoressigsäuremethylester umgesetzt. Nach Aufarbeitung erhält man **16** in einer Ausbeute von 85 %. Die Identifizierung erfolgt mittels GC-MS,  $^1\text{H}$ -NMR und DC. Für die anschließende Kopplung wird ATP mit EDC aktiviert und mit **16** umgesetzt. Danach wird die Schutzgruppe mit Ammoniak abgespalten. Nach Reinigung mit

Anionenaustauscher-Chromatographie erhält man  $P^3$ -(4-Aminoethyl-phenylamino)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **18** in einer Ausbeute von 73 %. Die Identifizierung erfolgt mittels MS, HPLC,  $^1H$ - und  $^{31}P$ -NMR.



**Abb. 25:** Massenspektrum und  $^{31}P$ -NMR-Spektrum von  $P^3$ -(4-Aminoethyl-phenylamino)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **18**.

Die im Massenspektrum beobachtete relative Masse von 624.1 für **18** stimmt gut mit der berechneten Molmasse überein. Die Modifikation von ATP am  $\gamma$ -Phosphat ist an der Tieffeldverschiebung des Signals für das  $\gamma$ -Phosphoratom im  $^{31}P$ -NMR-Spektrum zu erkennen. Die chemische Verschiebung für das  $\gamma$ -Phosphoratom beträgt für **18**  $\delta = - 8.85$  ppm. Im Vergleich zu ATP ( $\gamma$ -P:  $\delta = - 9.61$  ppm) ist hier jedoch nur eine geringe Tieffeldverschiebung zu erkennen. Dies ist wahrscheinlich auf einen induktiven Effekt des aromatischen Systems zurückzuführen. Das modifizierte Nukleotid **18** wird anschließend mit Fluoresceinisothiocyanat umgesetzt. Nach Reinigung mit HPLC erhält man **19** in einer Ausbeute von 20 %. Die Identifizierung des fluoreszenzmarkierten ATP-Analogons erfolgt mittels HPLC und MS.



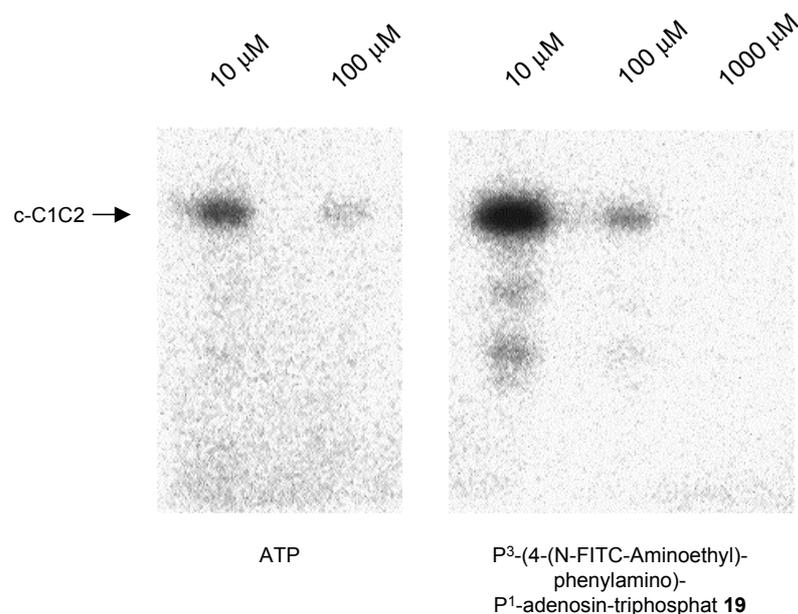
**Abb. 26:** HPLC-Chromatogramm und Massenspektrum von  $P^3$ -(4-(N-FITC-Aminoethyl)-phenylamino)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **19** nach Reinigung.

Der Peak im HPLC-Chromatogramm bei 15.5 min zeigt Absorption bei 259 nm und 494 nm und kann eindeutig dem Fluorescein-markierten  $P^3$ -(4-(N-FITC-Aminoethyl)-phenylamino)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **19** zugeordnet werden. Von dem fluoreszenzmarkierten Addukt wird ein Massenspektrum aufgenommen. Die beobachtete relative Masse von 1013.1 stimmt gut mit der berechneten Molmasse überein.

Mit diesem Fluorescein-markierten ATP-Analogen steht nun eine geeignete Substanz für die Ausarbeitung einer Methode zur Transfektion in lebende Zellen zur Verfügung.

### 3.3.3 Verdrängungsexperiment mit $P^3$ -(4-(N-FITC-Aminoethyl)-phenylamino)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **19**

Um abschätzen zu können, ob das fluoreszierende ATP-Analogen **19** auch für kinetische Untersuchungen an Enzymen und ihren Reaktionsmechanismen geeignet ist, wird ein Verdrängungsexperiment mit radioaktiv markiertem  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  durchgeführt. Die Phosphorylierungsansätze enthalten das c-C1C2-Fragment, radioaktiv markiertes  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  sowie 10 und 100  $\mu\text{M}$  ATP bzw. 10, 100 und 1000  $\mu\text{M}$  des fluoreszenzmarkierten ATP-Analogons **19** in Phosphorylierungspuffer. Die Expositionszeit für die Autoradiogramme beträgt 15 min.



**Abb. 27:** Autoradiogramme der Verdrängung von  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  durch ATP und  $P^3$ -(4-(N-FITC-Aminoethyl)-phenylamino)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **19** bei der Phosphorylierung von c-C1C2 durch PKA-C.

In den Autoradiogrammen in Abbildung 27 ist die Verdrängung von radioaktiv markiertem  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  durch ATP und  $\text{P}^3\text{-}(4\text{-}(\text{N-FITC-Aminoethyl})\text{-phenylamino})\text{-P}^1\text{-adenosin-triphosphat } \mathbf{19}$  bei der Phosphorylierungsreaktion des c-C1C2-Fragments durch PKA-C zu erkennen. Für ATP ist bei  $10 \mu\text{M}$  eine mittlere und bei  $100 \mu\text{M}$  eine sehr starke Verdrängung zu beobachten. Bei gleichen Konzentrationen ist für das ATP-Analogon  $\mathbf{19}$  eine schwache und eine starke Verdrängung zu erkennen. Wird die Konzentration des ATP-Analogons auf  $1000 \mu\text{M}$  erhöht, findet vollständige Verdrängung des radioaktiv markierten  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  statt. Aus dem Verdrängungsexperiment wird deutlich, dass die Affinität des Analogons im Vergleich zu dem natürlichen Substrat ATP zwar deutlich herabgesetzt ist, das ATP-Analogon aber trotz des Linkers und des Fluorophors immer noch an PKA-C bindet.

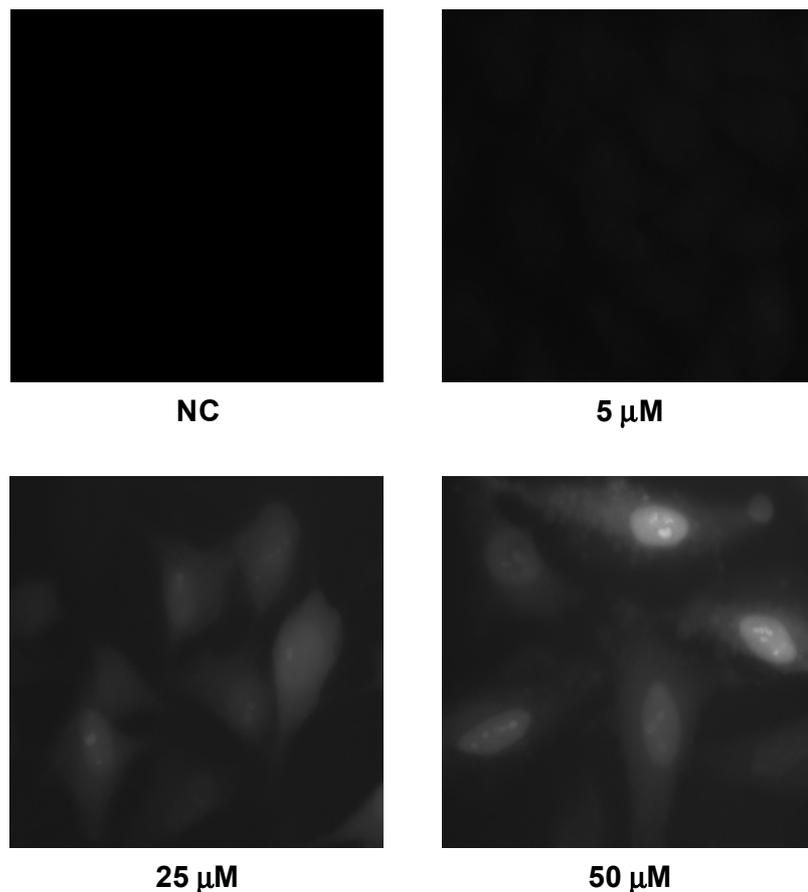
### **3.4 Transfektion von $\text{P}^3\text{-}(4\text{-}(\text{N-FITC-Aminoethyl})\text{-phenylamino})\text{-P}^1\text{-adenosin-triphosphat } \mathbf{19}$ und $\text{P}^3\text{-}(\text{N}^\epsilon\text{-}(\text{N-FITC-[K5, V6, A7]-CONH}_2\text{-Kemptide)-lysyl})\text{-P}^1\text{-adenosin-triphosphat } \mathbf{2}$ mittels Streptolysin-O**

Selektive Permeabilität gegenüber polaren Molekülen ist eine der wichtigsten funktionellen Eigenschaften von biologischen Membranen. Zellmembranen sind aus Phospholipiddoppelschichten aufgebaut, wobei die polaren Kopfgruppen zur wässrigen Umgebung gerichtet sind und die hydrophoben Fettsäureketten innerhalb der Membran liegen. Die Wechselwirkungen mit dem hydrophoben Kern der Zellmembran sind der limitierende Schritt bei der Bewegung polarer Moleküle durch die Membran. Die Permeabilität von Zellmembranen ist dabei sowohl von den Eigenschaften der Membran (Zusammensetzung, strukturelle Homogenität, physikalische Eigenschaften etc.) als auch der durchdringenden Moleküle (Polarität, Grösse etc.) abhängig (de Gier, 1992). Um die Visualisierung von Signaltransduktionswegen in lebenden Zellen mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitoren durchführen zu können, müssen diese Substanzen durch die Zellmembran in die Zellen eingebracht werden ohne diese dabei zu schädigen. Außerdem muss die Permeabilisierung reversibel erfolgen. Die synthetisierten fluoreszenzmarkierten Inhibitoren stellen aufgrund der Nukleotid-Komponente sehr polare Moleküle dar und es sind spezielle Methoden notwendig, um diese in die Zellen zu transfizieren. In der Literatur findet man verschiedene Methoden zur Permeabilisierung von Zellmembranen, darunter chemische und physikalische Methoden sowie Methoden, die auf biologischen Phänomenen beruhen. Eine Methode ist die reversible

Permeabilisierung durch porenbildende bakterielle Cytolysine, wie zum Beispiel  $\alpha$ -Toxin, *E. coli* Hemolysin oder Streptolysin-O. Streptolysin-O ist ein wasserlösliches einzelnes Polypeptid von ca. 61.5 kDa und assoziiert reversibel mit dem in der Membran enthaltenden Cholesterol. Dabei bildet es stabile transmembrane Poren mit Durchmessern bis zu 30 nm. Durch die Wahl der richtigen Permeabilisationsbedingungen ist es damit möglich kleine polare Moleküle, wie zum Beispiel Nukleotide, aber auch sehr große Makromoleküle wie zum Beispiel Antikörper in die Zellen einzuschleusen ohne die Zellen dabei zu schädigen (Bhakdi *et al.*, 1993). Streptolysin-O scheint somit ein geeignetes Reagenz für die Transfektion eines solchen fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitors zu sein.

### 3.4.1 Transfektion von P<sup>3</sup>-(4-(N-FITC-Aminoethyl)-phenylamino)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **19** in HeLa-Zellen

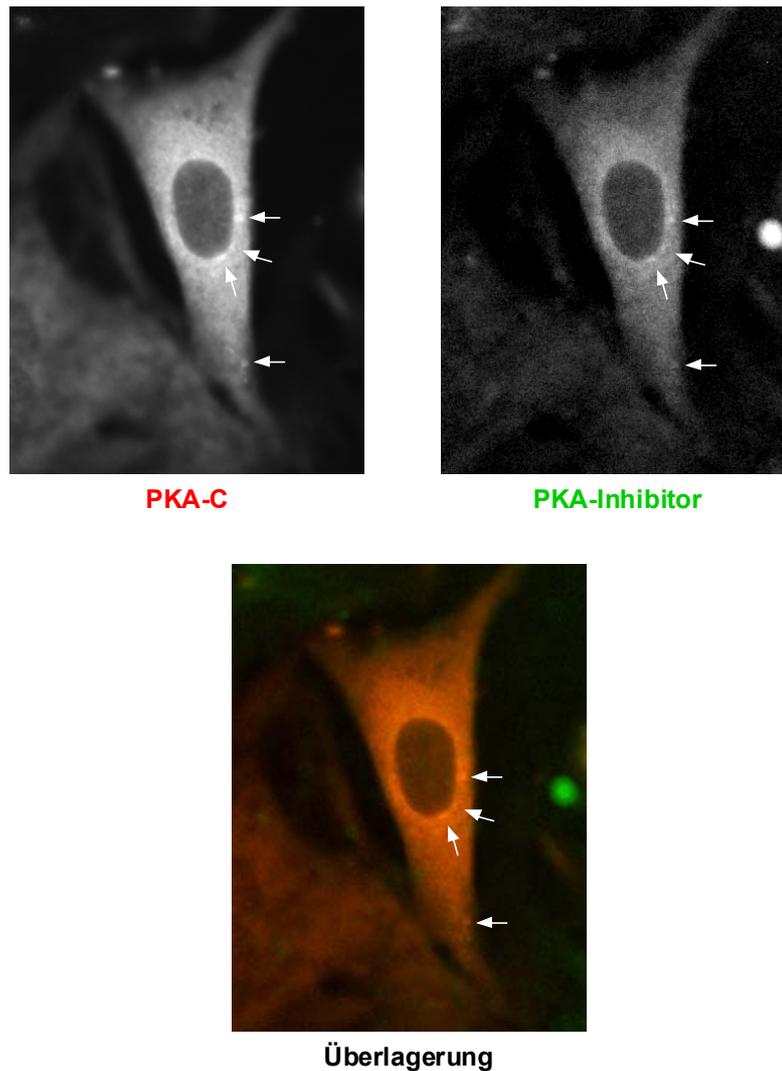
Um geeignete Permeabilisationsbedingungen für die Transfektion des Fluorescein-markierten bifunktionellen Inhibitors **2** zu finden, werden Vorversuche mit dem Fluorescein-markierten ATP-Analogon **19** durchgeführt. Für die Transfektionsexperimente werden HeLa-Zellen verwendet. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgt in Anlehnung an eine Vorschrift von Gleeson (Gleeson *et al.*, 1996). Die Transfektion erfolgt in Gegenwart von 5, 25 und 50  $\mu$ M des Fluorescein-markierten ATP-Analogons **19**. Zusätzlich wird eine Negativkontrolle ohne fluoreszenzmarkiertes Analogon durchgeführt. Das Kulturmedium enthält fötales Kälberserum, um die Membranporen nach der Transfektion wieder zu schließen und die Permeabilisierung aufzuheben (Fawcett *et al.*, 1998). Die Zellen werden anschließend ohne Fixierung unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Anregung von Fluorescein erfolgt mit Licht der Wellenlänge 494 nm. Die Negativkontrolle in Abwesenheit des fluoreszierenden ATP-Analogons zeigt für die transfizierten Zellen nahezu keine Autofluoreszenz. Bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M sind nur ganz schwach fluoreszierende Zellen zu erkennen. Wird die Konzentration auf 25  $\mu$ M erhöht, zeigen die Zellen starke Fluoreszenz aufgrund der Inkorporation des ATP-Analogons. Die Lokalisation in den Zellen ist dabei sowohl cytosolisch als auch nukleär. Bei 50  $\mu$ M ist eine weitere leichte Erhöhung der Fluoreszenz sowie die intensive Anfärbung der Nukleoli innerhalb der Zellkerne zu beobachten. Diese Ergebnisse zeigen, dass unter den gewählten Permeabilisationsbedingungen eine Transfektion des Fluorescein-markierten ATP Analogons **19** in HeLa-Zellen möglich ist. Unter ähnlichen Bedingungen sollte damit auch eine Transfektion des fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitors **2** durchgeführt werden können.



**Abb. 28:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen nach Transfektion mit verschiedenen Konzentrationen von  $P^3$ -(4-(N-FITC-Aminoethyl)-phenylamino)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **19**.

### 3.4.2 Transfektion von $P^3$ -( $N^\epsilon$ -(N-FITC-[K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide)-lysyl)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **2** in HeLa-Zellen

Für die Transfektionsexperimente werden ebenfalls HeLa-Zellen verwendet. Die Transfektion erfolgt in Gegenwart von 45 µM des Fluorescein-markierten bifunktionellen Inhibitors **2**. Die Zellen werden anschließend fixiert. Nach Beenden des Fixiervorgangs und Blocken unspezifischer Bindungsstellen erfolgt eine Immunanfärbung der transfizierten Zellen. Zur Lokalisation von PKA wird mit einem Primärantikörper gegen PKA-C (aus Kaninchen) inkubiert. Als Sekundärantikörper dient ein fluoreszenzmarkierter Alexa 546 Antikörper gegen Kaninchen (aus Ziege). Anschließend werden die Zellen in *anti-bleach* Lösung eingebettet und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Anregung von Fluorescein erfolgt mit Licht der Wellenlänge 494 nm, die Anregung von Alexa 546 bei 546 nm. Die Fluoreszenz des grünen und des roten Kanals ist dabei gut voneinander getrennt.



**Abb. 29:** Immunanfärbung von HeLa-Zellen nach Transfektion von  $P^3$ -( $N^{\epsilon}$ -(N-FITC-[K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide)-lysyl)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **2**. Der rote Kanal zeigt die Fluoreszenz von Alexa 546, der grüne Kanal die von Fluorescein.

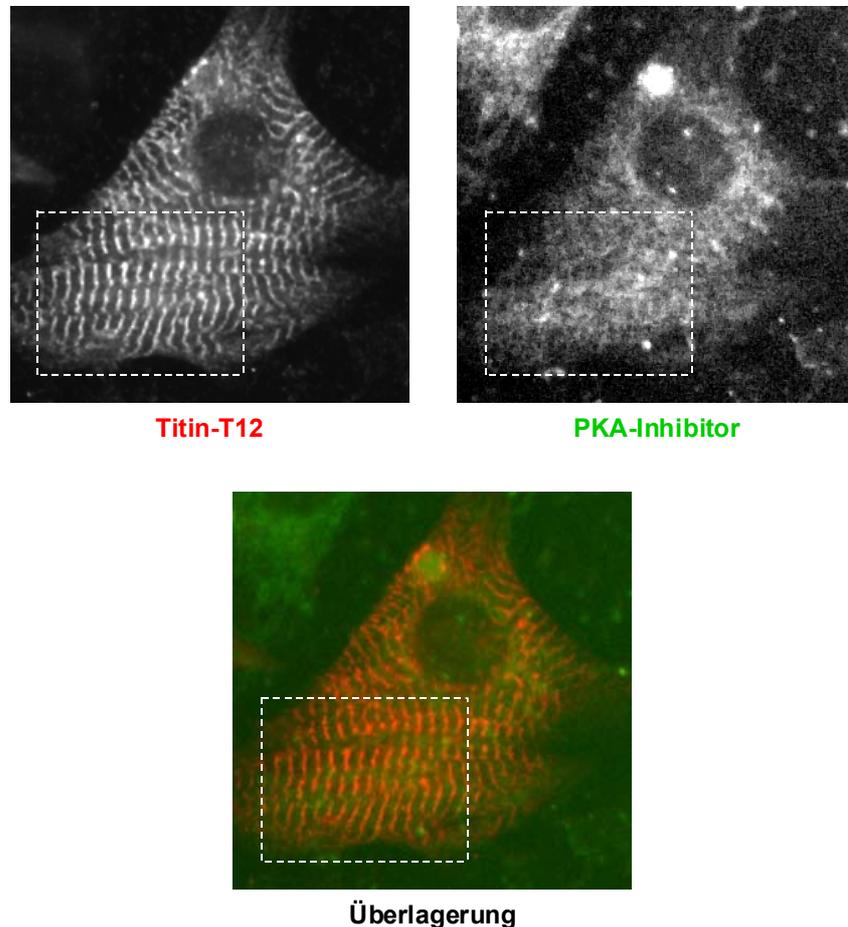
Abbildung 29 zeigt den vergrößerten Bildausschnitt einer transfizierten Zelle. Im roten Kanal ist die Lokalisation von PKA-C zu erkennen. Man beobachtet vorwiegend diffuse cytosolische Verteilung mit Anreicherung um den Zellkern. An einigen Stellen findet man zusätzlich eine Lokalisation in punktförmigen Aggregaten. Im grünen Kanal erkennt man die zelluläre Verteilung des transfizierten Fluorescein-markierten Inhibitors **2**. Die Fluoreszenz ist im Vergleich zum roten Kanal schwächer, die Lokalisation ist jedoch vorwiegend mit der von PKA-C identisch. In der Überlagerung des roten und grünen Kanals ist in Bereichen identischer Lokalisation eine gelbe Färbung zu sehen. Man erkennt deutlich, dass der bifunktionelle Inhibitor **2** in HeLa-Zellen mit PKA kolokalisiert. Die Beobachtungen sind ein erster Hinweis dafür, dass der Inhibitor innerhalb der Zelle spezifisch an die Ziel-Kinase PKA bindet.

### 3.4.3 Transfektion von P<sup>3</sup>-(N<sup>ε</sup>-(N-FITC-[K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide)-lysyl)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat 2 in Herzmuskelzellen aus neonatalen Ratten

Im Folgenden soll untersucht werden, ob der bifunktionelle Inhibitor **2** mit Hilfe von Streptolysin-O auch in Muskelzellen transfiziert werden kann. Dazu werden Herzmuskelzellen aus neonatalen Ratten (NRC: *neonatal rat cardiomyocytes*) verwendet. Im Gegensatz zu der weitgehend diffusen Verteilung von PKA in HeLa-Zellen sollte in quergestreiften Muskelzellen eine Lokalisation im Bereich der Z-Scheiben und im angrenzenden I-Bandenbereich beobachtet werden können. Eine Lokalisation von PKA in diesen Bereichen ist auf die Beteiligung spezifischer PKA-Verankerungsproteine, so genannte AKAPs (*A-kinase anchoring proteins*), zurückzuführen (Yang *et al.*, 1998). Verwendet man zusätzlich einen Antikörper gegen das Titin-T12-Epitop, welches im Übergangsbereich der Z-Scheibe zur I-Bande liegt, so sollte man im Fluoreszenzmikroskop ein überlagertes Querstreifenmuster erkennen können.

Die Transfektion erfolgt in Gegenwart von 45 µM des Fluorescein-markierten bifunktionellen Inhibitors **2**. Die Zellen werden anschließend fixiert. Nach Beenden des Fixiervorgangs und Blocken unspezifischer Bindungsstellen erfolgt eine Immunanfärbung der transfizierten Zellen. Zur Lokalisation des Titin-T12-Epitops wird mit einem Primärantikörper gegen Titin-T12 (aus Maus) inkubiert. Als Sekundärantikörper dient ein fluoreszenzmarkierter Alexa 546 Antikörper gegen Maus (aus Ziege). Anschließend werden die Zellen in *anti-bleach* Lösung eingebettet und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Anregung von Fluorescein erfolgt mit Licht der Wellenlänge 494 nm, die Anregung von Alexa 546 bei 546 nm. Die Fluoreszenz des grünen und des roten Kanals ist dabei gut voneinander getrennt. Abbildung 30 zeigt den vergrößerten Bildausschnitt einer transfizierten Herzmuskelzelle. Im roten Kanal ist die Lokalisation des Titin-T12-Epitops zu erkennen. Die alternierende Abfolge der gefärbten Z-Scheiben spiegelt deutlich die charakteristische Querstreifung der Muskelzellen wider. Der grüne Kanal zeigt die Lokalisation des transfizierten Inhibitors **2**. Die Fluoreszenz ist im Vergleich zum roten Kanal wesentlich schwächer und man beobachtet vorwiegend eine diffuse Verteilung. In dem markierten Bereich ist jedoch schwach eine Querstreifung zu erkennen. Die Überlagerung des roten und des grünen Kanals zeigt in dem markierten Bereich die teilweise Kolokalisation von Titin-T12 und dem Fluorescein-markierten Inhibitor. Eine gelbe Färbung in diesem Bereich ist hier aufgrund des schwachen Signals jedoch kaum zu erkennen. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass der bifunktionelle Inhibitor **2** in Herzmuskelzellen im Bereich der Z-Scheiben teilweise mit PKA kolokalisiert. Die

erzielten Transfektionsraten für den Inhibitor sind jedoch nur sehr gering. Auch Variation der Permeabilisierungsbedingungen führt dabei zu keiner deutlich höheren Transfektionseffizienz.



**Abb. 30:** Immunanfärbung von NRC nach Transfektion von  $P^3$ -(N<sup>ε</sup>-(N-FITC-[K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide)-lysyl)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **2**. Der rote Kanal zeigt die Fluoreszenz von Alexa 546, der grüne Kanal die von Fluorescein.

### 3.5 Synthese fluoreszenzmarkierter bifunktioneller Inhibitoren für MLCK aus Skelettmuskel und glatter Muskulatur

Die Phosphorylierungsexperimente mit den synthetisierten fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitoren **2** und **3** zeigen, dass die Inhibitoren eine Affinität zu ihrer Ziel-Kinase PKA haben, die im Bereich des natürlichen Nukleotid-Substrats ATP liegt. Nach Transfektion von **2** in HeLa-Zellen kann eine spezifische, in Herzmuskelzellen eine teilweise spezifische Lokalisation mit PKA beobachtet werden. Die

Grundvoraussetzungen an einen Bisubstrat-Inhibitor scheinen damit erfüllt zu sein. An einem zweiten Modellsystem soll nun untersucht werden, ob ein solcher Inhibitor auch in der Lage ist aufgrund seiner Peptid-Komponente spezifisch zwischen nahe verwandten Protein-Kinasen zu diskriminieren. Als Modellenzyme aus der Gruppe der Ser/Thr-Kinasen werden die Myosin-Leichtketten-Kinasen aus Skelettmuskel (*skeletal muscle myosin light chain kinase*: skmMLCK) und glatter Muskulatur (*smooth muscle myosin light chain kinase*: smMLCK) ausgewählt. Im Gegensatz zu anderen Protein-Kinasen, wie zum Beispiel PKA, zeigen die Myosin-Leichtketten-Kinasen eine hohe Substratspezifität und phosphorylieren nur die regulatorischen Ketten des Myosins (rMLC). Ein bifunktionaler Inhibitor mit einer Peptid-Sequenz aus der skeletalen rMLC sollte die skmMLCK inhibieren, bei einer entsprechenden Peptid-Sequenz aus der rMLC glatter Muskulatur sollte dagegen keine Inhibition zu beobachten sein. Da die skmMLCK als rekombinantes Protein zur Verfügung steht, kann die spezifische Diskriminierung durch einen solchen bifunktionalen Inhibitor anhand von Inhibitoren mit den Sequenzen von skm-rMLC und sm-rMLC untersucht werden.

### 3.5.1 Design fluoreszenzmarkierter bifunktionaler Inhibitoren für skmMLCK und smMLCK (1)

Die grundlegenden Überlegungen zu der Länge und Struktur eines kovalenten Linkers zur Verknüpfung von Nukleotid- und Peptid-Komponente der bifunktionalen Inhibitoren für skmMLCK und smMLCK werden von dem Modellsystem PKA übernommen. Die Peptid-Fragmente der Inhibitoren sollen die Erkennungssequenz der jeweiligen rMLC für die entsprechende Protein-Kinase enthalten. Im Gegensatz zu den bifunktionalen Inhibitoren für PKA soll hier jedoch kein Lysin als kovalenter Linker verwendet werden, da die Peptid-Sequenzen für beide rMLC Lysin-reiche N-Termini besitzen.

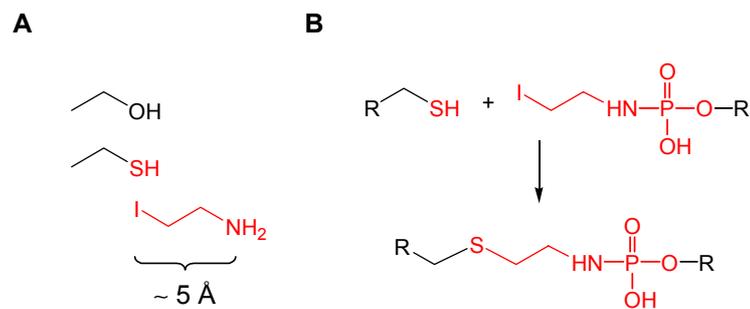
skm-rMLC: A<sub>1</sub> P K K A K K R A G G A N **S**<sub>14</sub> N V F S M<sub>19</sub>

sm-rMLC: S<sub>1</sub> S K K A K A K T T K K R P Q R A T **S**<sub>19</sub> N V F A M<sub>24</sub>

**Abb. 31:** N-terminale Peptid-Sequenzen der regulatorischen leichten Myosinketten aus Skelettmuskel (skm-rMLC) und glatter Muskulatur (sm-rMLC). Die hervorgehobenen Serine werden von der jeweiligen MLCK phosphoryliert.

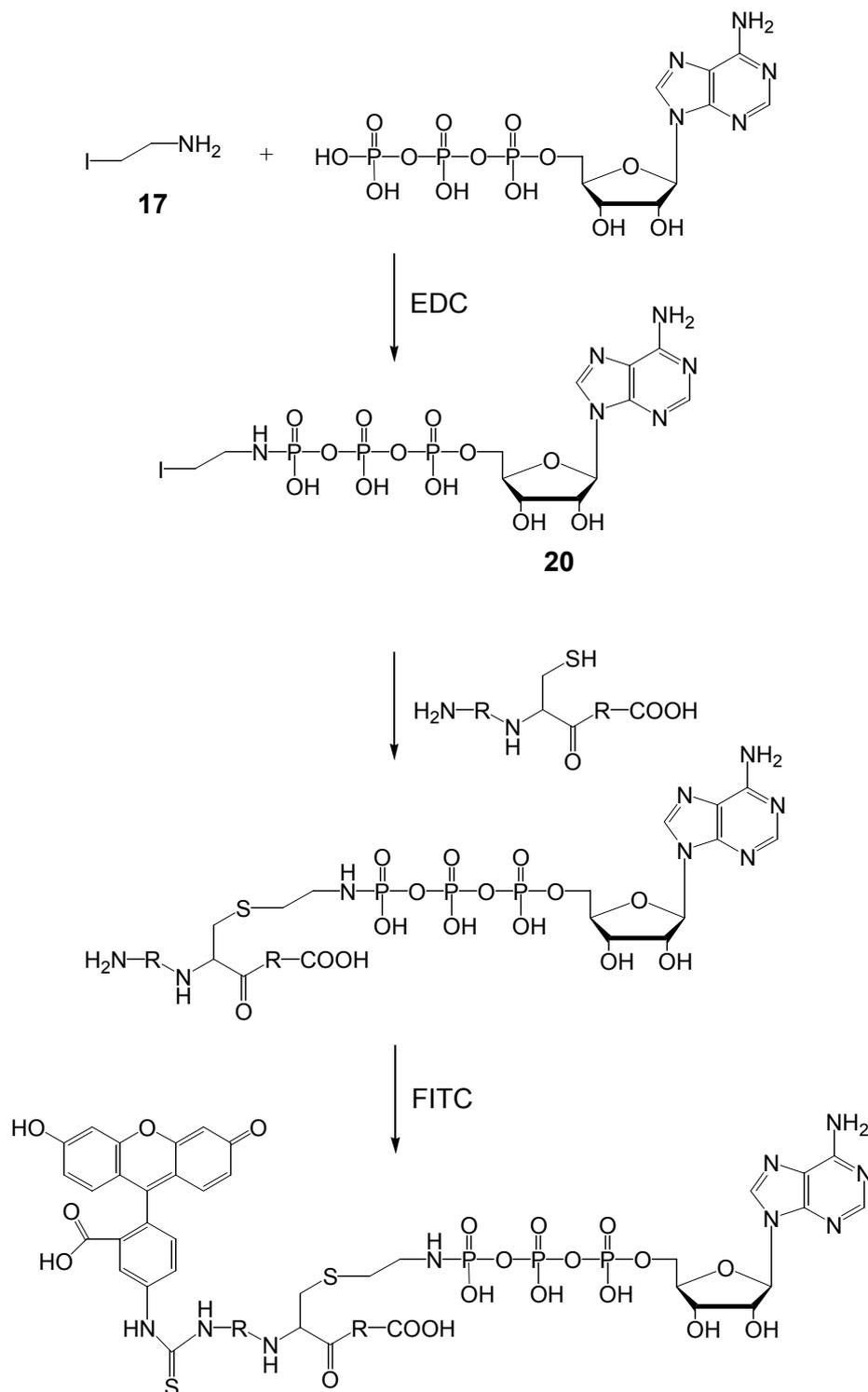
Die hervorgehobenen Serine 14 (skm-rMLC) und 19 (sm-rMLC) werden durch die jeweilige MLCK phosphoryliert. Um eine mögliche Phosphorylierung anderer Serin-Reste auszuschließen, wird Serin 18 in skm-rMLC durch Alanin ersetzt und die N-terminalen

Serine in sm-rMLC durch Verkürzung des N-Terminus entfernt. C-terminal wird bei beiden Sequenzen ein Alanin hinzugefügt, da die Peptidsynthese ausgehend von Ala-Wang-Resin erfolgt. Um den aktivierten Bisubstrat-Komplex des Peptid-Substrats und ATP zu simulieren, soll der kovalente Linker analog zu dem bifunktionellen PKA-Inhibitor einen Donor-Akzeptor-Abstand von etwa 5 Å ermöglichen. Außerdem soll der Linker flexibel und sterisch anspruchslos sein. Ein Teilstück des kovalenten Linkers kann durch den Austausch der zu phosphorylierenden Serin-Reste innerhalb der Sequenzen durch ein Cystein erreicht werden. Da Cystein als Linker zu kurz ist, kann ein zweites Teilstück mit einer funktionellen Gruppe zur Verknüpfung mit dem Cystein über Modifizierung des  $\gamma$ -Phosphatrests von ATP eingefügt werden. Dafür würde sich zum Beispiel  $\beta$ -Iodethylamin eignen. Dieses sollte mittels EDC an den  $\gamma$ -Phosphatrest gekoppelt werden können und anschließend eine Substitutionsreaktion mit dem Cystein des Peptid-Fragments ermöglichen.



**Abb. 32:** Verwendung von Cystein und  $\beta$ -Iodethylamin als kovalenten Linker zwischen der Peptid- und Nukleotid-Komponente des bifunktionellen Inhibitors. (A) Ein Linker aus Cystein und  $\beta$ -Iodethylamin fixiert die beiden Komponenten in einem Abstand, der ungefähr dem Donor-Akzeptor-Abstand während des Phosphoryltransfers entspricht. (B) Die Thiolgruppe der Cystein-Seitenkette sollte eine Substitutionsreaktion mit einem  $\beta$ -Iodethylamin-modifizierten  $\gamma$ -Phosphat-Rest ermöglichen.

Die Markierung mit dem Fluorophor soll an den freien N-Termini der Peptide erfolgen, um einen größtmöglichen Abstand zu der Linkerregion zu erreichen. Eine Fluoreszenzmarkierung der Inhibitoren kann durch Umsetzung der N-terminalen primären Aminogruppen mit Fluoresceinisothiocyanat erreicht werden.



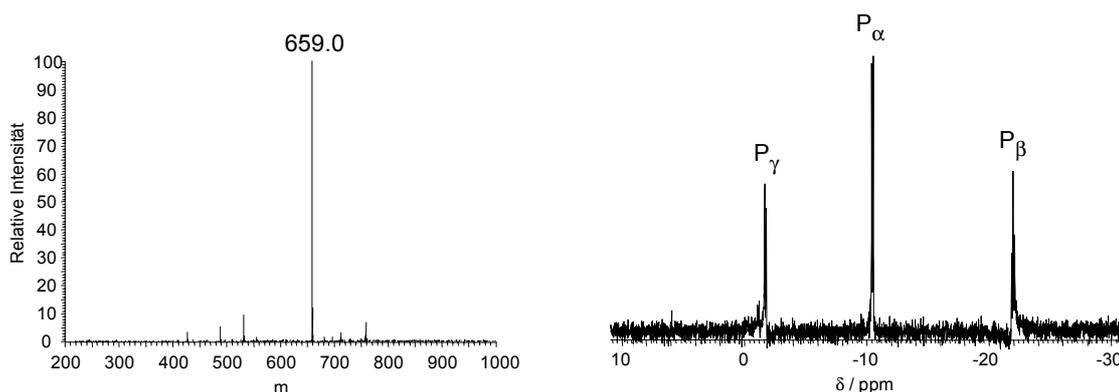
**Abb. 33:** Allgemeine Synthesestrategie für die Synthese eines Fluorescein-markierten bifunktionellen Inhibitors für skmMLCK und smMLCK. Die Kopplung zwischen dem Cystein-enthaltenden Peptid und dem Nucleotid soll über die Substitutionsreaktion der Cystein-Seitenkette und dem  $\beta$ -Iodethylamin-modifizierten ATP-Analogon **20** erfolgen.

### 3.5.2 Synthese von $\beta$ -Iodethylamin **17**

Die Synthese von  $\beta$ -Iodethylamin **17** erfolgt in Anlehnung an eine Vorschrift von Billimoria (Billimoria und Lewis, 1968). Dazu wird Ethanolamin mit wässriger Iodwasserstofflösung umgesetzt. Nach Aufarbeitung erhält man  $\beta$ -Iodethylamin als Hydroiodid in einer Ausbeute von 40 %. Die Identifizierung erfolgt anhand des Schmelzpunktes. Der gemessene Schmelzpunkt von 197-199 °C stimmt gut mit der Literatur überein (Billimoria und Lewis, 1968).

### 3.5.3 Synthese von $P^3$ -( $\beta$ -Iodethylamino)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **20**

Für die Kopplung wird ATP mit EDC aktiviert und anschließend mit  $\beta$ -Iodethylaminhydroiodid umgesetzt. Nach Reinigung mit Anionenaustauscher-Chromatographie und HPLC erhält man das  $\gamma$ -Phosphat-modifizierte Nukleotid **20** in einer Ausbeute von 62 %. Die Identifizierung erfolgt mittels MS, HPLC,  $^1H$ - und  $^{31}P$ -NMR.



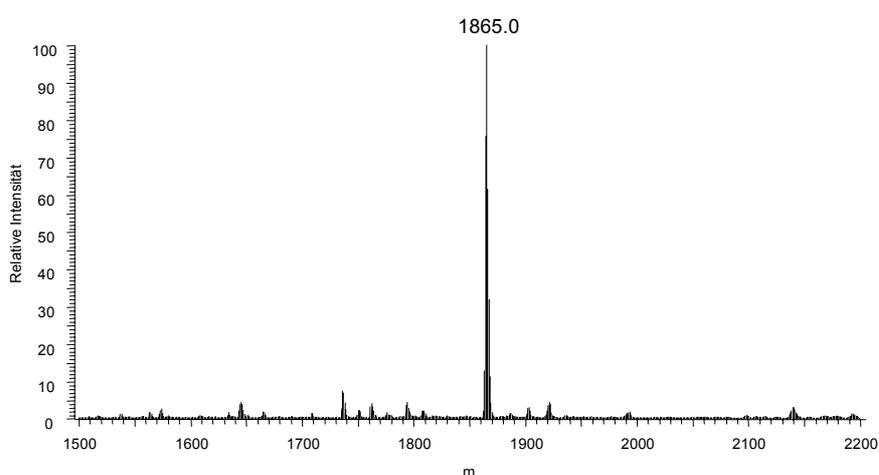
**Abb. 34:** Massenspektrum und  $^{31}P$ -NMR-Spektrum von  $P^3$ -( $\beta$ -Iodethylamino)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **20** nach Reinigung.

Die im Massenspektrum beobachtete relative Masse von 659.0 für **20** stimmt gut mit der berechneten Molmasse überein. Die Modifikation von ATP am  $\gamma$ -Phosphat ist deutlich an der Tieffeldverschiebung des Signals für das  $\gamma$ -Phosphoratom im  $^{31}P$ -NMR-Spektrum zu erkennen.

### 3.5.4 Synthese von [C14, A20]skm-rMLC(3-19) **21**

Sequenz: H<sub>2</sub>N-KKAKKRAGGANCNVFAMA-COOH

Die Synthese von **21** wird manuell im 0.2 mmol-Maßstab durchgeführt. Als feste Phase für die Synthese wird Fmoc-Ala-Wang-Harz verwendet. Nach Synthese des Peptids erfolgt die Entschützung der Aminosäure-Seitenketten und die Abspaltung von der festen Phase. Nach Aufarbeitung wird das erhaltene Rohpeptid mit HPLC gereinigt. Die Gesamtausbeute bezogen auf den Synthesemaßstab wird nicht bestimmt. Die Identifizierung von [C14, A20]skm-rMLC(3-19) **21** erfolgt mittels MS und HPLC.



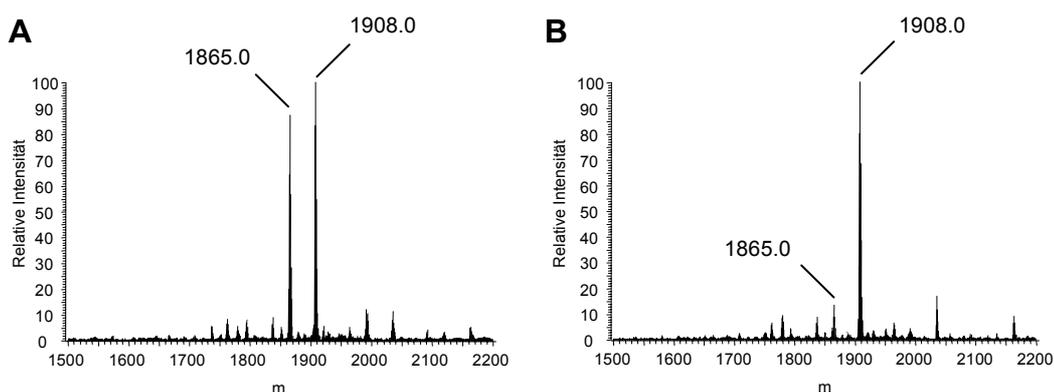
**Abb. 35:** Massenspektrum von [C14, A20]skm-rMLC(3-19) **21** nach Reinigung.

Die im Massenspektrum beobachtete relative Masse von 1865.0 für **21** stimmt gut mit der berechneten Molmasse überein.

### 3.5.5 Syntheseversuch von P<sup>3</sup>-([C14, A20]skm-rMLC(3-19)-cysteyl-S-ethylamino)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **22**

Um zu untersuchen, ob eine Verknüpfung von Peptid und Nukleotid über die beiden Linker-Fragmente möglich ist, wird zuerst nur die Umsetzung mit dem skm-rMLC-Peptid **21** durchgeführt. Für die Substitutionsreaktion wird P<sup>3</sup>-( $\beta$ -Iodethylamino)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **20** mit [C14, A20]skm-rMLC(3-19) **21** umgesetzt. Direkt nach Lösen der beiden Substanzen fällt ein Niederschlag aus. In den HPLC-Chromatogrammen des Überstandes ist keine Produktbildung zu erkennen. Der abzentrifugierte Niederschlag ist in DMF, DMSO, TEAAc-Puffer, Trifluorethanol und 70 % Acetonitril nahezu unlöslich, kann aber mit 6 M Gdn/HCl in Lösung gebracht werden. Der gelöste Niederschlag wird

mit HPLC gereinigt. Von den gesammelten Peaks und dem Überstand des Reaktionsansatzes werden Massenspektren aufgenommen. Das Massenspektrum des Überstandes zeigt nur die Masse von  $P^3$ -( $\beta$ -Iodethylamino)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **20** und Spuren von **21**. Die gesammelten Peaks zeigen nur die Massen der beiden Ausgangssubstanzen. Die Bildung des Addukts **22** ist auch in den Massenspektren nicht zu erkennen. Die Verwendung anderer wässriger Puffersysteme und organischer Lösungsmittel sowie Variation von Temperatur und Reaktionszeit führen ebenfalls nicht zu der erhofften Substitutionsreaktion des Cystein-haltigen Peptids und dem  $\gamma$ -Phosphat-modifizierten Nukleotid. Zur Kontrolle des synthetisierten Peptids wird dieses nur mit dem  $\beta$ -Iodethylamin-Linker umgesetzt. Dazu wird etwas  $\beta$ -Iodethylamin zu einer Lösung von **21** gegeben und 1h bei RT inkubiert. Nach Probenentnahme für ein Massenspektrum wird nochmals etwas von dem Linker zugegeben. Nach insgesamt 2.5 h wird erneut ein Massenspektrum des Reaktionsansatzes aufgenommen.



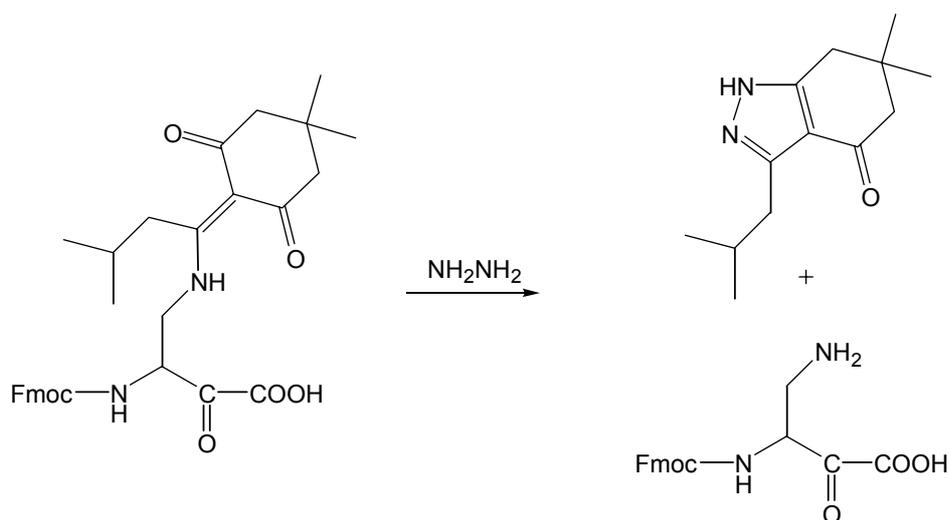
**Abb. 36:** Massenspektren der Substitutionsreaktion von [C14, A20]skm-rMLC(3-19) **21** mit  $\beta$ -Iodethylamin nach (A) 1h und (B) nach erneuter Zugabe des Linkers und 2.5 h.

In den Massenspektren erkennt man, dass nach 1 h das Peptid bereits zur Hälfte umgesetzt ist. Nach erneuter Zugabe von  $\beta$ -Iodethylamin und insgesamt 2.5 h ist die Substitutionsreaktion nahezu vollständig abgelaufen. Die in den Spektren beobachtete relative Masse von 1908.0 stimmt gut mit der berechneten Molmasse des Substitutionsproduktes von **21** mit  $\beta$ -Iodethylamin überein. Die Massenspektren zeigen, dass die Reaktion des Cysteins mit dem Linker problemlos verläuft. Um auszuschließen, dass das für die Umsetzungen verwendete modifizierte Nukleotid **20** nicht in Ordnung ist, wird dieses erneut synthetisiert. Danach werden die Umsetzungen von [C14, A20]skm-rMLC(3-19) **21** mit  $P^3$ -( $\beta$ -Iodethylamino)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **20** unter den gleichen Bedingungen wie zuvor erneut durchgeführt. Da man auch diesmal nicht das gewünschte Kopplungsaddukt **22** erhält, muss für die Synthese fluoreszenzmarkierter bifunktioneller

Inhibitoren für skmMLCK und smMLCK eine alternative Synthesestrategie gefunden werden.

### 3.5.6 Design fluoreszenzmarkierter bifunktionaler Inhibitoren für skmMLCK und smMLCK (2)

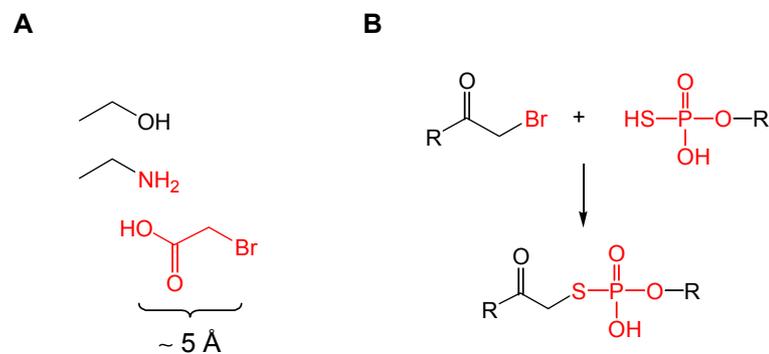
Die grundlegenden Überlegungen zu der Länge eines kovalenten Linkers zur Verknüpfung von Nukleotid- und Peptid-Komponente der bifunktionalen Inhibitoren für skmMLCK und smMLCK werden wie zuvor von dem Modellsystem PKA übernommen. Das Design des Linkers erfolgt in Anlehnung an eine Vorschrift von Parang (Parang *et al.*, 2001), in der die Synthese eines bifunktionalen Inhibitors für die Tyrosin-Kinase IRK (Insulin-Rezeptor-Kinase) beschrieben wird. Die Peptid-Fragmente der Inhibitoren sollen wiederum die Erkennungssequenz der jeweiligen rMLC für die entsprechende Protein-Kinase enthalten. Das zu phosphorylierende Serin kann gegen Diaminopropionsäure (Dpr) ausgetauscht werden, die mit einer zu der Fmoc-Gruppe orthogonalen Schutzgruppe versehen ist. Somit kann nach vollständiger Synthese des Peptids die Diaminopropionsäure selektiv entschützt werden. Dafür eignet sich die iv(Dde)-Schutzgruppe. Diese ist unter den Abspaltungsbedingungen für die Fmoc-Gruppen der AS während der Peptidsynthese stabil und kann anschließend durch Behandeln mit einer 2 %igen Lösung von Hydrazinhydrat in DMF abgespalten werden.



**Abb. 37:** Abspaltung der iv(Dde)-Schutzgruppe von Diaminopropionsäure durch Behandeln mit einer 2 %igen Lösung von Hydrazinhydrat in DMF.

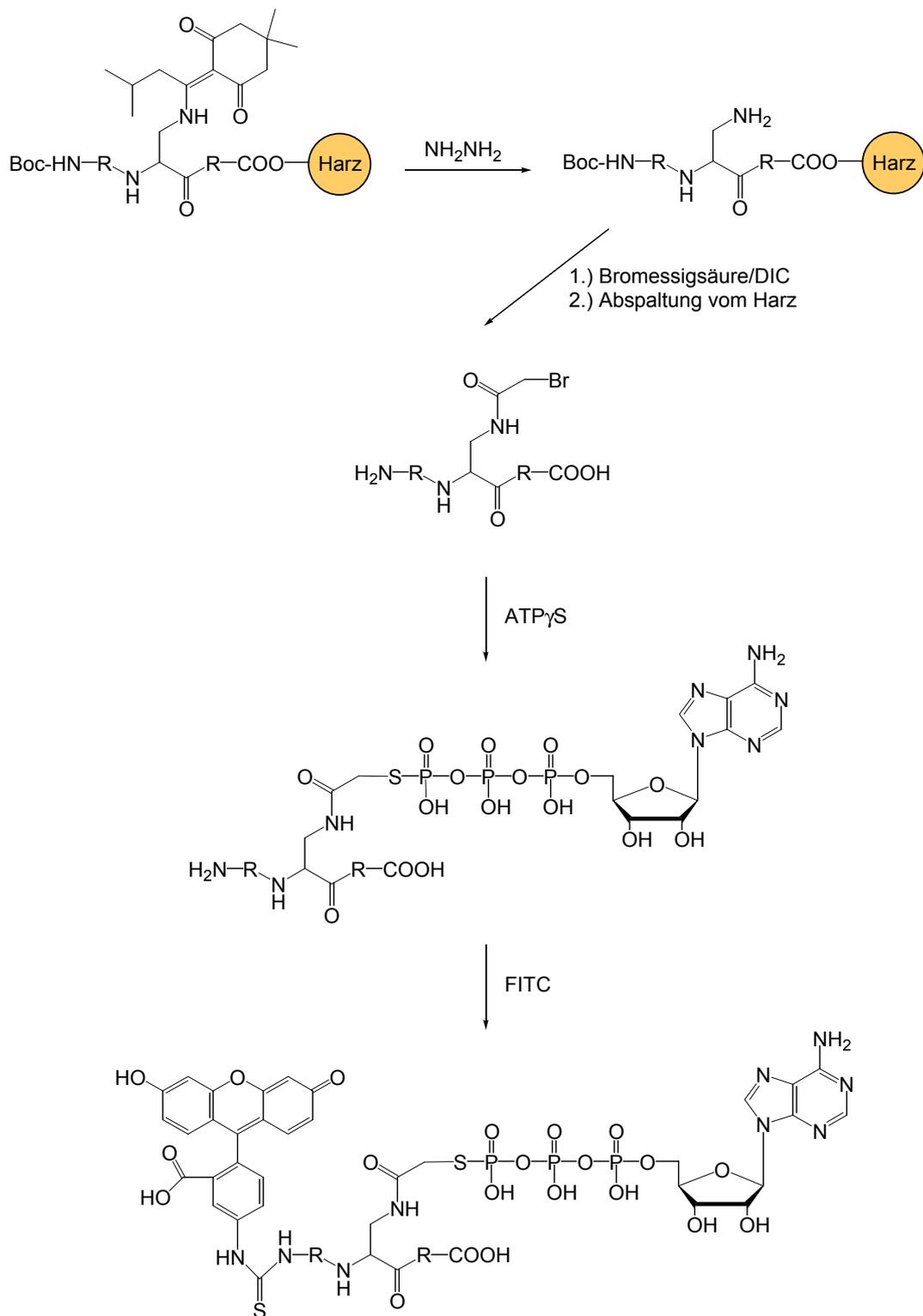
Unter diesen Abspaltungsbedingungen sind die Schutzgruppen der anderen Aminosäure-seitenketten ebenfalls stabil. Die entschützte Diaminopropionsäure kann dann über die

primäre Aminogruppe mit Bromessigsäure gekoppelt werden. Dies sollte über eine Carbodiimid-Kopplung mit Diisopropylcarbodiimid (DIC) möglich sein. Nach Abspaltung von der festen Phase kann das Peptid in einer Substitutionsreaktion mit ATP $\gamma$ S umgesetzt werden. Die Thiolgruppe des  $\gamma$ -Thiophosphatrests sollte dabei das als Abgangsgruppe aktivierte Brom der Bromessigsäure substituieren können. Der Linker aus Diaminopropionsäure und Bromessigsäure fixiert die beiden Komponenten ebenfalls in einem Abstand, der ungefähr dem Donor-Akzeptor-Abstand während des Phosphoryltransfers entspricht. Im Vergleich zu dem für den PKA-Inhibitor verwendeten Lysin ist ein solcher Linker aufgrund der Carboxyl-Gruppe etwas weniger flexibel und zudem leicht polar.



**Abb. 38:** Verwendung von Diaminopropionsäure und Bromessigsäure als kovalenten Linker zwischen der Peptid- und Nukleotid-Komponente des bifunktionellen Inhibitors. (A) Der Linker fixiert die beiden Komponenten in einem Abstand, der ungefähr dem Donor-Akzeptor-Abstand während des Phosphoryltransfers entspricht. (B) Die Thiolgruppe des  $\gamma$ -Thiophosphatrests erlaubt eine Substitutionsreaktion mit dem als Abgangsgruppe aktivierten Brom der Bromessigsäure.

Die Markierung mit dem Fluorophor soll an den freien N-Termini der Peptide erfolgen, um einen größtmöglichen Abstand zu der Linkerregion zu erreichen. Da unter den Abspaltungsbedingungen für die iv(Dde)-Schutzgruppe teilweise auch Fmoc-Gruppen abgespalten werden, wird bei der Peptidsynthese N-terminal ein Boc-geschütztes Alanin verwendet. Dadurch soll sichergestellt werden, dass die N-terminalen primären Aminogruppen der Peptide während der Carbodiimid-Kopplung geschützt sind. Nach Abspaltung von der festen Phase und Substitution mit ATP $\gamma$ S kann dann eine Fluoreszenzmarkierung der Inhibitoren durch Umsetzung der N-terminalen primären Aminogruppen mit Fluoresceinisothiocyanat erreicht werden.



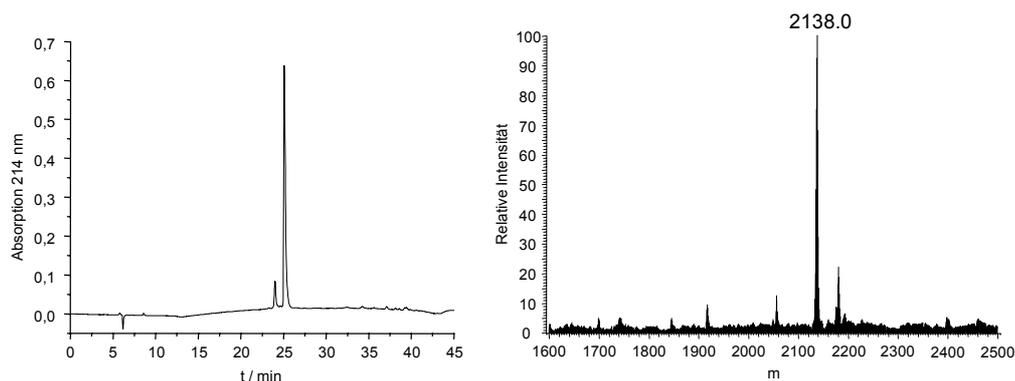
**Abb. 39:** Syntheschema für die Synthese von Fluorescein-markierten bifunktionellen Inhibitoren für skmMLCK **27** und smMLCK **28**.

### 3.5.7 Synthese von [Bromaceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19) **23**

Sequenz: H<sub>2</sub>N-APKKAKKRAGGANXNVFAMA-COOH

X = Bromaceto-Dpr

Die Synthese von **23** wird manuell im 0.2 mmol-Maßstab durchgeführt. Als feste Phase für die Synthese wird Fmoc-Ala-Wang-Harz verwendet. Nach Synthese des Peptids erfolgt die Entschützung der iv(Dde)-Schutzgruppe durch mehrfaches Behandeln mit einer Lösung von 2 % Hydrazinhydrat in DMF. Danach wird die Carbodiimid-Kopplung an die freie primäre Aminogruppe der Dpr mit Bromessigsäure/DIC durchgeführt. Anschließend erfolgt die Entschützung der Aminosäure-Seitenketten und die Abspaltung von der festen Phase. Nach Aufarbeitung wird das erhaltene Rohpeptid mit HPLC gereinigt. Die Gesamtausbeute bezogen auf den Synthesemaßstab wird nicht bestimmt. Die Identifizierung von [Bromaceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19) **23** erfolgt mittels MS und HPLC.



**Abb. 40:** HPLC-Chromatogramm und Massenspektrum von [Bromaceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19) **23** nach Reinigung.

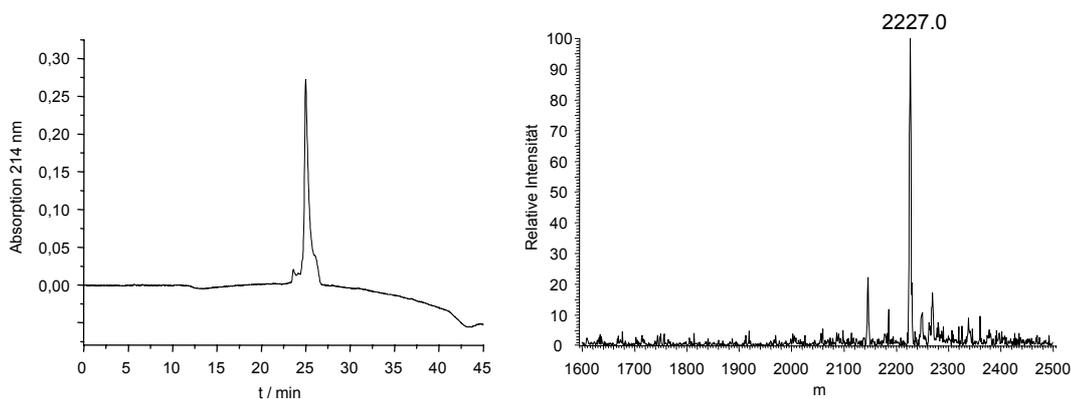
Der Peak im HPLC-Chromatogramm bei 25.1 min kann eindeutig [Bromaceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19) **23** zugeordnet werden. Daneben ist bei 24.1 min eine geringfügige Verunreinigung zu erkennen, die auch nach wiederholter HPLC-Reinigung nicht abgetrennt werden kann. Eine Identifizierung der Verunreinigung mittels MS ist nicht möglich. Die im Massenspektrum beobachtete relative Masse von 2138.0 für **23** stimmt gut mit der berechneten Molmasse überein.

### 3.5.8 Synthese von [Bromaceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24) **24**

Sequenz: H<sub>2</sub>N-AKTTKKRPQRATXNVFAMA-COOH

X = Bromaceto-Dpr

Die Synthese von **24** wird manuell im 0.2 mmol-Maßstab durchgeführt. Die Peptidsynthese und die weitere Aufarbeitung erfolgen wie für **23** beschrieben. Die Gesamtausbeute bezogen auf den Synthesemaßstab wird nicht bestimmt. Die Identifizierung von **24** erfolgt mittels MS und HPLC.

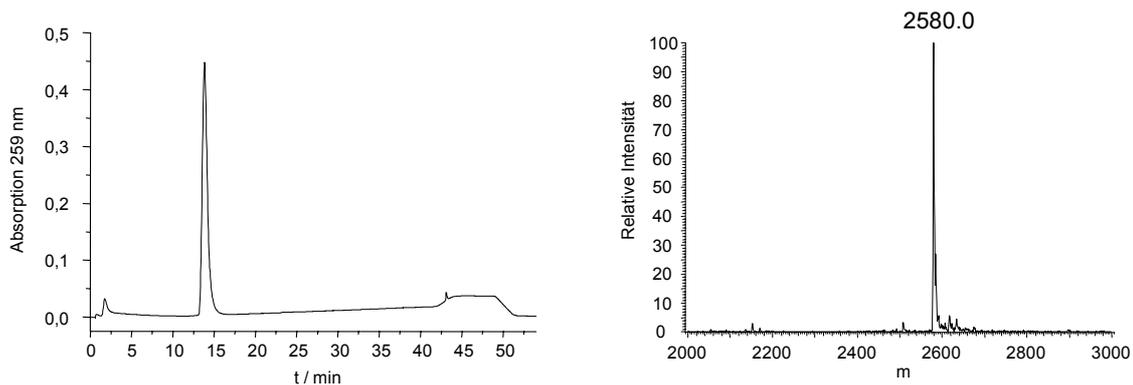


**Abb. 41:** HPLC-Chromatogramm und Massenspektrum von [Bromaceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24) **24** nach Reinigung.

Der Peak im HPLC-Chromatogramm bei 25.0 min kann eindeutig [Bromaceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24) **24** zugeordnet werden. Daneben ist bei 23.7 min eine geringfügige Verunreinigung zu erkennen, die auch nach wiederholter HPLC-Reinigung nicht abgetrennt werden kann. Eine Identifizierung der Verunreinigung mittels MS ist nicht möglich. Die im Massenspektrum beobachtete relative Masse von 2227.0 für **24** stimmt gut mit der berechneten Molmasse überein.

### 3.5.9 Synthese von P<sup>3</sup>-Thio-(S-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **25**

Für die Substitutionsreaktion wird [Bromaceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19) **23** mit ATP $\gamma$ S umgesetzt. Der entstandene Niederschlag wird abzentrifugiert und mehrfach mit MeOH/Wasser 4:1 gewaschen, um nicht abreagiertes Peptid zu entfernen. Eine weitere Reinigung von **25** wird nicht durchgeführt. Die Ausbeute wird nicht bestimmt. Die Identifizierung erfolgt mittels HPLC und MS.

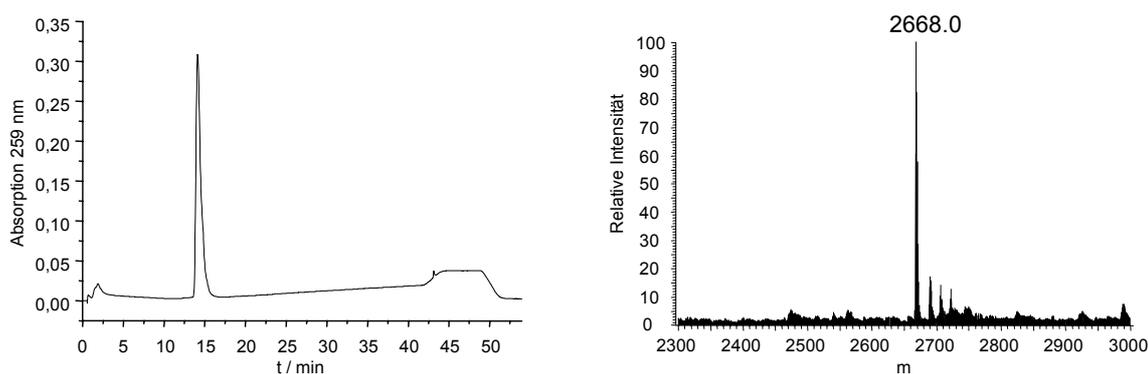


**Abb. 42:** HPLC-Anionenaustauscher-Chromatogramm und Massenspektrum von  $P^3$ -Thio-(S-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19))- $P^1$ -adenosin-triphosphat **25**.

Der Peak im HPLC-Anionenaustauscher-Chromatogramm bei 13.9 min kann eindeutig  $P^3$ -Thio-(S-[aceto-Dpr14, A20]sm-rMLC(1-19))- $P^1$ -adenosin-triphosphat **25** zugeordnet werden. Die im Massenspektrum beobachtete relative Masse von 2580.0 für **25** stimmt gut mit der berechneten Molmasse überein.

### 3.5.10 Synthese von $P^3$ -Thio-(S-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24))- $P^1$ -adenosin-triphosphat **26**

Die Substitutionsreaktion mit [Bromaceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24) **24** und die weitere Aufarbeitung erfolgen wie für **25** beschrieben. Die Ausbeute wird nicht bestimmt. Die Identifizierung von **26** erfolgt mittels HPLC und MS.

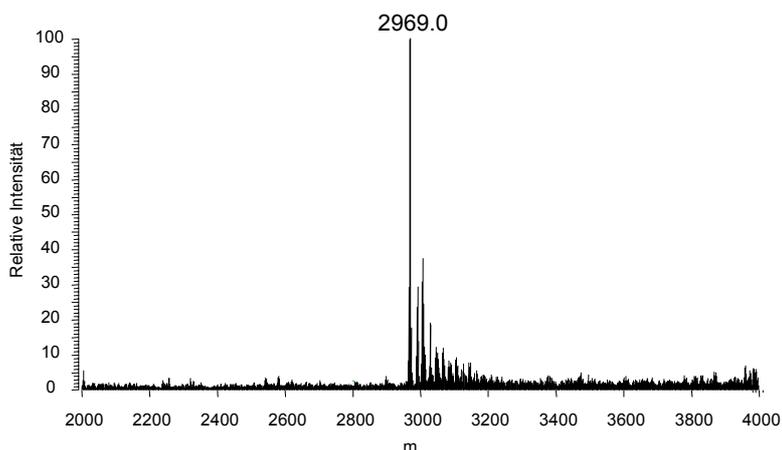


**Abb. 43:** HPLC-Anionenaustauscher-Chromatogramm und Massenspektrum von  $P^3$ -Thio-(S-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24))- $P^1$ -adenosin-triphosphat **26**.

Der Peak im HPLC-Anionenaustauscher-Chromatogramm bei 14.3 min kann eindeutig P<sup>3</sup>-Thio-(S-[aceto-Dpr19, A25]skm-rMLC(7-24))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **26** zugeordnet werden. Die im Massenspektrum beobachtete relative Masse von 2668.0 für **26** stimmt gut mit der berechneten Molmasse überein.

### 3.5.11 Synthese von P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-FITC-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19)))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **27**

Für die N-terminale Fluoreszenzmarkierung mit FITC muss der pH-Wert nahe dem Neutralpunkt liegen, um eine Mehrfachmarkierung an den Lysin-Seitenketten weitgehend zu verhindern. Dazu wird P<sup>3</sup>-Thio-(S-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **25** bei pH 7.5 mit FITC umgesetzt. Der Reaktionsansatz wird anschließend mit HPLC gereinigt, wobei die gesammelten Produktfraktionen direkt in TEAHCO<sub>3</sub> umgepuffert und lyophilisiert werden. Aufgrund der notwendigen sauren HPLC-Pufferbedingungen ist eine teilweise Abspaltung von ADP zu beobachten. Zur Auftrennung des Gemisches aus dem fluoreszenzmarkierten einfach thiophosphorylierten Addukt und dem gewünschten P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-FITC-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19)))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **27** erfolgt daher eine weitere Reinigung mit HPLC-Anionenaustauscher-Chromatographie. Die Ausbeute wird nicht bestimmt. Die Identifizierung erfolgt mittels HPLC und MS.

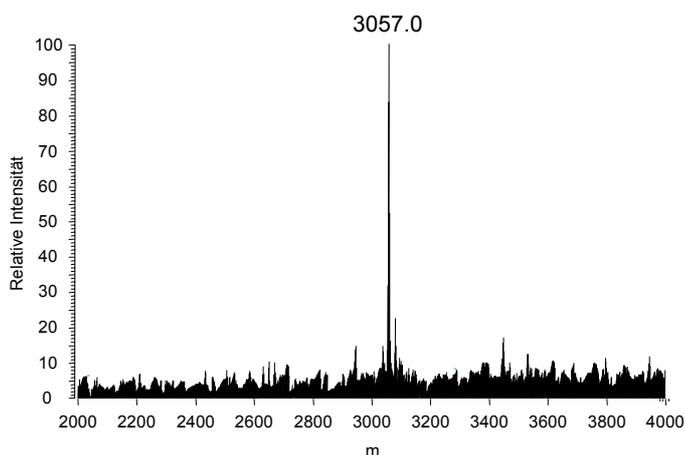


**Abb. 44:** Massenspektrum von P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-FITC-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19)))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **27** nach Reinigung.

Die im Massenspektrum beobachtete relative Masse von 2969.0 für **27** stimmt gut mit der berechneten Molmasse überein. Die Verbreiterung des Massenpeaks zu höheren Massen ist auf Natrium-Addukte zurückzuführen.

### 3.5.12 Synthese von P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-FITC-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24)))<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **28**

Die Fluoreszenzmarkierung von P<sup>3</sup>-Thio-(S-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **26** und die weitere Aufarbeitung erfolgen wie für **27** beschrieben. Die Ausbeute wird nicht bestimmt. Die Identifizierung von **28** erfolgt mittels HPLC und MS.



**Abb. 45:** Massenspektrum von P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-FITC-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24)))<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **28** nach Reinigung.

Die im Massenspektrum beobachtete relative Masse von 3057.0 für **28** stimmt gut mit der berechneten Molmasse überein.

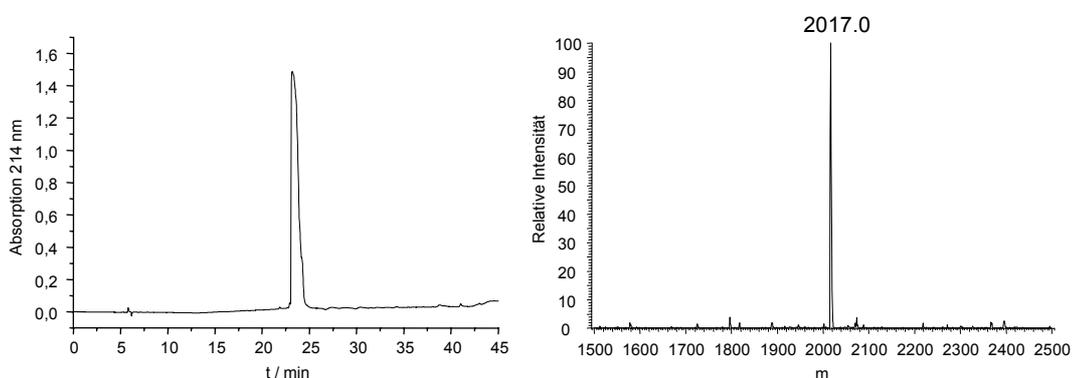
### 3.5.13 Synthese von [A20]skm-rMLC(1-19) **29**

Sequenz: H<sub>2</sub>N-APKKAKKRAGGANSNVFAMA-COOH

Um allgemein den Einfluss der Peptid-Komponente der synthetisierten fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitoren **27** und **28** auf eine Inhibition von skmMLCK abschätzen zu können, werden zusätzlich noch ein unmodifiziertes [A20]skm-rMLC(1-19)-Peptid **29** sowie ein [A14, A20]skm-rMLC(1-19)-Inhibitor-Peptid **30**, in dem das zu phosphorylierende Serin durch Alanin substituiert ist, synthetisiert.

Die Synthese von **29** wird manuell im 0.2 mmol-Maßstab durchgeführt. Als feste Phase für die Synthese wird Fmoc-Ala-Wang-Harz verwendet. Nach Synthese des Peptids erfolgt die Entschützung der Aminosäure-Seitenketten und die Abspaltung von der festen Phase. Nach Aufarbeitung wird das erhaltene Rohpeptid mit HPLC gereinigt. Die

Gesamtausbeute bezogen auf den Synthesemaßstab wird nicht bestimmt. Die Identifizierung von [A20]skm-rMLC(1-19) **29** erfolgt mit MS und HPLC.



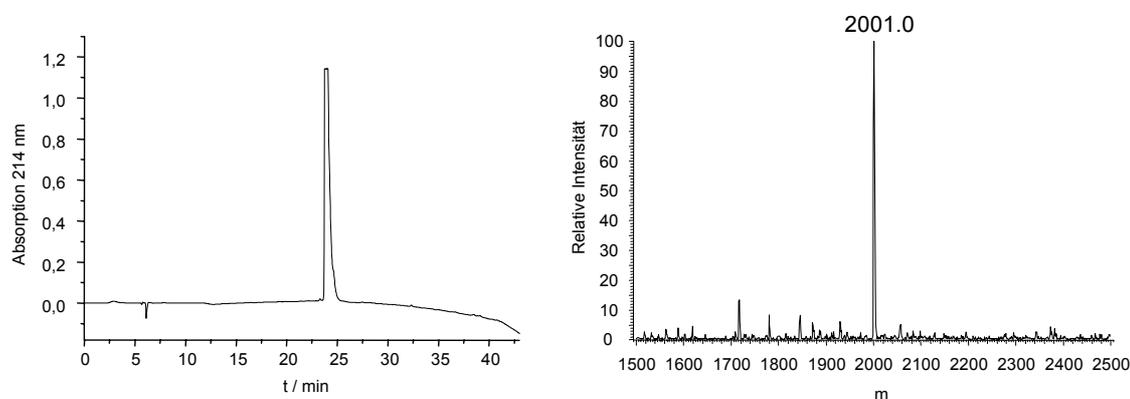
**Abb. 46:** HPLC-Chromatogramm und Massenspektrum von [A20]skm-rMLC(1-19) **29** nach Reinigung.

Der Peak im HPLC-Chromatogramm bei 23.3 min kann eindeutig [A20]skm-rMLC(1-19) **29** zugeordnet werden. Die im Massenspektrum beobachtete relative Masse von 2017.0 für **29** stimmt gut mit der berechneten Molmasse überein.

### 3.5.14 Synthese von [A14, A20]skm-rMLC(1-19) **30**

Sequenz: H<sub>2</sub>N-APKKAKKRAGGANANVFAMA-COOH

Die Synthese von **30** wird manuell im 0.2 mmol-Maßstab durchgeführt. Die Peptidsynthese und die weitere Aufarbeitung erfolgen wie für **29** beschrieben. Die Gesamtausbeute bezogen auf den Synthesemaßstab wird nicht bestimmt. Die Identifizierung von [A14, A20]skm-rMLC(1-19) **30** erfolgt mittels MS und HPLC.



**Abb. 47:** HPLC-Chromatogramm und Massenspektrum von [A14, A20]skm-rMLC(1-19) **30** nach Reinigung.

Der Peak im HPLC-Chromatogramm bei 24.0 min kann eindeutig [A14, A20]skm-rMLC(1-19) **30** zugeordnet werden. Die im Massenspektrum beobachtete relative Masse von 2001.0 für **30** stimmt gut mit der berechneten Molmasse überein.

### **3.6 Untersuchung der Inhibition von skmMLCK durch die fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitoren**

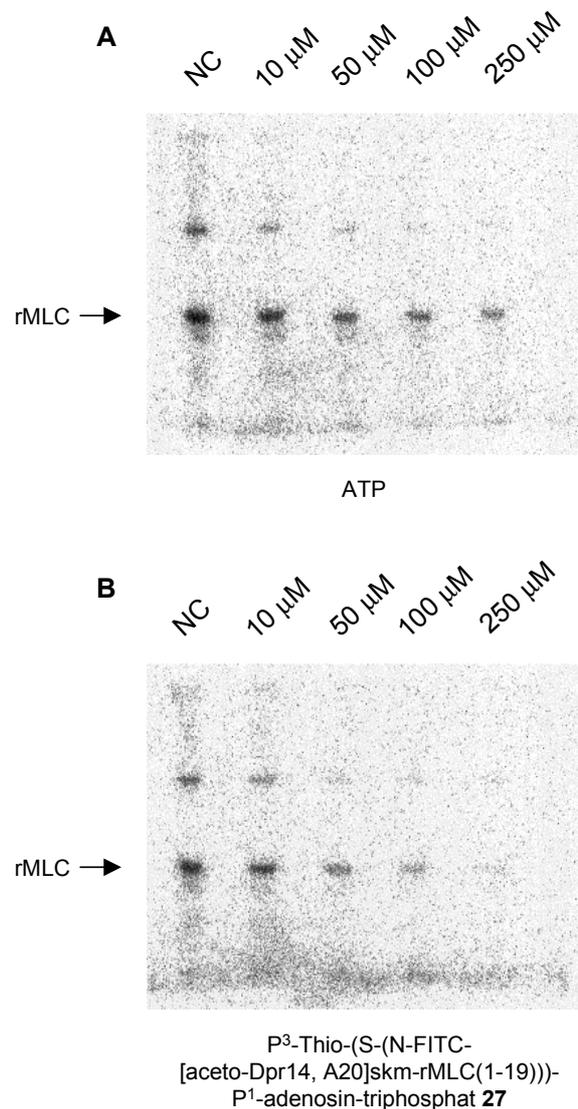
Um die Inhibition von skmMLCK durch die synthetisierten fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitoren **27** und **28** zu untersuchen, werden Verdrängungsexperimente mit radioaktiv markiertem [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP durchgeführt. Es wird dabei die Inhibierung der Phosphorylierung der rMLC (18.8 kD) durch MLCK untersucht. Die rMLC (18.8 kD) und die verwendete MLCK stammen beide aus menschlichen Herzmuskel und stehen als rekombinante Proteine zur Verfügung (Elena Rostkova und Andrei Iakovenko, MPI, Dortmund). Da die MLCK aus Herzmuskel auch die skm-rMLC phosphoryliert, wird diese im Folgenden als skmMLCK bezeichnet. Aus der beobachteten Verdrängung von [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP durch die nicht radioaktiv markierten Inhibitoren kann die Inhibierung der Phosphorylierungsreaktion qualitativ abgeschätzt werden.

#### **3.6.1 Verdrängungsexperiment mit P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-FITC-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19)))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **27****

Die Phosphorylierungsansätze enthalten die rMLC, radioaktiv markiertes [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP und 0, 10, 50, 250 und 500  $\mu\text{M}$  der nicht radioaktiv markierten Verbindung **27** bzw. als Vergleichsprobe ATP in Phosphorylierungspuffer. Die Expositionszeit für die Autoradiogramme beträgt jeweils 2 min.

In den Autoradiogrammen in Abbildung 48 ist die Verdrängung von radioaktiv markiertem [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP durch ATP und P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-FITC-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19)))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **27** bei der Phosphorylierungsreaktion von rMLC durch skmMLCK zu erkennen. Man sieht deutlich die Bande für die  $^{32}\text{P}$ -phosphorylierten rMLC. Die andere höher laufende Bande stammt von autophosphorylierter skmMLCK. In Gegenwart von ATP (A) ist bei Erhöhung der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  auf 250  $\mu\text{M}$  eine deutliche Verdrängung des radioaktiv markierten [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP zu erkennen und bei der höchsten Konzentration ist nur noch eine stark abgeschwächte Bande zu sehen. Wie zu erwarten, zeigt das natürliche Nukleotid-Substrat ATP eine hohe Affinität zu der Protein-Kinase. In (B) sieht man die gleiche Konzentrationsreihe für den synthetisierten Fluorescein-

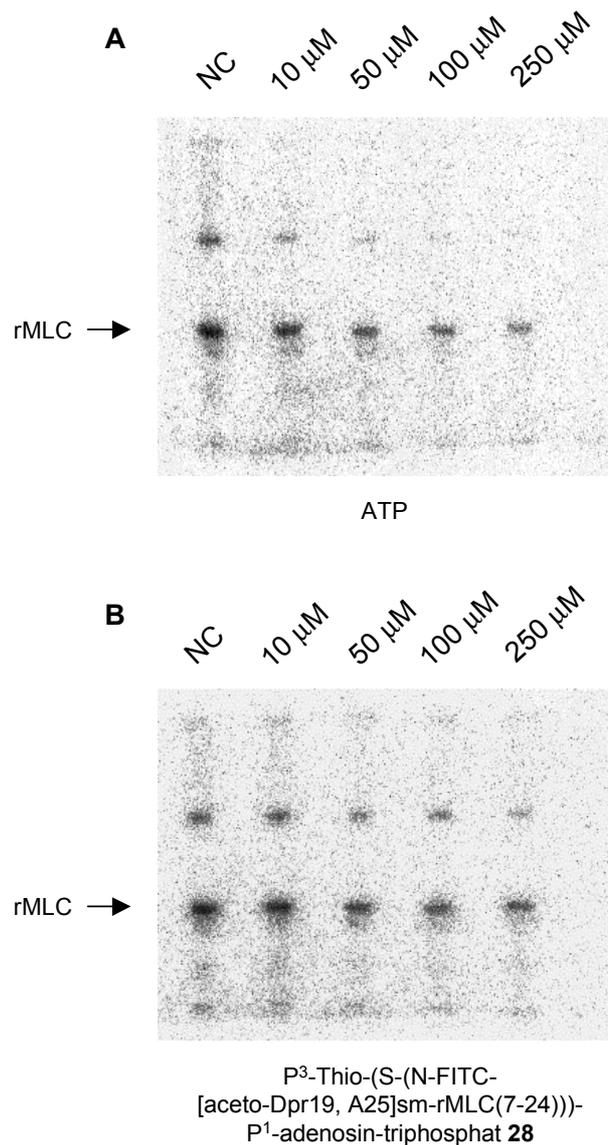
markierten bifunktionellen skmMLCK-Inhibitor **27**. Im Vergleich zu ATP erkennt man, dass hier bei einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  eine nahezu vollständige Verdrängung von radioaktiv markiertem  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  eintritt. Der skmMLCK-Inhibitor **27**, der als Peptid-Komponente die Sequenz für skm-rMLC enthält, bindet also an die skmMLCK und inhibiert die Phosphorylierungsreaktion stärker als das nicht radioaktiv markierte natürliche Nukleotid-Substrat ATP. Nun muss durch ein Experiment mit dem entsprechenden smMLCK-Inhibitor gezeigt werden, ob durch die Wahl des Peptid-Fragments eine Diskriminierung der Protein-Kinase möglich ist.



**Abb. 48:** Autoradiogramme der Verdrängung von  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  durch (A) ATP und (B)  $\text{P}^3\text{-Thio-(S-(N-FITC-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19)))-P}^1\text{-adenosin-triphosphat } \mathbf{27}$  bei der Phosphorylierung von rMLC durch skmMLCK.

### 3.6.2 Verdrängungsexperiment mit P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-FITC-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24)))<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **28**

Die Phosphorylierungsansätze enthalten die rMLC, radioaktiv markiertes [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP und 0, 10, 50, 250 und 500  $\mu$ M der nicht radioaktiv markierten Verbindung **28** bzw. als Vergleichsprobe ATP in Phosphorylierungspuffer. Die Expositionszeit für die Autoradiogramme beträgt jeweils 2 min.



**Abb. 49:** Autoradiogramme der Verdrängung von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP durch (A) ATP und (B) P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-FITC-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24)))<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **28** bei der Phosphorylierung von rMLC durch skmMLCK.

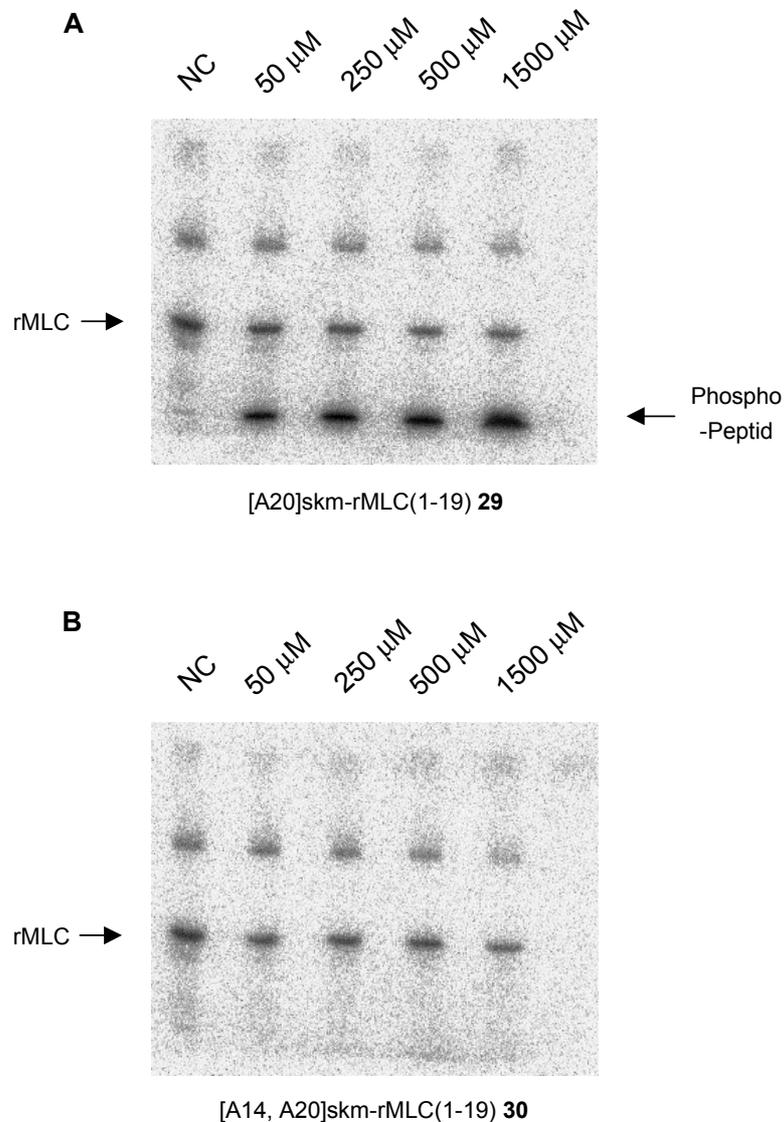
In den Autoradiogrammen in Abbildung 49 ist die Verdrängung von radioaktiv markiertem  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  durch ATP und  $\text{P}^3\text{-Thio-(S-(N-FITC-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24)))}$ - $\text{P}^1\text{-adenosin-triphosphat 28}$  bei der Phosphorylierungsreaktion von rMLC durch skmMLCK zu erkennen. (A) zeigt wiederum die Verdrängung durch ATP. In (B) ist die Inhibierung der Phosphorylierung durch den smMLCK-Inhibitor **28** zu erkennen. Im Vergleich zu dem skmMLCK-Inhibitor **27** ist hier bei Erhöhung der Konzentration von  $10\ \mu\text{M}$  auf  $250\ \mu\text{M}$  nur eine wesentlich schwächere Verdrängung des radioaktiv markierten  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  zu beobachten. Auch bei der höchsten Konzentration ist noch eine starke Bande für die  $^{32}\text{P}$ -phosphorylierten rMLC zu sehen. Der Inhibitor mit dem sm-rMLC-Peptid-Fragment zeigt also nur eine schwache Inhibition von skmMLCK. Dies zeigt, dass die synthetisierten bifunktionellen Inhibitoren aufgrund der Sequenz der verwendeten Peptid-Fragmente in der Lage sind, zwischen nahe verwandten Protein-Kinasen zu diskriminieren. Der bifunktionelle Inhibitor **27** mit der Peptid-Sequenz der skm-rMLC ist daher ein spezifischer Inhibitor für skmMLCK.

### 3.6.3 Verdrängungsexperiment mit [A20]skm-rMLC(1-19) **29** und [A14, A20]skm-rMLC(1-19) **30**

Der fluoreszenzmarkierte skmMLCK-Inhibitor **27** zeigt eine etwas höhere Affinität zu seiner Ziel-Kinase als das natürliche Nukleotid-Substrat ATP. Im Folgenden soll untersucht werden, ob diese erhöhte Affinität alleine durch das spezifisch bindende Peptid-Fragment bedingt ist oder ob diese auf ein Zusammenwirken der beiden Inhibitor-Komponenten zurückzuführen ist. Dafür wird ein Inhibitor-Peptid mit der Sequenz der skm-rMLC verwendet, in dem das Serin an der Phosphorylierungsstelle durch ein Alanin substituiert ist.

Die Phosphorylierungsansätze enthalten die rMLC, radioaktiv markiertes  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  und 0, 250, 500, 1000 und  $1500\ \mu\text{M}$  der nicht radioaktiv markierten Peptide **29** und **30**. Die Expositionszeit für die Autoradiogramme beträgt jeweils 1 min. In den Autoradiogrammen in Abbildung 50 ist die Verdrängung von radioaktiv markiertem  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  durch [A20]skm-rMLC(1-19) **29** und [A14, A20]skm-rMLC(1-19) **30** bei der Phosphorylierungsreaktion von rMLC durch skmMLCK zu erkennen. In (A) ist die Verdrängung durch das phosphorylierbare skm-rMLC-Peptid zu sehen. Die weiter unten laufende Bande ist dem  $^{32}\text{P}$ -phosphorylierten Peptid [A20]skm-rMLC(1-19) **29** zuzuordnen, welches die Erkennungssequenz von skm-rMLC enthält und mit den rMLC um die Bindungsstelle des Enzyms konkurriert. Für eine Konzentration von  $250\ \mu\text{M}$  ist hier nur eine ganz geringe Abschwächung der Bande für rMLC zu erkennen. Der Inhibitor **27**

dagegen zeigt bei dieser Konzentration bereits vollständige Verdrängung von radioaktiv markiertem  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ . Auch bei einer Konzentrationserhöhung des Peptids auf  $1500\ \mu\text{M}$  ist nur eine schwache Verdrängung zu beobachten.



**Abb. 50:** Autoradiogramme der Verdrängung von  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  durch (A) [A20]skm-rMLC(1-19) **29** und (B) [A14, A20]skm-rMLC(1-19) **30** bei der Phosphorylierung von rMLC durch skmMLCK.

Daraus lässt sich schließen, dass das Peptid aufgrund seiner Sequenz spezifisch an skmMLCK bindet und entsprechend phosphoryliert wird, aber die Affinität zu der Protein-Kinase im Vergleich zu der rMLC nicht sehr groß ist. (B) zeigt das gleiche Verdrängungsexperiment mit dem Peptid [A14, A20]skm-rMLC(1-19) **30**. Hier ist entsprechend keine Bande für ein phosphoryliertes Peptid zu erkennen, da das zu phosphorylierende Serin durch ein Alanin substituiert ist. Für das Inhibitor-Peptid kann im Vergleich mit dem bifunktionellen Inhibitor **27** im Konzentrationsbereich von  $50\ \mu\text{M}$  bis

1500  $\mu\text{M}$  ebenfalls nur eine schwache Konkurrenz mit dem natürlichen Protein-Substrat beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die erhöhte Affinität des bifunktionellen skmMLCK-Inhibitors **27** auf ein gleichzeitiges Binden der beiden Inhibitor-Komponenten zurückzuführen ist und nicht allein durch das spezifisch bindende Peptid-Fragment bedingt ist.

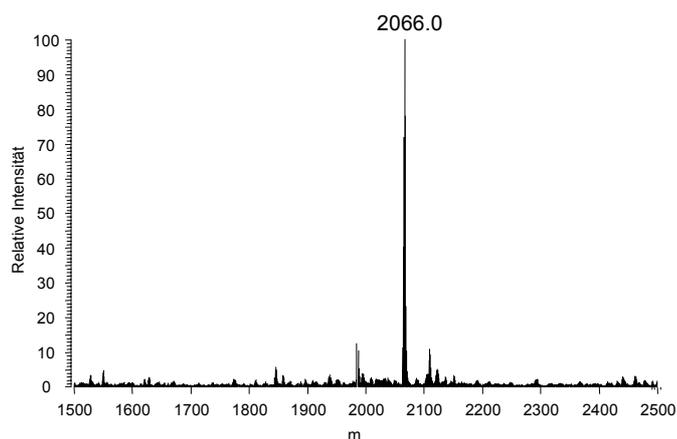
### 3.7 Kinetische Untersuchung der Inhibition von skmMLCK

Aus den Verdrängungsexperimenten mit radioaktiv markiertem [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP kann für den fluoreszenzmarkierten bifunktionellen skmMLCK-Inhibitor **27** eine Affinität zu skmMLCK abgeschätzt werden, die in der Größenordnung des natürlichen Nukleotid-Substrats ATP liegt (siehe Abschnitt 3.6.1). Um die Affinität eines solchen Inhibitors auch quantitativ beschreiben zu können, soll die Phosphorylierungsreaktion der rMLC durch skmMLCK und die Inhibition durch den skmMLCK-Inhibitor kinetisch untersucht werden. Zum einen soll der  $K_m$ -Wert für die Phosphorylierungsreaktion der rMLC durch skmMLCK bestimmt werden, zum anderen soll die Inhibitorkonstante  $K_i$  für die Inhibition durch den nicht-fluoreszenzmarkierten bifunktionellen skmMLCK-Inhibitor ermittelt werden.

#### 3.7.1 Synthese von [Bromaceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(2-19) **23a**

Sequenz:  $\text{H}_2\text{N-PKKAKKRAGGANXNVFAMA-COOH}$   
X = Bromaceto-Dpr

Das Peptid-Fragment für den nicht-fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitor entspricht der Sequenz von Peptid **23**, ist jedoch N-terminal um ein Alanin verkürzt. Die Synthese von **23a** wird manuell im 0.2 mmol-Maßstab durchgeführt. Als feste Phase für die Synthese wird Fmoc-Ala-Wang-Harz verwendet. Nach Synthese des Peptids erfolgt die Entschützung der iv(Dde)-Schutzgruppe durch mehrfaches Behandeln mit einer Lösung von 2 % Hydrazinhydrat in DMF. Danach wird die Carbodiimid-Kopplung an die freie primäre Aminogruppe der Dpr mit Bromessigsäure/DIC durchgeführt. Anschließend erfolgt die Entschützung der Aminosäure-Seitenketten und die Abspaltung von der festen Phase. Nach Aufarbeitung wird das erhaltene Rohpeptid mit HPLC gereinigt. Die Gesamtausbeute bezogen auf den Synthesemaßstab wird nicht bestimmt. Die Identifizierung von [Bromaceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(2-19) **23a** erfolgt mittels MS und HPLC.

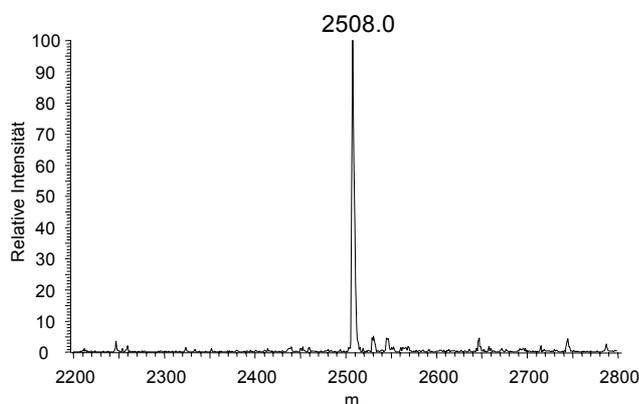


**Abb. 51:** Massenspektrum von [Bromaceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(2-19) **23a** nach Reinigung.

Die im Massenspektrum beobachtete relative Masse von 2066.0 für **23a** stimmt gut mit der berechneten Molmasse überein.

### 3.7.2 Synthese von P<sup>3</sup>-Thio-(S-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(2-19))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **25a**

Für die Substitutionsreaktion wird [Bromaceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(2-19) **23a** mit ATP $\gamma$ S umgesetzt. Der entstandene Niederschlag wird abzentrifugiert und mehrfach mit MeOH/Wasser 4:1 gewaschen, um nicht abreagiertes Peptid zu entfernen. Eine weitere Reinigung von **25a** wird nicht durchgeführt. Die Ausbeute wird nicht bestimmt. Die Identifizierung erfolgt mittels HPLC und MS. Die im Massenspektrum beobachtete relative Masse von 2508.0 für **25a** stimmt gut mit der berechneten Molmasse überein.

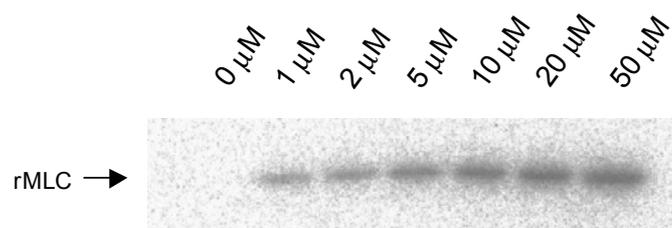


**Abb. 52:** Massenspektrum von P<sup>3</sup>-Thio-(S-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(2-19))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **25a**.

### 3.7.3 Ermittlung des $K_m$ für die Phosphorylierung von rMLC durch skmMLCK

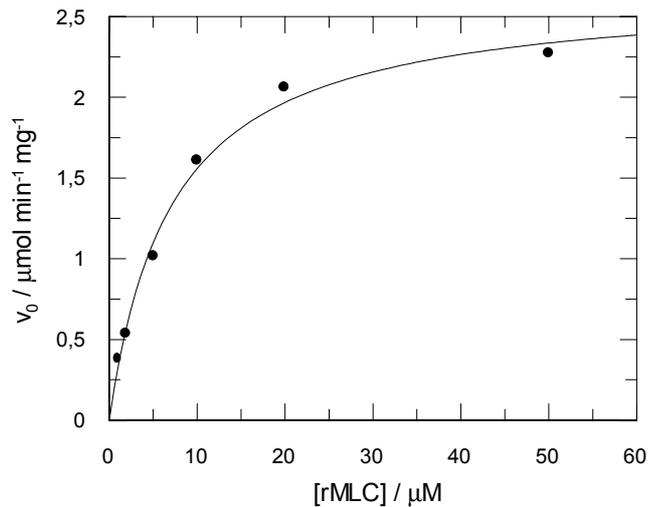
Zur Ermittlung des  $K_m$ -Wertes (Michaelis-Konstante) der Phosphorylierung der rMLC durch skmMLCK werden Phosphorylierungsexperimente mit radioaktiv markiertem  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  durchgeführt. Dabei werden die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der Phosphorylierung der rMLC (18.8 kD) durch skmMLCK in Abhängigkeit von der rMLC-Konzentration ermittelt. Daraus können mit Hilfe der Michaelis-Menten-Beziehung die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{\max}$  der Phosphorylierungsreaktion sowie der entsprechende  $K_m$ -Wert bestimmt werden. Der  $K_m$ -Wert entspricht dabei der Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Hälfte ihres Maximalwertes liegt und ist ein Maß für die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat.

Die Phosphorylierungsansätze (25  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen) für die kinetischen Untersuchungen enthalten jeweils ATP,  $\text{CaCl}_2$ , CaM und  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  in Phosphorylierungspuffer. Die Substratkonzentrationen an rMLC betragen 0, 1, 2, 5, 10, 20 und 50  $\mu\text{M}$ . Zur Ermittlung der Bandenintensitäten werden die erhaltenen Autoradiogramme mit Hilfe des Programms AIDA Image Analyzer Software ausgewertet. Durch eine zusätzliche Eichmessung mit definierten Mengen an  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  können die Stoffmengenumsätze berechnet werden. Für die Berechnungen werden jeweils die Mittelwerte aus zwei Phosphorylierungsexperimenten verwendet. Die Analyse der kinetischen Daten erfolgt mit dem Programm GraFit.



**Abb. 53:** Ausschnitt des Autoradiogramms der Phosphorylierung von rMLC durch skmMLCK bei verschiedenen Substratkonzentrationen.

Die Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration zeigt die hyperbolische Abhängigkeit einer einfachen Michaelis-Menten-Reaktion. Die kinetischen Konstanten erhält man durch Anpassung der Daten an die Michaelis-Menten-Gleichung mit dem Programm GraFit.



**Abb. 54:** Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten der Phosphorylierung von rMLC durch skmMLCK gegen die Substratkonzentration sowie die Anpassung an die Michaelis-Menten-Gleichung.

Die Michaelis-Menten-Gleichung lautet:

$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

mit  $v_0$  : Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion  
 $V_{\max}$  : Maximalgeschwindigkeit der Reaktion  
 $[S]$  : Substratkonzentration [rMLC]

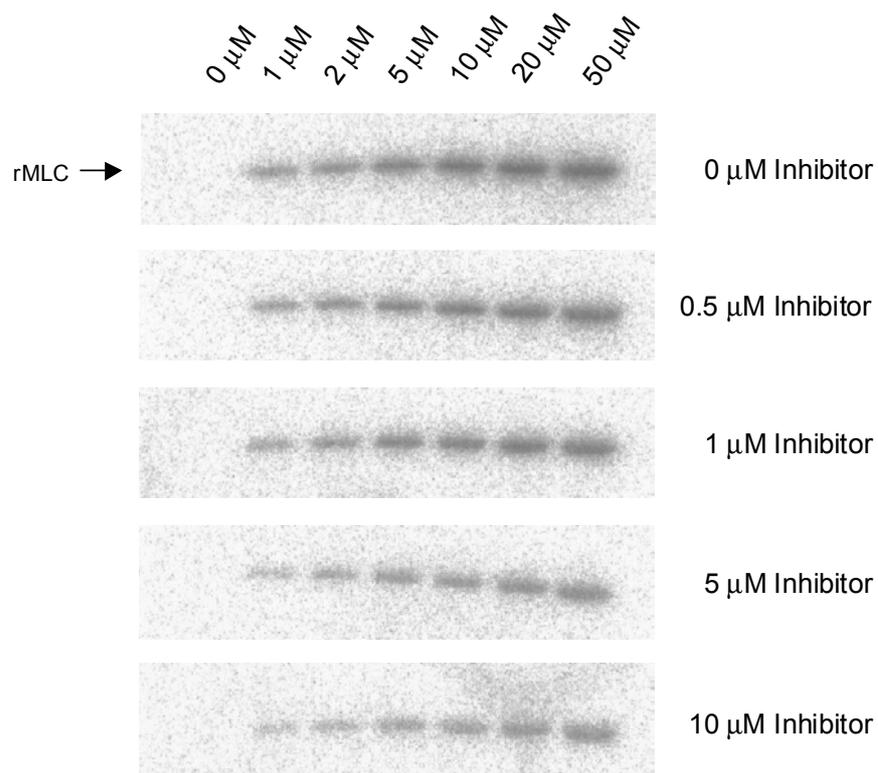
Für die Michaelis-Konstante ergibt sich ein Wert von  $K_m = 7.1 \mu\text{M}$ . Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit gibt den Stoffmengenumsatz pro Zeiteinheit und pro mg eingesetztem Enzym wieder und beträgt  $V_{\max} = 2.7 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ .

### 3.7.4 Ermittlung des $K_i$ für die Inhibition von skmMLCK durch den bifunktionellen skmMLCK-Inhibitor 25a

Zur Ermittlung der Inhibitorkonstante  $K_i$  für die Inhibition der Phosphorylierung der rMLC durch skmMLCK in Gegenwart von  $\text{P}^3$ -Thio-(S-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(2-19))- $\text{P}^1$ -adenosin-triphosphat **25a** werden Verdrängungsexperimente mit radioaktiv markiertem  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  durchgeführt. Dabei werden die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der Phosphorylierung der rMLC (18.8 kD) durch skmMLCK in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration ermittelt. Daraus kann mit Hilfe der Michaelis-Menten-Beziehung

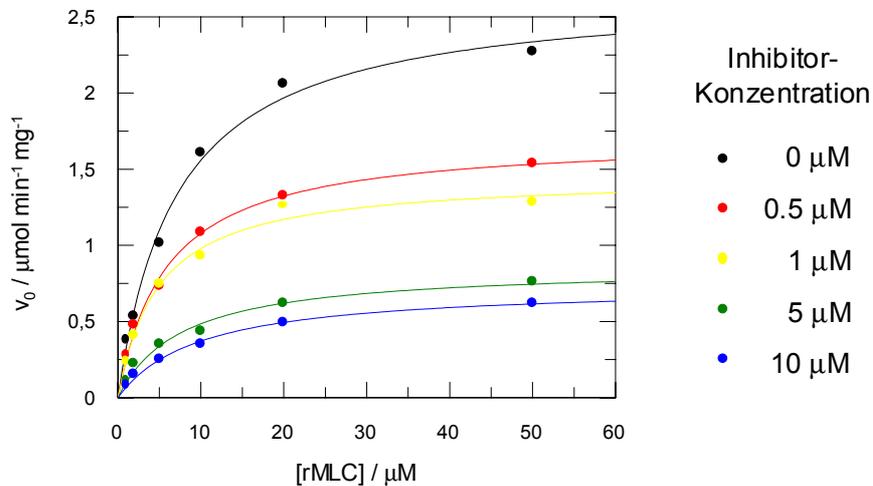
die Inhibitorkonstante  $K_i$  berechnet werden. Der  $K_i$ -Wert ist ein Maß für die Hemmung der Enzymreaktion durch den Inhibitor.

Die Phosphorylierungsansätze (25  $\mu$ l Gesamtvolumen) für die kinetischen Untersuchungen enthalten jeweils ATP,  $\text{CaCl}_2$ , CaM und  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  in Phosphorylierungspuffer. Die Substratkonzentrationen an rMLC betragen 0, 1, 2, 5, 10, 20 und 50  $\mu$ M. Es wird je eine Versuchsreihe in Gegenwart von 0, 0.5, 1, 5 und 10  $\mu$ M  $\text{P}^3$ -Thio-(S-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(2-19))- $\text{P}^1$ -adenosin-triphosphat **25a** durchgeführt. Zur Ermittlung der Bandenintensitäten werden die erhaltenen Autoradiogramme mit Hilfe des Programms AIDA Image Analyzer Software ausgewertet. Durch eine zusätzliche Eichmessung mit definierten Mengen an  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  können die Stoffmengenumsätze berechnet werden. Für die Berechnungen werden jeweils die Mittelwerte aus zwei Phosphorylierungsexperimenten verwendet. Die Analyse der kinetischen Daten erfolgt mit dem Programm GraFit.



**Abb. 55:** Ausschnitte der Autoradiogramme der Phosphorylierung von rMLC durch skmMLCK bei verschiedenen Substratkonzentrationen in Gegenwart der angegebenen Konzentration des bifunktionellen skmMLCK-Inhibitors **25a**.

Die Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration für die verschiedenen Inhibitorkonzentrationen liefert hier eine Schar von Kurven.

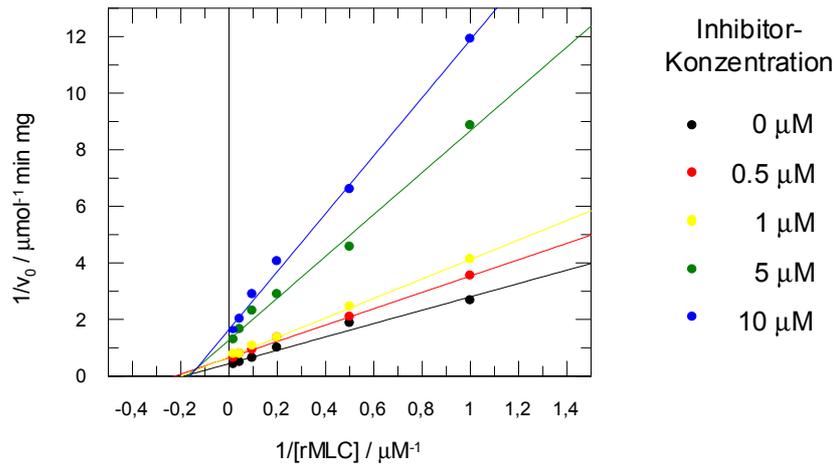


**Abb. 56:** Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten der Phosphorylierung von rMLC durch skmMLCK gegen die Substratkonzentration für verschiedene Inhibitorkonzentrationen sowie die jeweilige Anpassung an die Michaelis-Menten-Gleichung.

Nach Anpassung der erhaltenen Daten an die einfache Michaelis-Menten-Gleichung erkennt man, dass die  $K_m$ -Werte bei steigender Inhibitorkonzentration nahezu unverändert bleiben, die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{max}$  jedoch niedriger wird. Bei einer einfachen kompetitiven Hemmung bleibt  $V_{max}$ , die Umsatzgeschwindigkeit bei Substratsättigung, jedoch unabhängig von der Anwesenheit des Inhibitors konstant. Es muss sich hier also um eine andere Art von Hemmung handeln. Eine anschaulichere Darstellung der kinetischen Daten kann in einer Lineweaver-Burk- oder doppelt-reziproken Auftragung erfolgen. Dafür bildet man die reziproke Form der einfachen Michaelis-Menten-Gleichung:

$$\frac{1}{v_0} = \left( \frac{K_m}{V_{max}} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Trägt man nun  $1/v_0$  gegen  $1/[S]$  auf, erhält man eine Gerade mit der Steigung  $K_m/V_{max}$ , dem Schnittpunkt mit der Ordinate  $1/V_{max}$  und dem extrapolierten Schnittpunkt mit der Abszisse  $-1/K_m$ . Daraus können ebenfalls die kinetischen Konstanten ermittelt werden.



**Abb. 57:** Lineweaver-Burk-Auftragung für die Phosphorylierung von rMLC durch skmMLCK für verschiedene Inhibitorkonzentrationen und die jeweilige Anpassung an die reziproke Form der einfachen Michaelis-Menten-Gleichung.

Würde eine einfache kompetitive Inhibition vorliegen, so müssten sich alle Geraden in einem Punkt auf der Ordinate schneiden, da für unendlich große Substratkonzentrationen auch bei Erhöhung der Inhibitorkonzentration die maximale Reaktionsgeschwindigkeit konstant bleibt. Im Falle einer unkompetitiven Hemmung würde man eine Schar paralleler Geraden erhalten, da sich  $K_m$  und  $V_{max}$  um den gleichen Faktor ändern und somit die Steigung der Geraden ( $K_m/V_{max}$ ) immer gleich ist. Es handelt sich hier also um eine gemischte Hemmung. Die Michaelis-Menten-Gleichung für die gemischte Hemmung lautet:

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{\alpha \cdot K_m + \alpha' \cdot [S]}$$

Die entsprechende Lineweaver-Burk-Gleichung für eine gemischte Hemmung lautet:

$$\frac{1}{v_0} = \left( \frac{\alpha \cdot K_m}{V_{max}} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{max}}$$

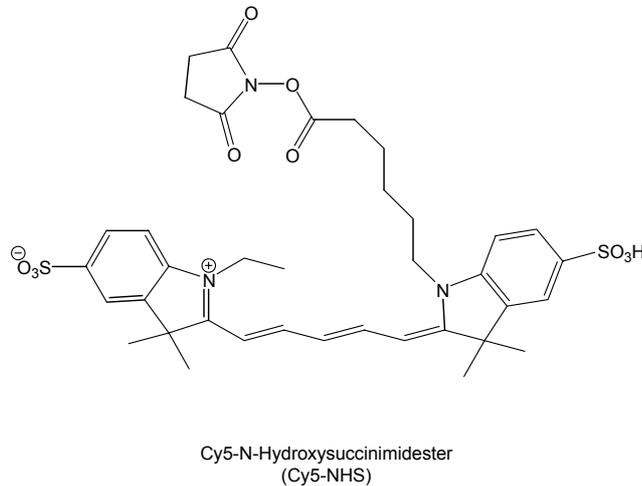
wobei  $\alpha = 1 + ([I]/K_i)$  und  $\alpha' = 1 + ([I]/K_i')$  ist (Voet und Voet, 1994).  $[I]$  ist die jeweilige Konzentration des Inhibitors.  $K_i$  und  $K_i'$  sind die Bindungskonstanten des Inhibitors an das Enzym bzw. den Enzym-Substrat-Komplex. Die graphische Darstellung dieser Gleichung ergibt Geraden mit der Steigung  $\alpha K_m/V_{max}$  sowie den Schnittpunkten  $\alpha'/V_{max}$  mit der  $1/v_0$ -Achse und  $-\alpha'/\alpha K_m$  mit der  $1/[S]$ -Achse. Für verschiedene Inhibitorkonzentrationen erhält

man eine Schar von Geraden, die sich links von der  $1/v_0$ -Achse schneiden. Ist  $K_i = K_i'$  ( $\alpha = \alpha'$ ), liegt der Schnittpunkt auf der  $1/[S]$ -Achse. Nach Anpassung der Daten unter Verwendung des  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Wertes der ohne Inhibitor ermittelt wurde, lässt sich  $\alpha$  und  $\alpha'$  für die jeweilige Inhibitorkonzentration bestimmen. Aus diesen Werten können dann die beiden Inhibitorkonstanten  $K_i$  und  $K_i'$  für die gemischte Hemmung berechnet werden. Für  $K_m = 7.1 \mu\text{M}$  und  $V_{max} = 2.7 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  erhält man für dieses System Inhibitorkonstanten von  $K_i = 2.6 \mu\text{M}$  und  $K_i' = 2.1 \mu\text{M}$ . Die Phosphorylierungsreaktion der rMLC durch skmMLCK wird in Gegenwart des bifunktionellen Inhibitors **25a** also um etwa das dreifache gehemmt. Dies entspricht etwa einer Inhibitor-Affinität, wie sie für den fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitor **27** in den Verdrängungsexperimenten mit radioaktiv markiertem  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  abgeschätzt werden konnte.

### 3.8 Untersuchung der Lokalisation von fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitoren für skmMLCK und smMLCK in H9C2-Zellen

In den Verdrängungsexperimenten mit  $\text{P}^3\text{-Thio-(S-(N-FITC-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19)))}$ - $\text{P}^1\text{-adenosin-triphosphat}$  **27** und  $\text{P}^3\text{-Thio-(S-(N-FITC-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24)))}$ - $\text{P}^1\text{-adenosin-triphosphat}$  **28** konnte gezeigt werden, dass die Inhibitoren für skmMLCK und smMLCK aufgrund der Peptid-Sequenzen eine hohe Spezifität für die jeweilige Ziel-Kinase erreichen. Nun soll untersucht werden, ob auch in Muskelzellen eine spezifische Lokalisation mit der entsprechenden Ziel-Kinase beobachtet werden kann. Die Lokalisation von skeletaler MLCK ist bisher weitgehend unbekannt und daher zur Beurteilung einer spezifischen Lokalisation weniger geeignet. Dagegen zeigt die MLCK aus glatter Muskulatur je nach Isoform entweder cytosolische Verteilung oder Koloalisation mit Aktin-Stressfasern (Kudryashov *et al.*, 1999; Poperechnaya *et al.*, 2000; Blue *et al.*, 2002). Eine Anfärbung des Aktin-Cytoskeletts ist dabei mit TRITC-Phalloidin möglich. Würde man nun in Zellen mit dem fluoreszenzmarkierten smMLCK-Inhibitor eine Lokalisation mit Aktin-Stressfasern beobachten können und mit dem entsprechenden skmMLCK-Inhibitor nicht, wäre dies ein Hinweis darauf, dass die Inhibitoren auch unter zellulären Bedingungen spezifisch an die jeweilige Ziel-Kinase binden können. Um die Lokalisation der Inhibitoren in den Zellen genau bestimmen zu können, sollen die mikroskopischen Aufnahmen nicht mit einem Lichtmikroskop, sondern mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop durchgeführt werden. In Testversuchen hat sich gezeigt, dass Fluorescein als Fluorophor für die Lasermikroskopie aufgrund des schnellen Ausbleichens des Farbstoffes eher ungeeignet ist. Für die Lokalisationsversuche soll

daher ein anderer Fluorophor verwendet werden. Aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaften und der hohen Photostabilität ist der Cyanin-Farbstoff Cy5 als Fluorophor für die Lasermikroskopie gut geeignet. Für die Versuche werden daher die jeweiligen Cy5-markierten Verbindungen synthetisiert.



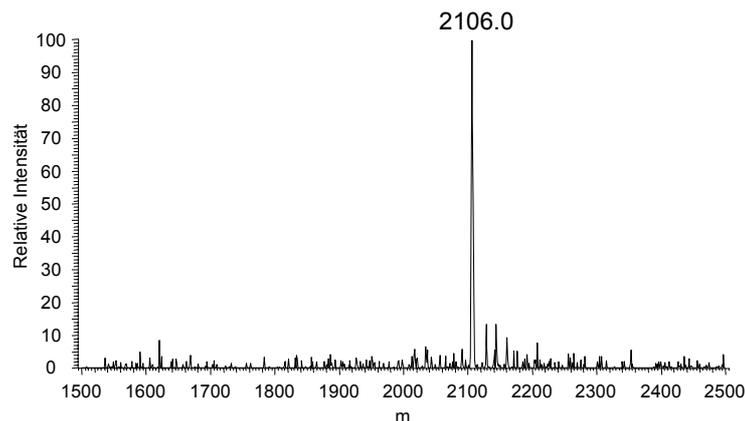
**Abb. 58:** Struktur des Cyanin-Farbstoffes Cy5 als N-Hydroxysuccinimidester (Cy5-NHS).

Um zu sehen, ob eine Kolo­kalisierung des smMLCK-Inhibitors mit Aktin-Stressfasern prinzipiell beobachtet werden kann, wird zuerst die Lokalisation eines Cy5-markierten sm-rMLC-Peptids verfolgt. Die Lokalisationsversuche werden in H9C2-Zellen, einer klonalen Zelllinie aus Rattenherzen, durchgeführt. Um eine Transfektion in die Zellen zu umgehen, werden diese mit Detergenz behandelt. Die Zugabe von Triton X-100 führt dabei zur vollständigen Permeabilisierung der Zellmembran, so dass die Lokalisation der fluoreszenzmarkierten Analoga am freigelegten Aktin-Cytoskelett der Zellen erfolgt.

### 3.8.1 Synthese von [A25]sm-rMLC(7-24) **31**

Sequenz: H<sub>2</sub>N-AKTTKRPQRATSNVFAMA-COOH

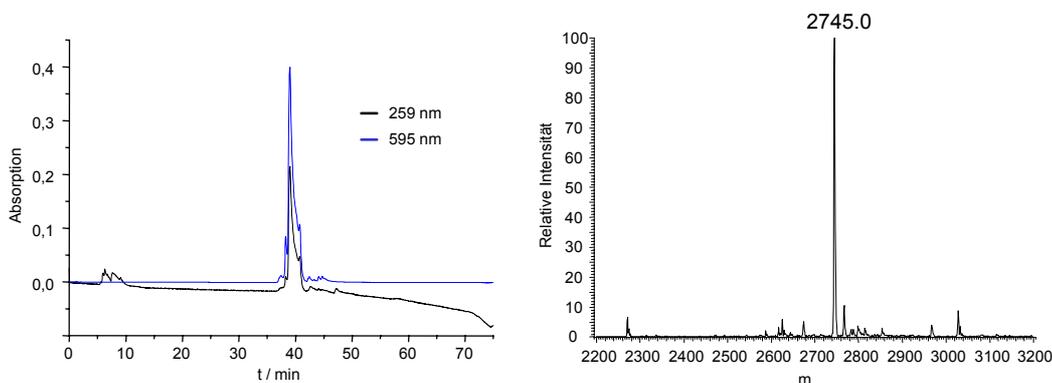
Die Synthese von **31** wird manuell im 0.2 mmol-Maßstab durchgeführt. Als feste Phase für die Synthese wird Fmoc-Ala-Wang-Harz verwendet. Nach Synthese des Peptids erfolgt die Entschützung der Aminosäure-Seitenketten und die Abspaltung von der festen Phase. Nach Aufarbeitung wird das erhaltene Rohpeptid mit HPLC gereinigt. Die Gesamtausbeute bezogen auf den Synthesemaßstab wird nicht bestimmt. Die Identifizierung von [A25]sm-rMLC(7-24) **31** erfolgt mittels MS und HPLC.



**Abb. 59:** Massenspektrum von [A25]sm-rMLC(7-24) **31** nach Reinigung.

### 3.8.2 Synthese von N-Cy5-[A25]sm-rMLC(7-24) **32**

Für die N-terminale Fluoreszenzmarkierung mit Cy5-NHS muss der pH-Wert nahe dem Neutralpunkt liegen, um eine Mehrfachmarkierung an den Lysin-Seitenketten weitgehend zu verhindern. Dazu wird [A25]sm-rMLC(7-24) **31** bei pH 7.5 mit Cy5-NHS umgesetzt. Der Reaktionsansatz wird anschließend mit HPLC gereinigt. Die Ausbeute wird nicht bestimmt. Die Identifizierung von N-Cy5-[A25]sm-rMLC(7-24) **32** erfolgt mittels MS und HPLC.



**Abb. 60:** HPLC-Chromatogramm und Massenspektrum von N-Cy5-[A25]sm-rMLC(7-24) **32** nach Reinigung.

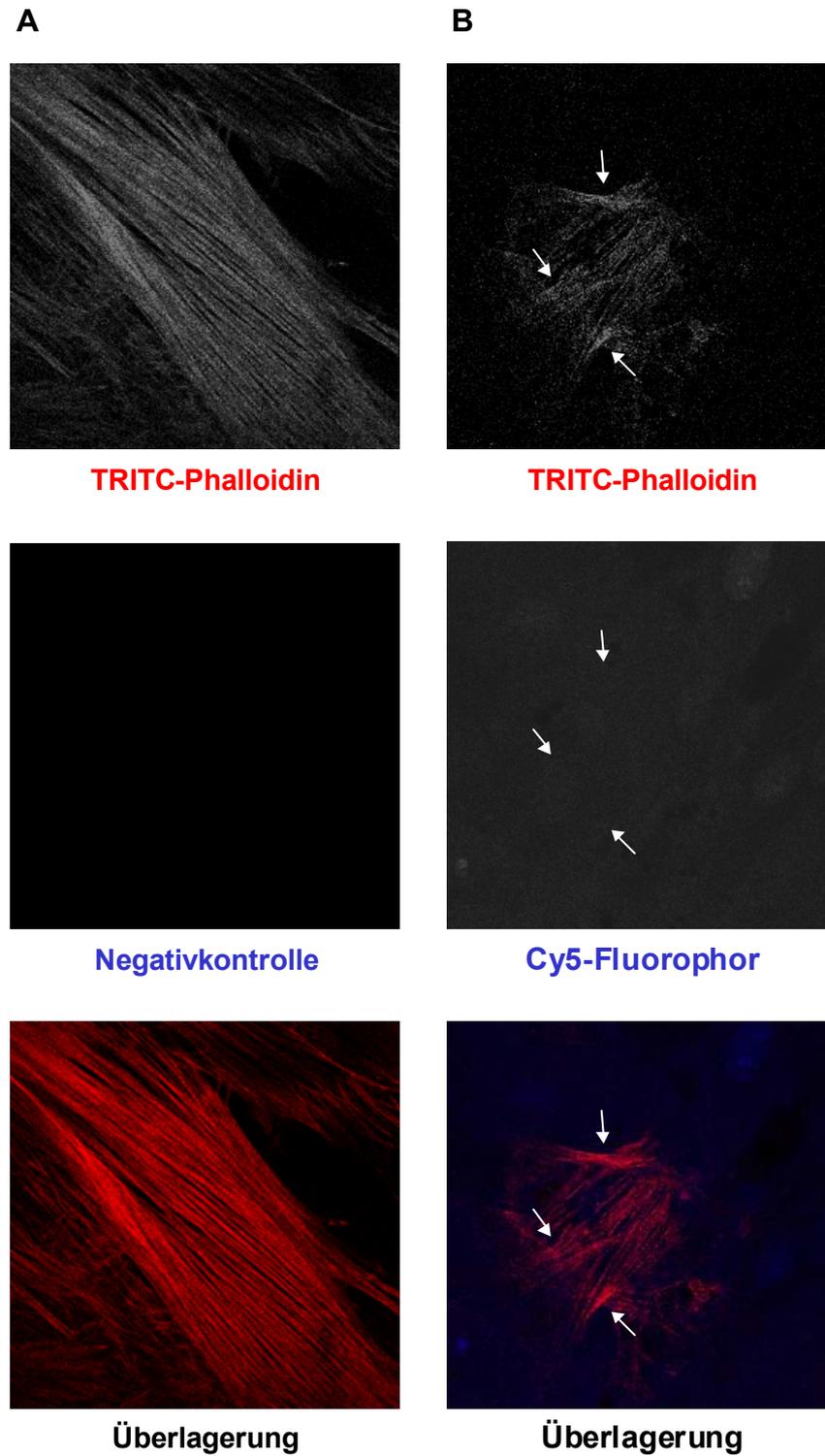
Der Peak im HPLC-Chromatogramm bei 39.0 min zeigt Absorption bei 259 nm und 595 nm und kann eindeutig N-Cy5-[A25]sm-rMLC(7-24) **32** zugeordnet werden. Das Absorptionsmaximum für Cy5 liegt eigentlich bei 646 nm, bedingt durch den HPLC-Detektor ist jedoch nur eine Detektion bis 595 nm möglich. Die im Massenspektrum beobachtete relative Masse von 2745.0 für **32** stimmt gut mit der berechneten Molmasse überein.

### 3.8.3 Lokalisation von N-Cy5-[A25]sm-rMLC(7-24) **32** in H9C2-Zellen

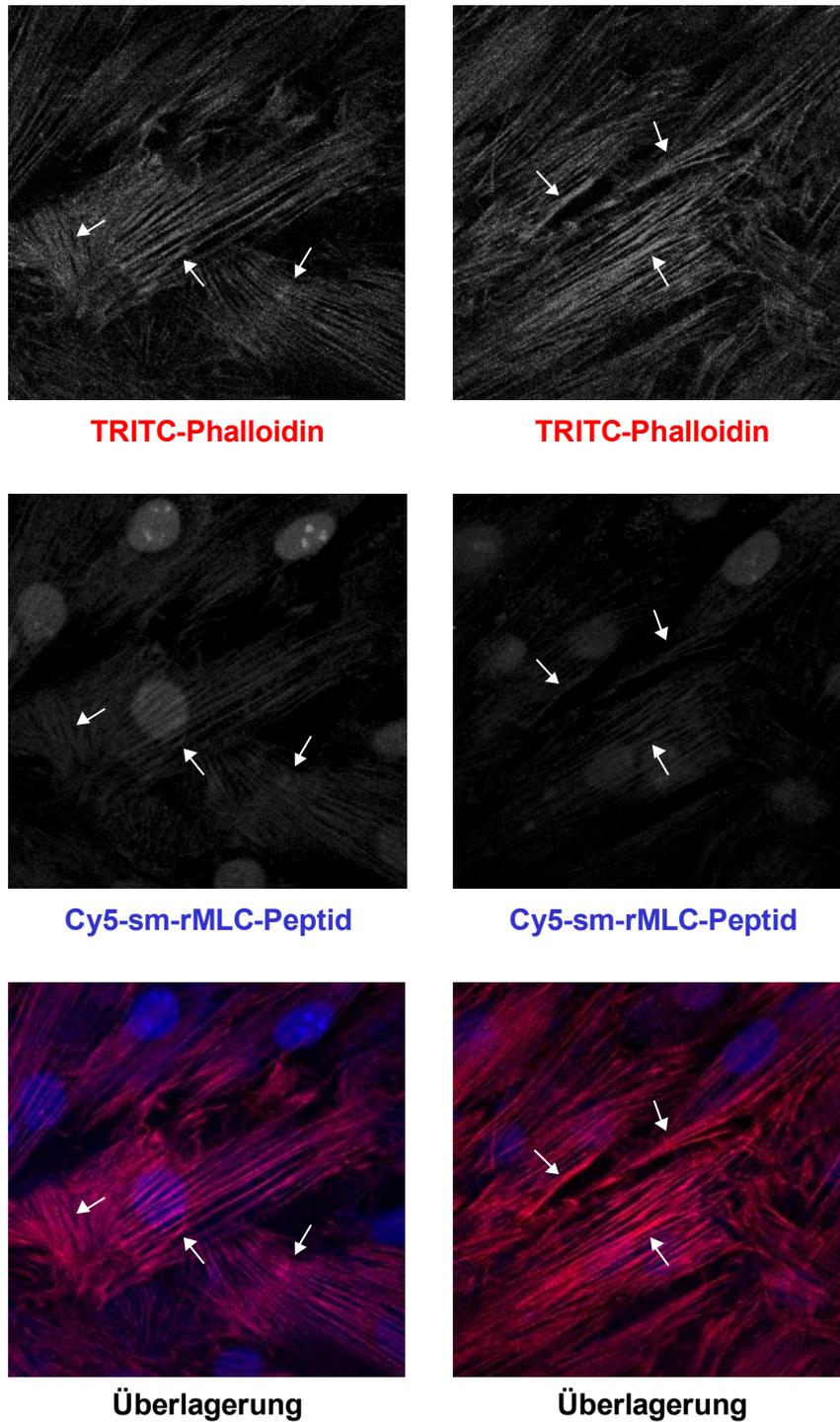
Für die Kolokalisationsexperimente werden die H9C2-Zellen in Puffer mit Triton X-100 und TRITC-Phalloidin in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  des Cy5-markierten Peptids **32** inkubiert. Danach werden die Zellen unter diesen Gleichgewichtsbedingungen ohne Fixierung direkt mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop betrachtet. Als Negativkontrolle werden Zellen verwendet, die in Abwesenheit Cy5-markierter Substanzen inkubiert werden. Um auszuschließen, dass eine Lokalisierung der fluoreszenzmarkierten Substanzen mit dem Aktin-Cytoskelett nur auf Wechselwirkungen mit dem Cy5-Farbstoff beruht, werden Zellen zusätzlich mit 5  $\mu\text{M}$  geblocktem Cy5-Fluorophor inkubiert. Der Cy5-NHS-Ester wird dazu vorher mit Ethanolamin inkubiert, um die reaktive NHS-Gruppe zu substituieren.

In Abbildung 61 sind konfokale Mikroskopaufnahmen von tritonierten H9C2-Zellen nach Inkubation (A) ohne Cy5-markierte Substanzen und (B) mit 5  $\mu\text{M}$  geblocktem Cy5 zu sehen. Der rote Kanal zeigt die Tetramethylrhodamin-Fluoreszenz von TRITC-Phalloidin, welches mit den Aktin-Stressfasern kolokalisiert. Der blaue Kanal zeigt die Fluoreszenz des Cy5-Fluorophors. Bei der Negativkontrolle (A) ist im blauen Kanal keine Fluoreszenz zu beobachten. Die Zellen zeigen in diesem Wellenlängenbereich also keine Autofluoreszenz und der rote und der blaue Kanal sind gut voneinander getrennt. Bei 5  $\mu\text{M}$  geblocktem Cy5 (B) ist im blauen Kanal nur eine schwache diffuse Anfärbung der Zellen und Zellkerne zu sehen. Dies zeigt, dass der Cy5-Farbstoff nicht direkt mit dem Aktin-Cytoskelett kolokalisiert und nur eine geringe unspezifische Wechselwirkung stattfindet. Eine eventuelle Kolokalisation des Cy5-markierten Peptids **32** mit dem Aktin-Cytoskelett kann daher nur auf einer spezifischen Wechselwirkung des sm-rMLC-Peptids mit smMLCK beruhen.

Abbildung 62 zeigt konfokale Mikroskopaufnahmen von tritonierten H9C2-Zellen nach Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  N-Cy5-[A25]sm-rMLC(7-24) **32**. Im roten Kanal erkennt man die Anfärbung der Aktin-Stressfasern durch TRITC-Phalloidin. Im blauen Kanal beobachtet man neben der Anfärbung der Zellkerne und teilweise der Nukleoli vorwiegend Fluoreszenz entlang der Aktin-Stressfasern. Die Überlagerung der beiden Kanäle zeigt in den violetten Bereichen eindeutig die Kolokalisation des Peptids mit dem Aktin-Cytoskelett und der damit assoziierten smMLCK. Das Peptid bindet also spezifisch an die Ziel-Kinase. Es sollte daher möglich sein, eine Diskriminierung der entsprechenden bifunktionellen skmMLCK- und smMLCK-Inhibitoren für die Ziel-Kinase smMLCK unter zellulären Bedingungen zu untersuchen. Dafür werden nun die entsprechenden Cy5-markierten Inhibitoren synthetisiert.



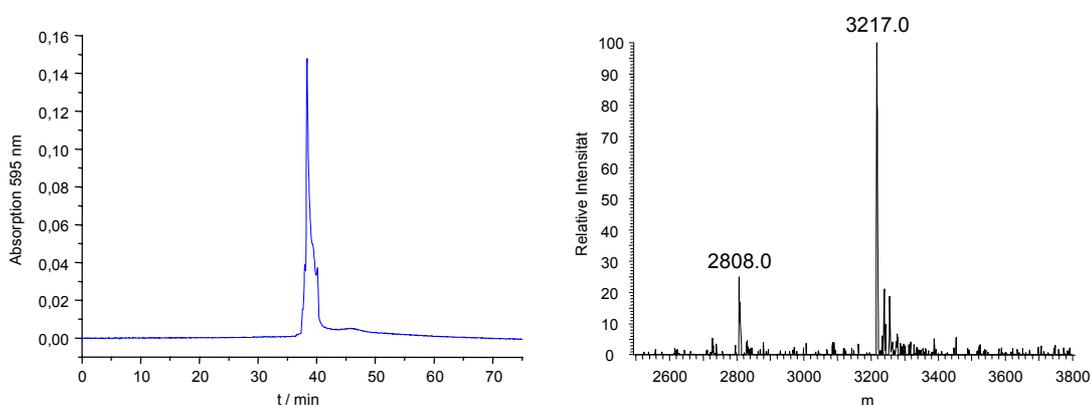
**Abb. 61:** Konfokale Aufnahmen tritonierter H9C2-Zellen (A) ohne Cy5-markierte Substanzen und (B) mit 5  $\mu$ M geblocktem Cy5-Farbstoff. Der rote Kanal zeigt die Fluoreszenz von Tetramethylrhodamin, der blaue Kanal die von Cy5.



**Abb. 62:** Konfokale Aufnahmen tritonierter H9C2-Zellen mit 5  $\mu\text{M}$  N-Cy5-[A25]sm-rMLC(7-24) **32**. Der rote Kanal zeigt die Fluoreszenz von Tetramethylrhodamin, der blaue Kanal die von Cy5.

### 3.8.4 Synthese von P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19)))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **33**

Für die N-terminale Fluoreszenzmarkierung mit Cy5-NHS muss der pH-Wert nahe dem Neutralpunkt liegen, um eine Mehrfachmarkierung an den Lysin-Seitenketten weitgehend zu verhindern. Dazu wird P<sup>3</sup>-Thio-(S-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **25** bei pH 7.5 mit Cy5-NHS umgesetzt. Der Reaktionsansatz wird anschließend mit HPLC gereinigt, wobei die gesammelten Produktfraktionen direkt in TEAHCO<sub>3</sub> umgepuffert und lyophilisiert werden. Aufgrund der notwendigen sauren HPLC-Pufferbedingungen ist eine teilweise Abspaltung von ADP zu beobachten. Zur Auftrennung des Gemisches aus dem fluoreszenzmarkierten einfach thiophosphorylierten Addukt und dem P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19)))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **33** wird versucht eine weitere Reinigung mit HPLC-Anionenaustauscher-Chromatographie durchzuführen. Der Cy5-Fluorophor führt jedoch dazu, dass die fluoreszenzmarkierte Verbindung auf der Säule hängen bleibt und keine effiziente Auftrennung möglich ist. Daher wird das Gemisch ohne weitere Reinigung für die Lokalisationsexperimente verwendet. Die Ausbeute wird nicht bestimmt. Die Identifizierung von P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19)))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **33** erfolgt mittels MS und HPLC.



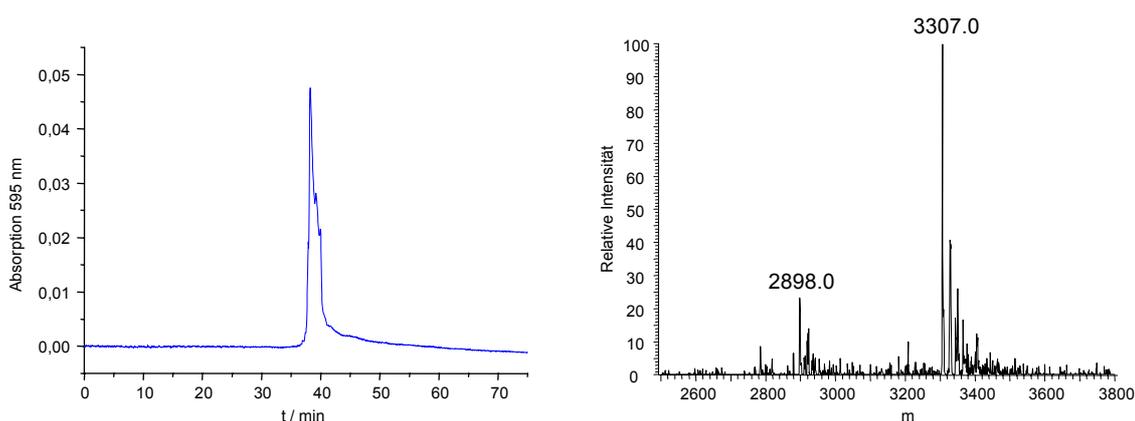
**Abb. 63:** HPLC-Chromatogramm und Massenspektrum von P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19)))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **33** nach Reinigung.

Der Peak im HPLC-Chromatogramm bei 38.3 min zeigt Absorption bei 595 nm und kann P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19)))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **33** zugeordnet werden. Die im Massenspektrum beobachtete relative Masse von 3217.0 für **33** stimmt gut mit der berechneten Molmasse überein. Die Verbreiterung des Massenpeaks zu höheren Massen ist auf Natrium-Addukte zurückzuführen. Der zweite Massenpeak bei 2808.0 ist dem einfach thiophosphorylierten Addukt zuzuordnen, welches unter den

sauren HPLC-Bedingungen durch Abspaltung von ADP entsteht und nicht abgetrennt werden kann.

### 3.8.5 Synthese von $P^3$ -Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24))) $-P^1$ -adenosin-triphosphat **34**

Die Fluoreszenzmarkierung von  $P^3$ -Thio-(S-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24))- $P^1$ -adenosin-triphosphat **26** und die weitere Aufarbeitung erfolgen wie für **33** beschrieben. Eine zweite Reinigung des Gemisches aus dem fluoreszenzmarkierten einfach thiophosphorylierten Addukt und  $P^3$ -Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24))) $-P^1$ -adenosin-triphosphat **34** wird aus den bereits genannten Gründen hier ebenfalls nicht durchgeführt. Die Ausbeute wird nicht bestimmt. Die Identifizierung von  $P^3$ -Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24))) $-P^1$ -adenosin-triphosphat **34** erfolgt mittels MS und HPLC.



**Abb. 64:** HPLC-Chromatogramm und Massenspektrum von  $P^3$ -Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24))) $-P^1$ -adenosin-triphosphat **34** nach Reinigung.

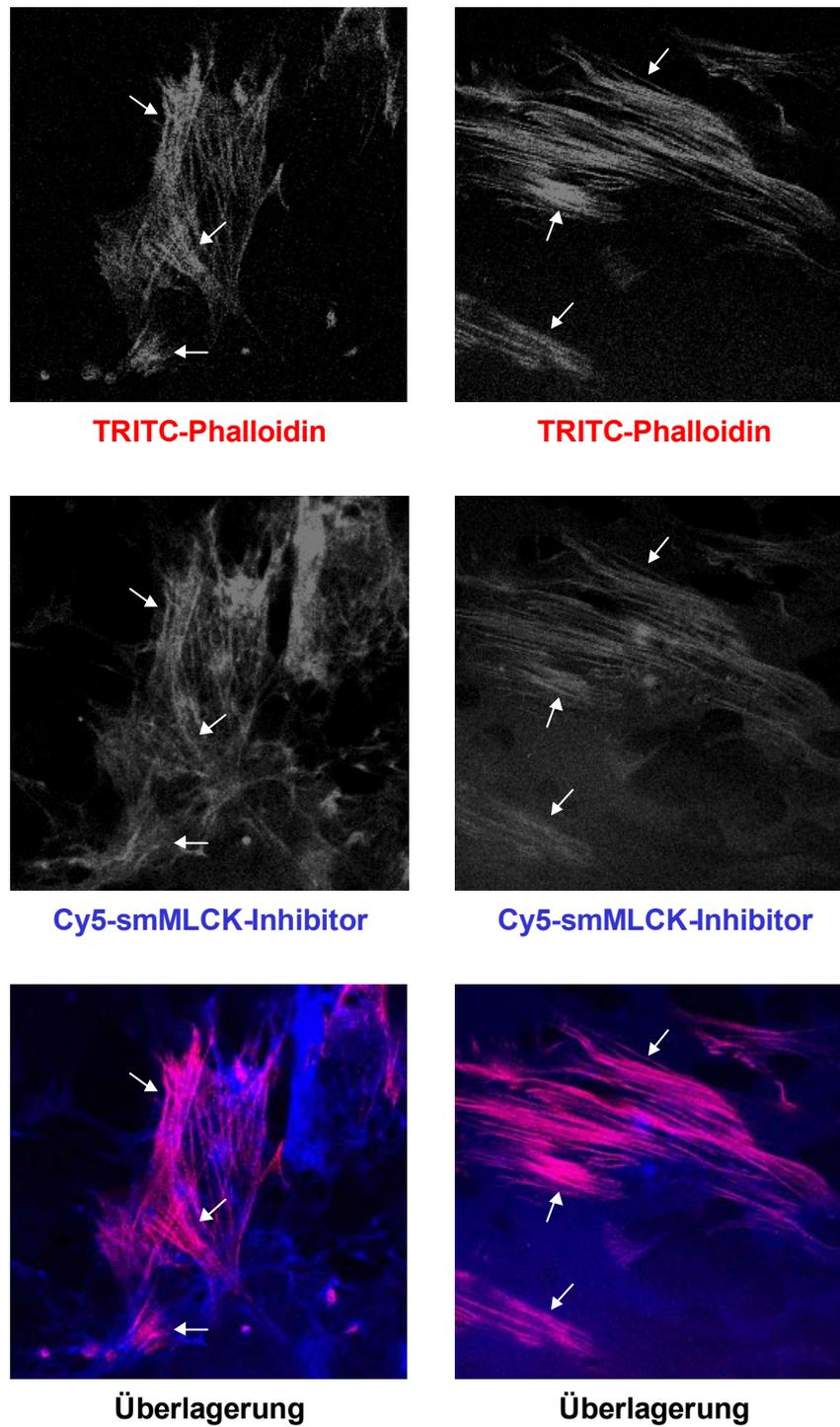
Der Peak im HPLC-Chromatogramm bei 38.3 min zeigt Absorption bei 595 nm und kann  $P^3$ -Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24))) $-P^1$ -adenosin-triphosphat **34** zugeordnet werden. Die im Massenspektrum beobachtete relative Masse von 3307.0 für **34** stimmt gut mit der berechneten Molmasse überein. Die Verbreiterung des Massenpeaks zu höheren Massen ist auf Natrium-Addukte zurückzuführen. Der zweite Massenpeak bei 2898.0 ist dem einfach thiophosphorylierten Addukt zuzuordnen, welches unter den sauren HPLC-Bedingungen durch Abspaltung von ADP entsteht und nicht abgetrennt werden kann.

### 3.8.6 Lokalisation von P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24)))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **34** und P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19)))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **33** in H9C2-Zellen

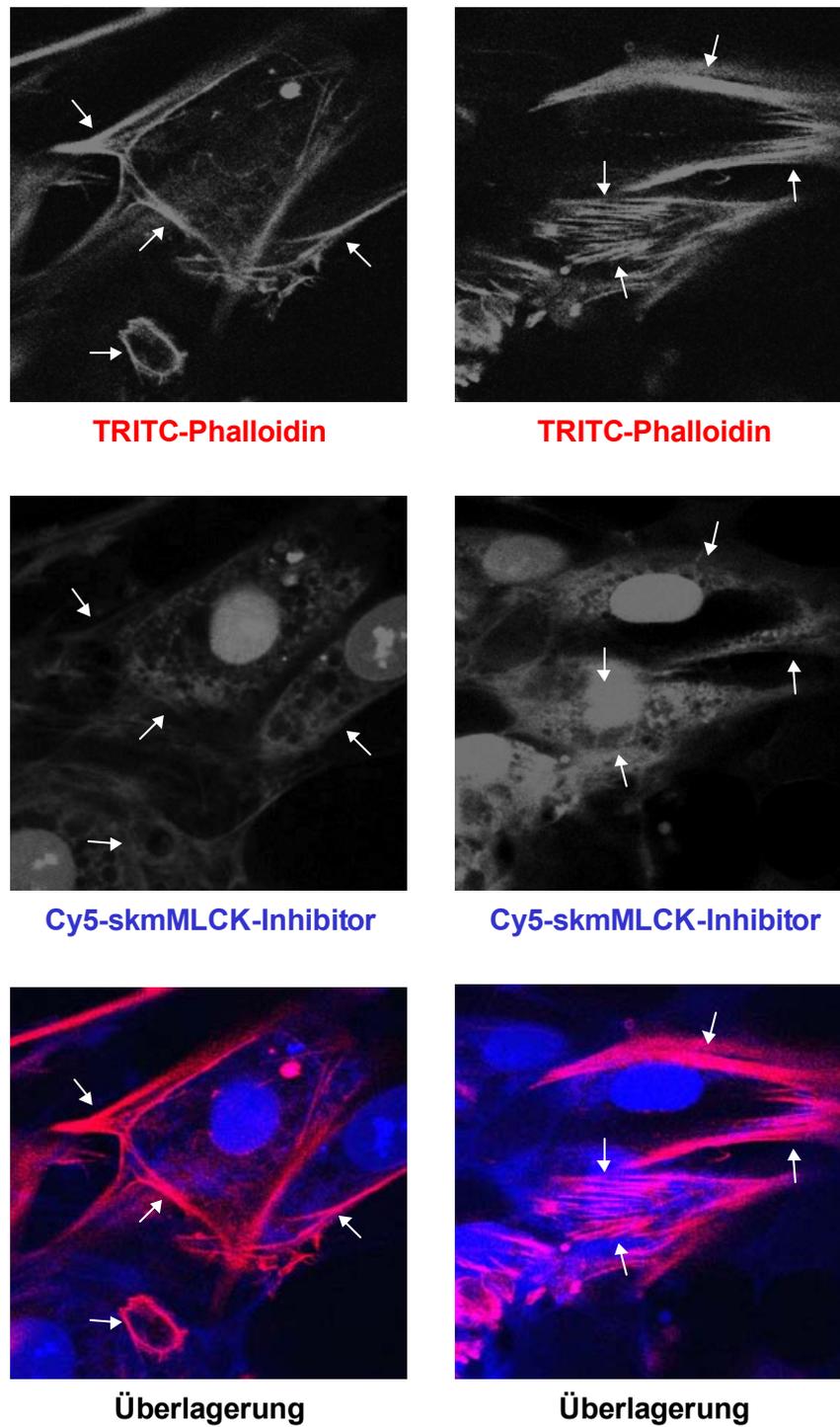
Für die Kolokalisationsexperimente mit den Cy5-markierten smMLCK- und skmMLCK-Inhibitoren werden die H9C2-Zellen in Puffer mit Triton X-100 und TRITC-Phalloidin in Gegenwart von 5 µM P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24)))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **34** bzw. P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19)))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **33** inkubiert. Danach werden die Zellen unter diesen Gleichgewichtsbedingungen ohne Fixierung direkt mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop betrachtet.

Abbildung 65 zeigt konfokale Mikroskopaufnahmen von tritonierten H9C2-Zellen nach Inkubation mit 5 µM P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24)))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **34**. Im roten Kanal ist die Anfärbung der Aktin-Stressfasern durch TRITC-Phalloidin zu sehen. Der blaue Kanal zeigt teilweise diffuse Fluoreszenz, aber vorwiegend eine Anfärbung des Aktin-Cytoskeletts. In der Überlagerung des roten und blauen Kanals sieht man deutlich, dass im Bereich der violetten Färbung Kolokalisation mit dem Cy5-markierten bifunktionellen smMLCK-Inhibitor **34** stattfindet. In Abbildung 66 sind die entsprechenden konfokalen Aufnahmen nach Inkubation mit 5 µM P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19)))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **33** zu sehen. Im Vergleich zu dem smMLCK-Inhibitor sieht man hier im blauen Kanal vorwiegend Anfärbung der Zellkerne sowie unregelmäßige Lokalisation im übrigen Bereich der Zellen. Die Überlagerung der beiden Kanäle zeigt deutlich, dass hier keine Kolokalisation mit dem Aktin-Cytoskelett stattfindet. Der fluoreszenzmarkierte bifunktionelle skmMLCK-Inhibitor **33** bindet also nicht an smMLCK.

Die Lokalisationsexperimente zeigen deutlich, dass die verwendeten bifunktionellen smMLCK- und skmMLCK-Inhibitoren aufgrund der unterschiedlichen Sequenzen der Peptid-Fragmente auch unter zellulären Bedingungen zwischen nahe verwandten Protein-Kinasen diskriminieren können.



**Abb. 65:** Konfokale Aufnahmen tritonierter H9C2-Zellen mit 5  $\mu\text{M}$   $\text{P}^3$ -Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24))) $\text{-P}^1$ -adenosin-triphosphat **34**. Der rote Kanal zeigt die Fluoreszenz von Tetramethylrhodamin, der blaue Kanal die von Cy5.

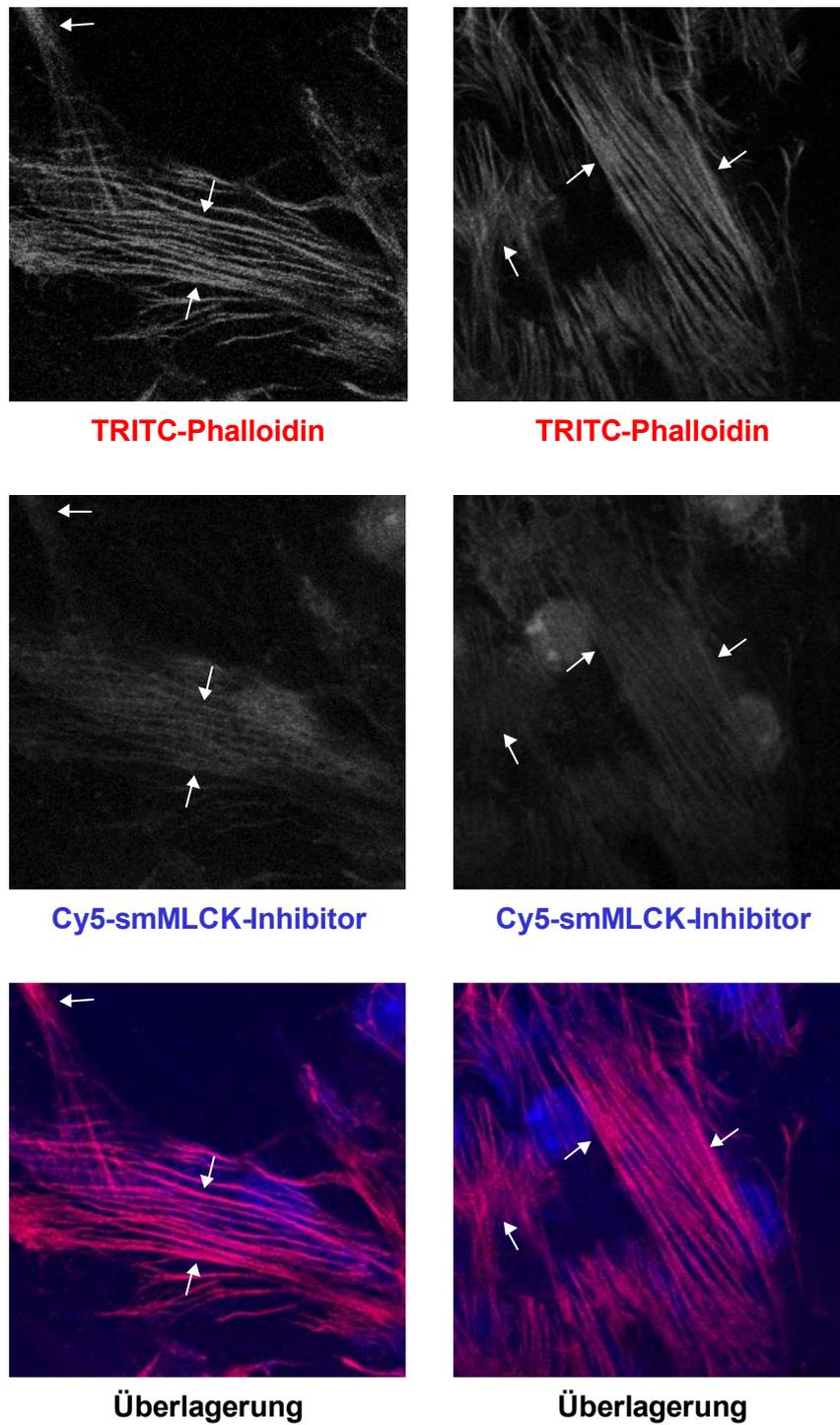


**Abb. 66:** Konfokale Aufnahmen tritonierter H9C2-Zellen mit  $5 \mu\text{M}$  P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19)))<sup>1</sup>-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **33**. Der rote Kanal zeigt die Fluoreszenz von Tetramethylrhodamin, der blaue Kanal die von Cy5.

### 3.8.7 Lokalisation von P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24)))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **34** in H9C2-Zellen in Gegenwart von Ca/CaM

Die Lokalisationsexperimente mit den fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitoren **34** und **33** haben gezeigt, dass diese auch unter zellulären Bedingungen eine hohe Spezifität für ihre Ziel-Kinase besitzen. Nun soll untersucht werden, ob unter den gleichen Bedingungen eine Veränderung des Lokalisationsmusters durch Aktivierung von smMLCK in Gegenwart von Ca/CaM beobachtet werden kann.

Für das Koloaliationsexperiment mit dem Cy5-markierten smMLCK-Inhibitor werden die H9C2-Zellen in Puffer (hier ohne EGTA) mit Triton X-100, TRITC-Phalloidin und Ca/CaM in Gegenwart von 5 µM P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24)))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **34** inkubiert. Danach werden die Zellen unter diesen Gleichgewichtsbedingungen ohne Fixierung direkt mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop betrachtet. Abbildung 67 zeigt konfokale Mikroskopaufnahmen von tritonierten H9C2-Zellen nach Inkubation mit 5 µM P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24)))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **34** in Gegenwart von Ca/CaM. Im roten Kanal ist die Anfärbung der Stressfasern durch TRITC-Phalloidin zu sehen. Der blaue Kanal zeigt vorwiegend eine Anfärbung des Aktin-Cytoskeletts. Diese scheint etwas schwächer zu sein als in Abwesenheit von Ca/CaM. In der Überlagerung des roten und blauen Kanals sieht man im Bereich der violetten Färbung wiederum die Koloaliation des Cy5-markierten bifunktionellen smMLCK-Inhibitor **34** mit den Aktin-Stressfasern. Eine Anreicherung von smMLCK entlang der Stressfasern nach einer Aktivierung mit Ca/CaM kann nicht beobachtet werden.



**Abb. 67:** Konfokale Aufnahmen tritonierter H9C2-Zellen mit  $5 \mu\text{M}$   $\text{P}^3$ -Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24))) $\text{-P}^1$ -adenosin-triphosphat **34** in Gegenwart von Ca/CaM. Der rote Kanal zeigt die Fluoreszenz von Tetramethylrhodamin, der blaue Kanal die von Cy5.

### 3.9 Synthese eines fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitors für die Titin-Kinase

Für MLCK konnte gezeigt werden, dass entsprechende bifunktionelle Inhibitoren aufgrund hoher Affinität und Spezifität für eine Visualisierung in lebenden Zellen geeignet sind. Im Folgenden soll nun ein bifunktioneller Inhibitor für die Titin-Kinase (TK) synthetisiert werden. Dieser soll dann in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Mathias Wilmanns (EMBL (DESY), Hamburg) für Kristallisationsversuche mit der Titin-Kinase verwendet werden. Eine Kristallstruktur der Titin-Kinase im Komplex mit einem bifunktionellen Inhibitor könnte wichtige strukturelle Information über die aktivierte TK liefern. Daneben soll auch ein Cy5-markierter bifunktioneller Inhibitor synthetisiert werden, der für entsprechende Lokalisationsexperimente in Muskelzellen oder einzelnen Muskelfasern benutzt werden kann.

#### 3.9.1 Design eines fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitors für die Titin-Kinase

Die grundlegenden Überlegungen zu der Länge eines kovalenten Linkers zur Verknüpfung von Nukleotid- und Peptid-Komponente des bifunktionellen Inhibitors für die Titin-Kinase werden wie zuvor von dem Modellsystem PKA übernommen. Das Design des Linkers erfolgt wie bei MLCK in Anlehnung an eine Vorschrift von Parang (Parang *et al.*, 2001). Das Peptid-Fragment des Inhibitors soll die Erkennungssequenz von Telethonin enthalten, welches das bis heute einzige bekannte Substrat der Titin-Kinase ist. Die Synthesestrategie ist analog zu der für die beiden fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitoren für MLCK.

Telethonin: V<sub>143</sub> P V S K P G A L R R S L **S**<sub>156</sub> R S M S Q E A<sub>163</sub>

**Abb. 68:** C-terminale Peptidsequenz von Telethonin. Das hervorgehobene Serin wird von der Titin-Kinase phosphoryliert.

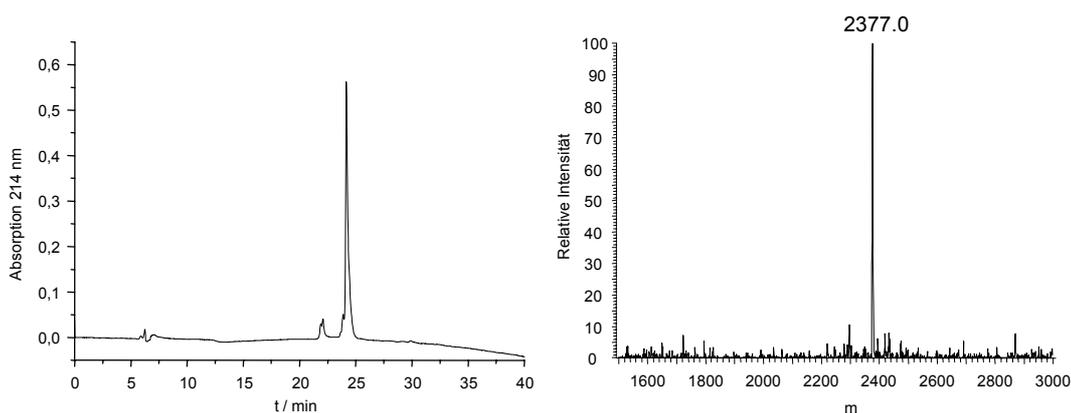
Die anderen Serin-Reste werden hier nicht substituiert, weil der Inhibitor unter anderem für die Kristallisation mit der Titin-Kinase verwendet werden soll und die Hydroxyl-Gruppen der Serine möglicherweise an Wechselwirkungen innerhalb der katalytischen Domäne von TK beteiligt sind. Als letzte AS wird bei der Peptidsynthese aus den bereits genannten Gründen ein Boc-geschütztes Valin verwendet.

### 3.9.2 Synthese von [Bromaceto-Dpr156]Telethonin(143-163) **35**

Sequenz: H<sub>2</sub>N-VPVSKPGALRRSLXRSMSQEA-COOH

X = Bromaceto-Dpr

Die Synthese von **35** wird manuell im 0.2 mmol-Maßstab durchgeführt. Als feste Phase für die Synthese wird Fmoc-Ala-Wang-Harz verwendet. Nach Synthese des Peptids erfolgt die Entschützung der iv(Dde)-Schutzgruppe durch mehrfaches Behandeln mit einer Lösung von 2 % Hydrazinhydrat in DMF. Danach wird die Carbodiimid-Kopplung an die freie primäre Aminogruppe der Dpr mit Bromessigsäure/DIC durchgeführt. Anschließend erfolgt die Entschützung der Aminosäure-Seitenketten und die Abspaltung von der festen Phase. Nach Aufarbeitung wird das erhaltene Rohpeptid mit HPLC gereinigt. Die Gesamtausbeute bezogen auf den Synthesemaßstab wird nicht bestimmt. Die Identifizierung von [Bromaceto-Dpr156]Telethonin(143-163) **35** erfolgt mittels MS und HPLC.

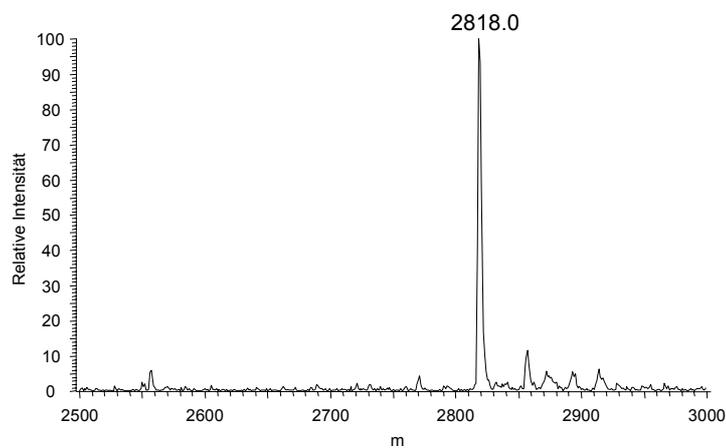


**Abb. 69:** HPLC-Chromatogramm und Massenspektrum von [Bromaceto-Dpr156]Telethonin(143-163) **35** nach Reinigung.

Der Peak im HPLC-Chromatogramm bei 24.2 min kann eindeutig [Bromaceto-Dpr156]Telethonin(143-163) **35** zugeordnet werden. Daneben ist bei 22.1 min eine geringfügige Verunreinigung zu erkennen, die auch nach wiederholter HPLC-Reinigung nicht abgetrennt werden kann. Eine Identifizierung der Verunreinigung mittels MS ist nicht möglich. Die im Massenspektrum beobachtete relative Masse von 2377.0 für **35** stimmt gut mit der berechneten Molmasse überein.

### 3.9.3 Synthese von P<sup>3</sup>-Thio-(S-[aceto-Dpr156]Telethonin(143-163))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **36**

Für die Substitutionsreaktion wird [Bromaceto-Dpr156]Telethonin(143-163) **35** mit ATP<sub>γ</sub>S umgesetzt. Der entstandene Niederschlag wird abzentrifugiert und mehrfach mit MeOH/Wasser 4:1 gewaschen, um nicht abreagiertes Peptid zu entfernen. Eine weitere Reinigung von **36** wird nicht durchgeführt. Die Ausbeute wird nicht bestimmt. Die Identifizierung erfolgt mittels HPLC und MS. Die im Massenspektrum beobachtete relative Masse von 2818.0 für **36** stimmt gut mit der berechneten Molmasse überein.



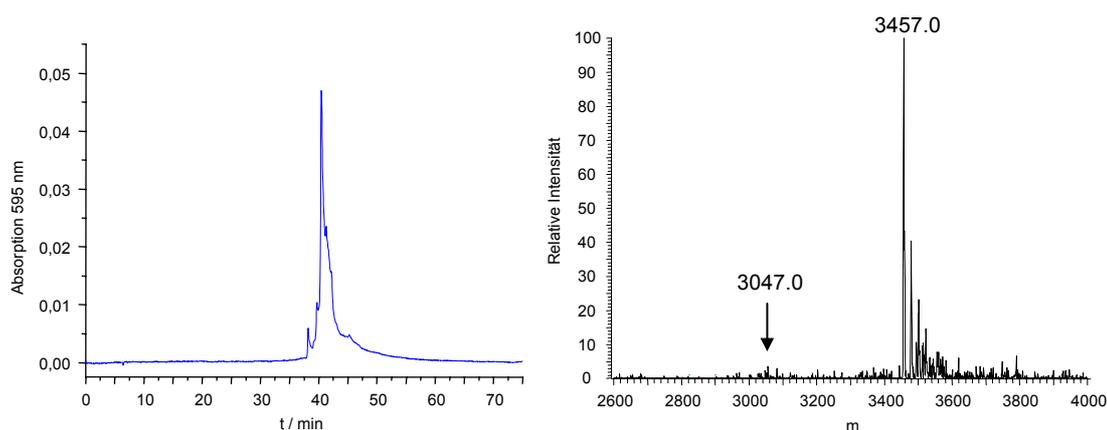
**Abb. 70:** Massenspektrum von P<sup>3</sup>-Thio-(S-[aceto-Dpr156]Telethonin(143-163))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **36** nach Reinigung.

In der Arbeitsgruppe von Mathias Wilmanns (EMBL (DESY), Hamburg) werden Versuche zur Kristallisation der Titin-Kinase im Komplex mit dem synthetisierten bifunktionellen Inhibitor P<sup>3</sup>-Thio-(S-[aceto-Dpr156]Telethonin(143-163))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **36** durchgeführt. Die Kristallstruktur der durch einen solchen Inhibitor im aktivierten Zustand fixierten Titin-Kinase könnte weitere strukturelle Informationen zum Verständnis des vollständigen Aktivierungsmechanismus dieser Kinase liefern. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind jedoch noch keine Strukturdaten verfügbar.

### 3.9.4 Synthese von P<sup>3</sup>-Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr156]Telethonin(143-163)))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **37**

Die Fluoreszenzmarkierung wird bei nahezu neutralem pH-Wert durchgeführt. Dazu wird P<sup>3</sup>-Thio-(S-[aceto-Dpr156]Telethonin(143-163))-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **36** bei pH 7.5 mit Cy5-NHS umgesetzt. Der Reaktionsansatz wird anschließend mit HPLC gereinigt, wobei die gesammelten Produktfraktionen direkt in TEAHCO<sub>3</sub> umgepuffert und lyophilisiert

werden. Aufgrund der notwendigen sauren HPLC-Pufferbedingungen ist eine teilweise Abspaltung von ADP zu beobachten. Eine weitere Reinigung des Gemisches aus dem fluoreszenzmarkierten einfach thiophosphorylierten Addukt und dem  $P^3$ -Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr156]Telethonin(143-163))) $-P^1$ -adenosin-triphosphat **37** wird aus den bereits genannten Gründen hier ebenfalls nicht durchgeführt. Die Ausbeute wird nicht bestimmt. Die Identifizierung von  $P^3$ -Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr156]Telethonin(143-163))) $-P^1$ -adenosin-triphosphat **37** erfolgt mittels MS und HPLC. Der Peak im HPLC-Chromatogramm bei 40.5 min zeigt Absorption bei 595 nm und kann eindeutig  $P^3$ -Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr156]Telethonin(143-163))) $-P^1$ -adenosin-triphosphat **37** zugeordnet werden. Die im Massenspektrum beobachtete relative Masse von 3457.0 für **37** stimmt gut mit der berechneten Molmasse überein. Die Verbreiterung des Massenpeaks zu höheren Massen ist auf Natrium-Addukte zurückzuführen. Im Massenspektrum sind in diesem Fall nur Spuren des einfach thiophosphorylierten Addukts zu erkennen, welches unter den sauren HPLC-Bedingungen durch Abspaltung von ADP entsteht und nicht abgetrennt werden kann.



**Abb. 71:** HPLC-Chromatogramm und Massenspektrum von  $P^3$ -Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr156]Telethonin(143-163))) $-P^1$ -adenosin-triphosphat **37** nach Reinigung.

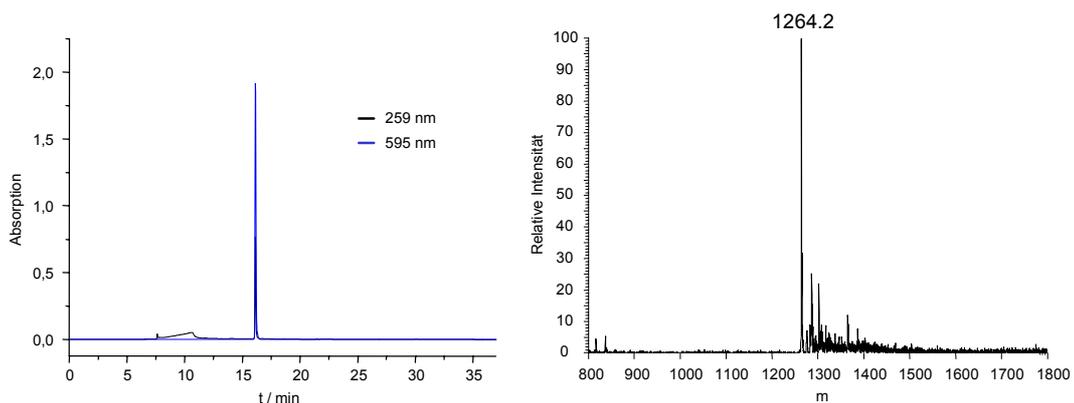
Die Untersuchung der Affinität und Spezifität des synthetisierten fluoreszenzmarkierten bifunktionellen TK-Inhibitors **37** muss nun durch geeignete Inhibitionsexperimente und Lokalisationsexperimente in Muskelzellen oder einzelnen Muskelfasern erfolgen. Damit könnte gezeigt werden, ob ein solcher Inhibitor für die Visualisierung der TK-Signaltransduktionswege in lebenden Muskelzellen geeignet ist. Die Durchführung der genannten Experimente war jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

### 3.10 Versuche zur Lokalisation der Cy5-markierten Inhibitoren für skmMLCK und smMLCK in lebenden Fibroblasten

In ersten Versuchen soll nun untersucht werden, wie sich die synthetisierten Cy5-markierten bifunktionellen skmMLCK- und smMLCK-Inhibitoren in lebenden Muskelzellen verhalten und ob ein spezifisches Lokalisationsmuster, vergleichbar mit den Triton-behandelten H9C2-Zellen, beobachtet werden kann. Die Transfektion der Cy5-markierten Verbindungen soll in diesem Fall durch Mikroinjektion erfolgen. Die Kapillar-Mikroinjektion, bei der Substanzen mit Hilfe einer mikrofeinen Glaskapillare direkt durch die Zellmembran in das Cytoplasma oder den Zellkern der Zellen injiziert werden, ist eine der effizientesten Methoden, um gezielt Substanzen in lebende Zellen einzuschleusen. Sie bietet damit die Möglichkeit, *in vivo* Untersuchungen mit bioaktiven Molekülen auf zellulärem Niveau durchzuführen. Bei den verwendeten Muskelzellen handelt es sich um motile Fibroblasten aus Mäuseembryonen. Diese zeigen unter normalen Bedingungen eine gerichtete Wanderungsbewegung auf Oberflächen. Eine mögliche inhibitorische Wirkung der injizierten Cy5-markierten Inhibitoren könnte sich zum Beispiel in Veränderungen der Zellmotilität zeigen, was leicht unter dem Mikroskop verfolgt werden kann. Um einen möglichen Einfluss der Peptid- und Nukleotid-Komponente der Inhibitoren auf die Lokalisation in den Zellen untersuchen zu können, soll neben den Inhibitoren auch das Cy5-markierte sm-rMLC-Peptid und ein Cy5-markiertes ATP-Analogon injiziert werden. Da die Fluoreszenz des Cy5-Farbstoffes nahezu nicht mehr im sichtbaren Bereich des Lichtes liegt (Anregung: 646 nm; Emission: 662 nm), werden zur Erkennung der injizierten Zellen TRITC-markierte Dextrane koinjiziert. Die Konzentration der injizierten Lösung verdünnt sich nach Injektion in die Zellen um etwa das Fünf- bis Zehnfache. Da eine Mikroinjektion solcher fluoreszenzmarkierter bifunktioneller Inhibitoren erstmalig durchgeführt wird und in der Literatur keine Angaben über notwendige Inhibitor-Konzentrationen zu finden sind, werden für die Injektionen Lösungen mit einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  verwendet. Dies ergibt nach Verdünnung in der Zelle eine zelluläre Konzentration der Inhibitoren von ca. 5 bis 10  $\mu\text{M}$ , was in etwa den Konzentrationen bei den Lokalisationsexperimenten in Triton-behandelten H9C2-Zellen entspricht und in der Nähe des  $K_m$ -Wertes für die rMLC bei der Phosphorylierung durch MLCK liegt.

### 3.10.1 Synthese von $P^3$ -(4-(N-Cy5-Aminoethyl)-phenylamino)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **38**

Die Synthese des Cy5-markierten ATP-Analogons erfolgt ausgehend von dem  $\gamma$ -Phosphat-modifizierten  $P^3$ -((4-(Aminoethyl)-phenylamino)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **18**. Dazu wird dieses bei pH 9.3 mit Cy5-NHS umgesetzt. Nach Reinigung mit HPLC erhält man **38** mit einer Ausbeute von 64 %. Die Identifizierung von **38** erfolgt mittels HPLC und MS.



**Abb. 72:** HPLC-Chromatogramm und Massenspektrum von  $P^3$ -(4-(N-Cy5-Aminoethyl)-phenylamino)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **38** nach Reinigung.

Der Peak im HPLC-Chromatogramm bei 16.2 min zeigt Absorption bei 259 nm und 595 nm und kann eindeutig dem Cy5-markierten  $P^3$ -(4-(N-Cy5-Aminoethyl)-phenylamino)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **38** zugeordnet werden. Von dem fluoreszenzmarkierten Addukt wird ein Massenspektrum aufgenommen. Die beobachtete relative Masse von 1264.2 stimmt gut mit der berechneten Molmasse überein. Die Verbreiterung des Massenpeaks zu höheren Massen ist auf Natrium-Addukte zurückzuführen.

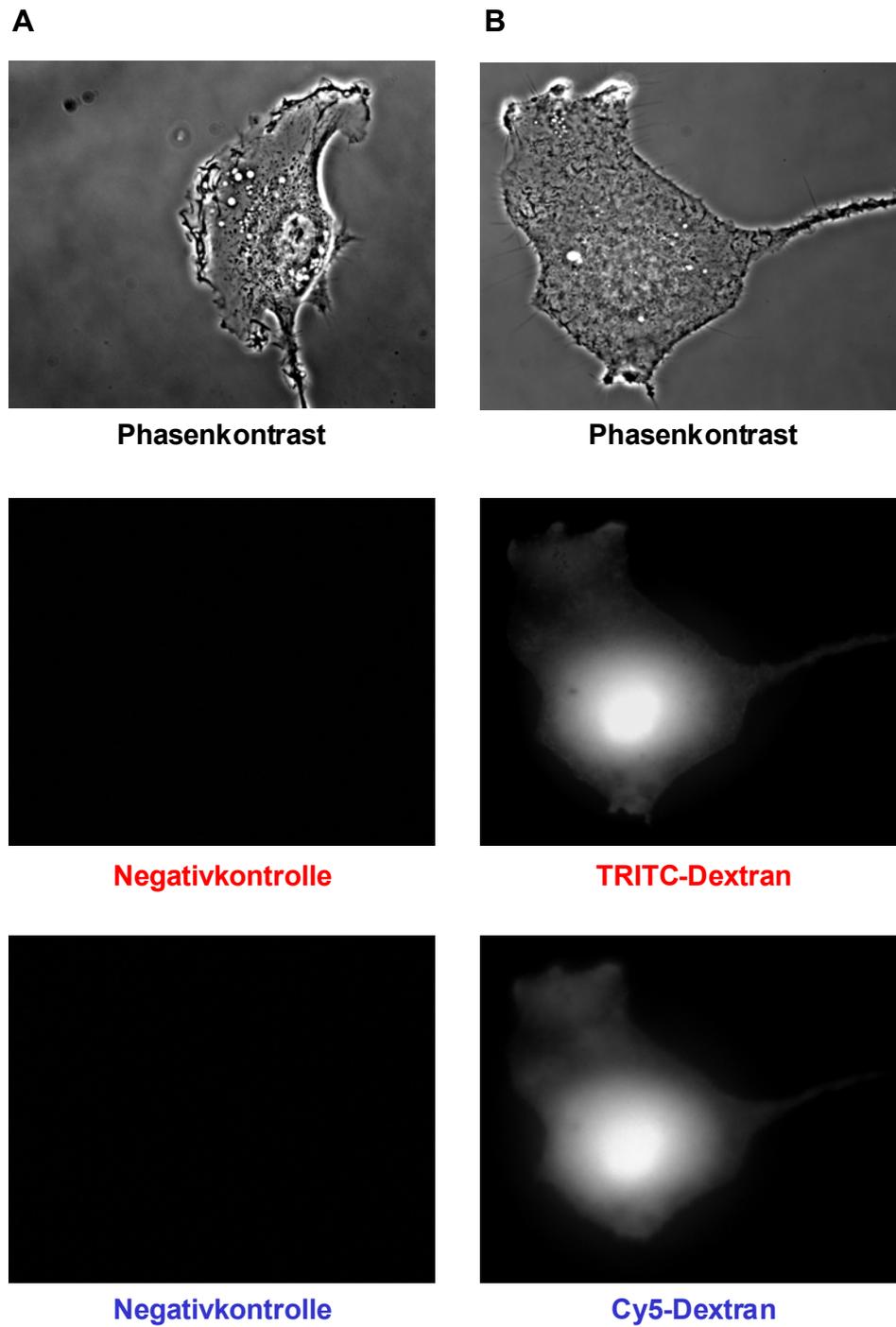
### 3.10.2 Mikroinjektion

Für die Mikroinjektionen wird der Injektionsdruck so gewählt, dass die zu injizierende Lösung fortwährend aus der Kapillare austritt. Die Spitze der Glaskapillare wird dann soweit auf die Oberfläche der Zelle abgesenkt, bis sie die Zellmembran durchstößt. Eine erfolgreiche Injektion ist durch ein kurzes „Aufblähen“ der Zellen erkennbar. Die Injektionen erfolgen alle in das Cytoplasma der Zellen. Von den Zellen werden jeweils Phasenkontrastaufnahmen sowie Aufnahmen der TRITC- und Cy5-Fluoreszenz gemacht. Einige der mikroinjizierten Zellen werden nach den Aufnahmen noch über einen Zeitraum von etwa 30 min beobachtet.

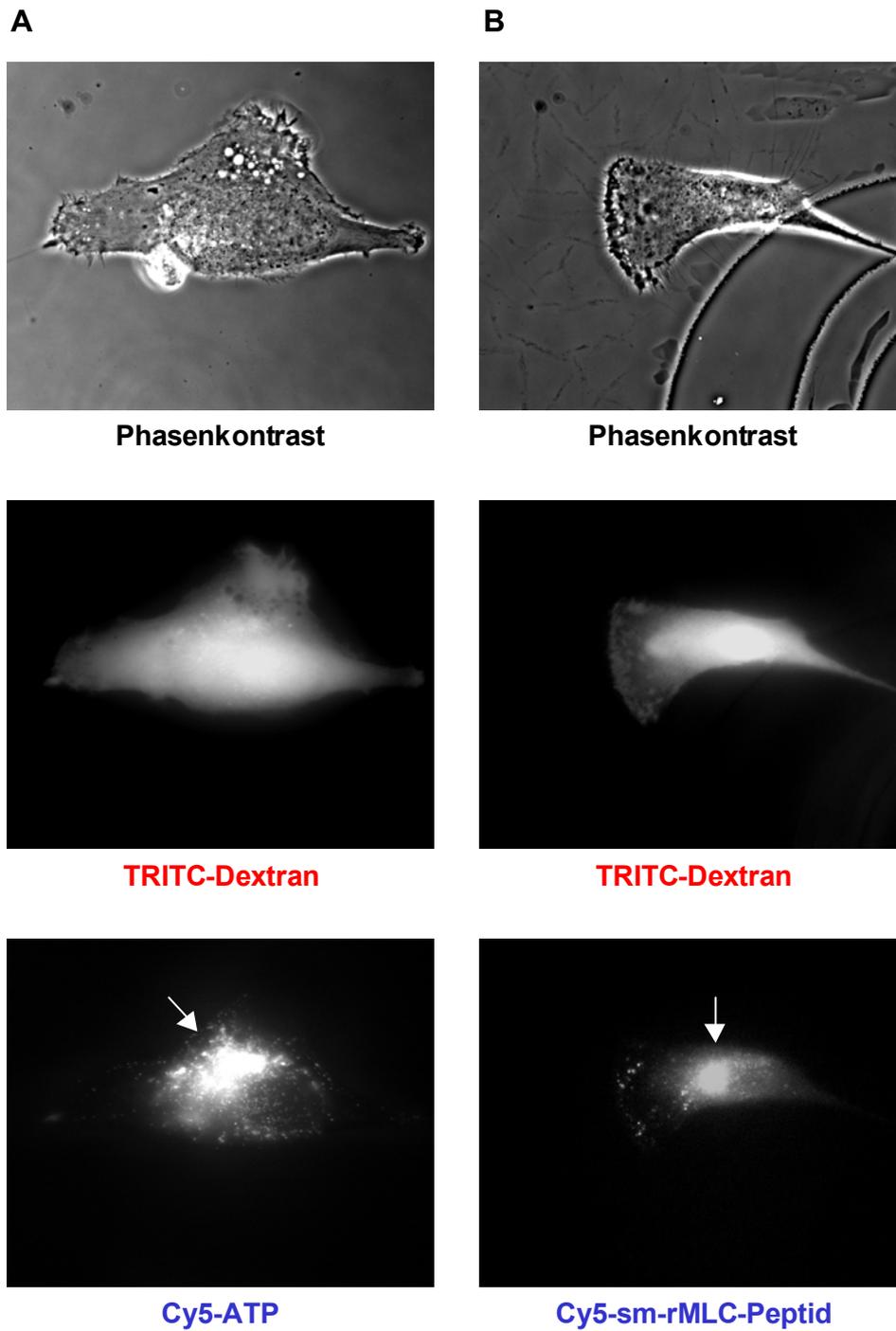
Zu Testzwecken wird zunächst ein Gemisch aus Cy5- und TRITC-markierten Dextranen injiziert. Die Konzentrationen der Dextrane wird nicht bestimmt. Anschließend erfolgt die Mikroinjektion des Cy5-markierten ATP-Analogons **38** und des Cy5-markierten sm-rMLC-Peptids **32**. Die Konzentration des ATP-Analogons beträgt hier 100  $\mu\text{M}$ , die des Peptids 50  $\mu\text{M}$ . Zum Schluss werden die beiden Cy5-markierten MLCK-Inhibitoren **34** und **33** mikroinjiziert. Die Konzentrationen der Inhibitoren betragen jeweils 50  $\mu\text{M}$ . Als Negativkontrolle dienen nicht-injizierte Fibroblasten.

In Abbildung 73 ist (A) ein nicht-injizierter Fibroblast und (B) ein Fibroblast nach Injektion des Gemisches aus Cy5- und TRITC-markierten Dextranen zu sehen. Die Negativkontrolle zeigt, dass für die nicht-injizierte Zelle sowohl im roten Kanal (Tetramethylrhodamin-Fluoreszenz), als auch im blauen Kanal (Cy5-Fluoreszenz) keine störende Autofluoreszenz auftritt. Daher sollten die mikroinjizierten Zellen eindeutig von nicht-injizierten Zellen unterschieden werden können. Nach Injektion des Dextran-Gemisches ist im roten Kanal die Fluorezenz des TRITC-markierten Dextrans zu sehen. Man beobachtet eine diffuse cytosolische Verteilung mit starker Anreicherung im Bereich des Zellkerns. Der blaue Kanal zeigt entsprechend die Cy5-Fluoreszenz und man erkennt ein vergleichbares Verteilungsmuster innerhalb der Zelle. Die Aufnahmen zeigen, dass durch Mikroinjektion in Fibroblasten und die anschließende Detektion der Cy5-markierten Substanz eine Untersuchung der Lokalisation in lebenden Zellen prinzipiell möglich ist.

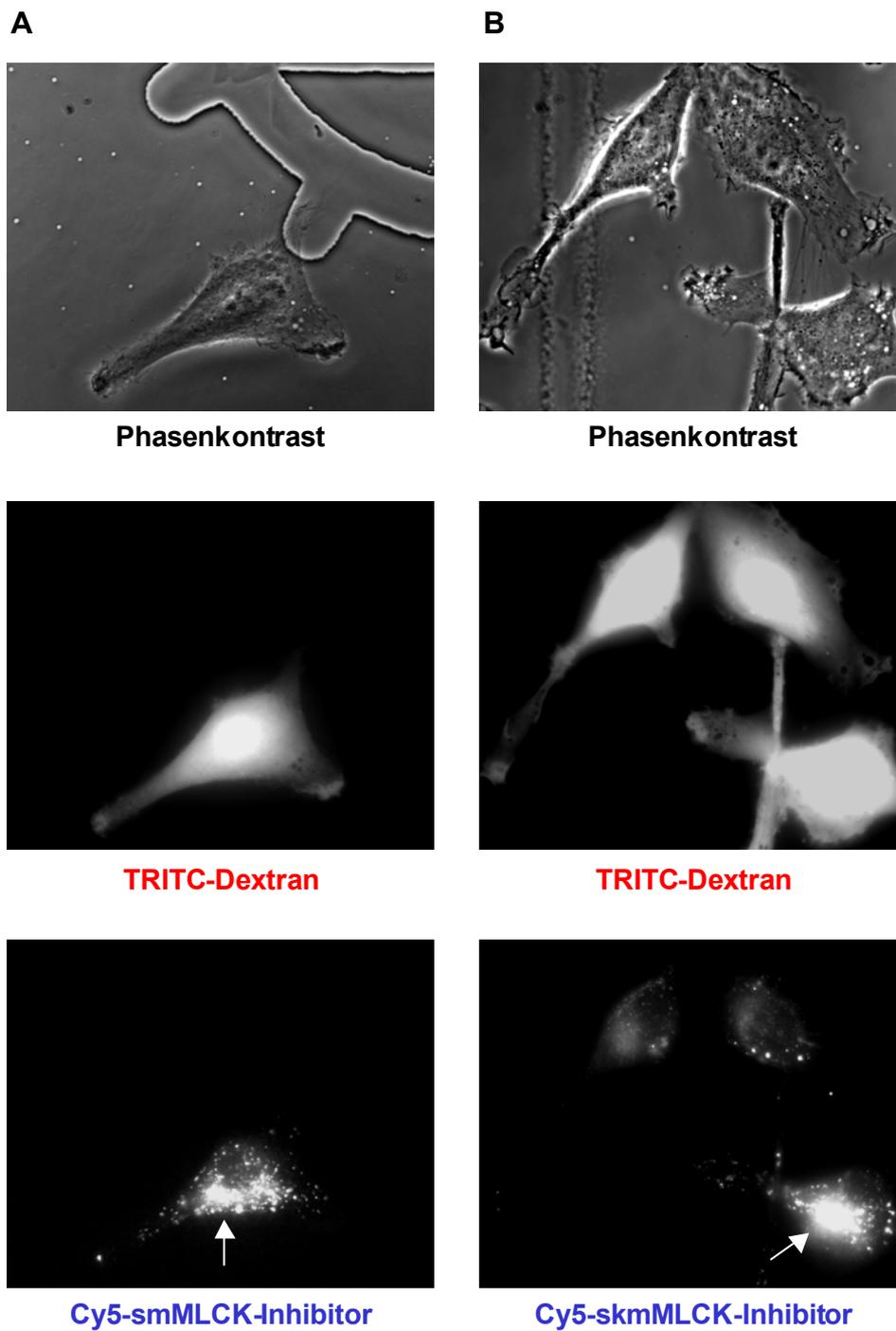
Nach Injektion des ATP-Analogons, des sm-rMLC-Peptids sowie der beiden MLCK-Inhibitoren beobachtet man jedoch, anders als erwartet, nahezu gleiche Verteilungsmuster innerhalb der Zellen (Abbildungen 74 und 75). Im roten Kanal ist wiederum jeweils die Fluoreszenz des TRITC-Dextrans zu sehen, das eine diffuse Verteilung mit Anreicherung im Bereich des Zellkerns zeigt. Im blauen Kanal erkennt man hier im Gegensatz zu dem Cy5-markierten Dextran nahezu keine diffuse cytosolische Fluoreszenz. Dafür beobachtet man für alle Substanzen vorwiegend eine intensive Lokalisation punktförmiger fluoreszierender Aggregate im einem Bereich um bzw. neben dem Zellkern, sowie teilweise auch im Cytoplasma. Die erwartete Lokalisation des sm-rMLC-Peptids und des smMLCK-Inhibitors entlang des Aktin-Cytoskeletts, die in tritonierten H9C2-Zellen beobachtet werden konnte, ist hier nicht zu erkennen. Eine unterschiedliche Lokalisation des skmMLCK- und smMLCK-Inhibitors kann ebenfalls nicht festgestellt werden.



**Abb. 73:** Phasenkontrastaufnahmen und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Fibroblasten (A) ohne fluoreszenzmarkierte Substanzen und (B) nach Mikroinjektion eines Gemisches von Cy5- und TRITC-Dextran. Der rote Kanal zeigt die Fluoreszenz von Tetramethylrhodamin, der blaue Kanal die von Cy5.



**Abb. 74:** Phasenkontrastaufnahmen und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Fibroblasten nach Mikroinjektion (A) von  $P^3$ -(4-(N-Cy5-Aminoethyl)-phenylamino)- $P^1$ -adenosin-triphosphat **38** und (B) von N-Cy5-[A25]sm-rMLC(7-24) **32**. Der rote Kanal zeigt die Fluoreszenz von Tetramethylrhodamin, der blaue Kanal die von Cy5.



**Abb. 75:** Phasenkontrastaufnahmen und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Fibroblasten nach Mikroinjektion (A) von  $P^3$ -Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19)))- $P^1$ -adenosin-triphosphat **33** und (B) von  $P^3$ -Thio-(S-(N-Cy5-[aceto-Dpr19, A25]sm-rMLC(7-24)))- $P^1$ -adenosin-triphosphat **34**. Der rote Kanal zeigt die Fluoreszenz von Tetramethylrhodamin, der blaue Kanal die von Cy5.

### 3.11 Verwendung bifunktionaler Kinase-Inhibitoren für die Affinitätschromatographie

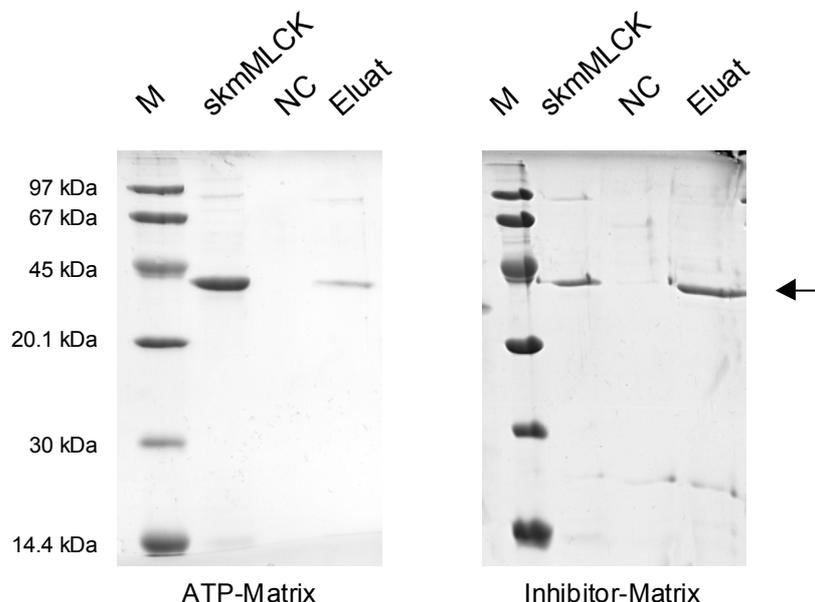
Die Familie der Protein-Kinasen bildet eine der größten bekannten Proteinfamilien und es wird vermutet, dass alleine das menschliche Genom für mehr als 2000 Protein-Kinasen kodiert (Hunter, 1987; Knighton, *et al.*, 1991; Hanks und Hunter, 1995). Die physiologische Rolle der meisten der bisher identifizierten Protein-Kinasen ist dabei nicht bekannt und nur einige hundert dieser Enzyme konnten auf Proteinebene charakterisiert werden. Für einen noch kleineren Teil sind bisher Untersuchungen zur Substratspezifität der jeweiligen Enzyme durchgeführt worden. Dass auf dem Gebiet der Isolierung und Charakterisierung von Enzymen nur langsame Fortschritte gemacht werden, liegt zum Teil an der Komplexität der Enzym-Isolationsprotokolle, die auf konventionellen chromatographischen Methoden beruhen. Die Entwicklung neuer Matrices für die Verwendung in der Affinitätschromatographie, die zu einer Vereinfachung der Reinigungsprozeduren von Enzymen führen, ist daher von besonderem Interesse. Werden für die Reinigung von Protein-Kinasen Peptide als Chromatographie-Liganden verwendet, zeigen die Matrices nur geringe Affinitäten zu den jeweiligen Enzymen. Dies liegt daran, dass Peptide im Allgemeinen nur eine relativ geringe Bindungsaffinität für Protein-Kinasen zeigen (Kemp und Pearson, 1991). Auch die Verwendung hochaffiner Inhibitor-Peptide benötigt zu lange Inkubationszeiten mit der Säulenmatrix und die erhaltenen Ausbeuten sind nur gering (Olsen und Uhler, 1989). Alternativ dazu können Liganden verwendet werden, die mit der ATP-Bindungsstelle von Protein-Kinasen wechselwirken. ATP- $\gamma$ -Sephrose zum Beispiel wurde für die Reinigung einiger Protein-Kinasen getestet (Haystead *et al.*, 1993; Davies *et al.*, 1994). Eine solche Affinitätsmatrix kann jedoch nicht spezifisch für eine bestimmte Protein-Kinase sein, da alle Kinasen ATP als gemeinsames Nukleotid-Substrat verwenden.

Bifunktionelle Kinase-Inhibitoren zeigen aufgrund ihrer Nukleotid-Komponente eine hohe Affinität und aufgrund der Peptid-Komponente eine hohe Spezifität für die jeweilige Ziel-Kinase. Solche Inhibitoren sollten daher in besonderem Maße für die Affinitätschromatographie geeignet sein. Mit Hilfe einer spezifischen Inhibitor-Matrix könnte zum Beispiel die gezielte Isolierung einer Protein-Kinase aus komplexen Proteingemischen gelingen. Um dies zu untersuchen, soll eine Affinitätsmatrix hergestellt werden, die als Ligand einen bifunktionalen Kinase-Inhibitor für skmMLCK besitzt. Damit sollte es möglich sein, native skmMLCK bzw. kardiale MLCK (cMLCK) aus Zellextrakten zu isolieren.

### 3.11.1 Herstellung der Affinitäsmatrices

Die analytische Affinitätschromatographie von skmMLCK und Zelllysaten erfolgt mit einer Gelmatrix aus NHS-aktivierter Sepharose (10  $\mu\text{mol}$  freie NHS-Gruppen/ml Gel), an die das jeweilige Substrat gekoppelt wird. Die Kopplung an die Gelmatrix erfolgt dabei mit zweifachem molaren Überschuss der Substanzen bezogen auf die Anzahl freier NHS-Gruppen der Matrix.

Für die Herstellung einer ATP-Matrix wird das  $\text{P}^3$ -((4-(Aminoethyl)-phenylamino)- $\text{P}^1$ -adenosin-triphosphat **18** verwendet. Dieses wird über die freie primäre Aminogruppe des Linkers an die Sepharose-Matrix gekoppelt. Die Herstellung einer Matrix mit einem bifunktionellen skmMLCK-Inhibitor erfolgt mit  $\text{P}^3$ -Thio-(S-[aceto-Dpr14, A20]skm-rMLC(1-19))- $\text{P}^1$ -adenosin-triphosphat **25**. Da die Kopplung an die Matrix über die freie N-terminale Aminogruppe des Peptid-Fragments erfolgen soll, muss der pH-Wert während der Kopplung nahe dem Neutralpunkt liegen. Dadurch sollen Nebenreaktionen an den Lysin-Seitenketten weitgehend verhindert werden. Als Negativkontrolle dient eine Matrix, die bei der Kopplung nur mit Puffer inkubiert wird. Ein Test der so hergestellten Affinitäsmatrices erfolgt mit rekombinanter skmMLCK. Die Matrices werden dafür mit der Kinase beladen und nach Waschen mit SDS-Probenpuffer eluiert. Das Eluat wird durch Gelelektrophorese aufgetrennt.



**Abb. 76:** SDS-Gele der mit skmMLCK beladenen ATP- und Inhibitor-Matrix nach Elution mit SDS-Probenpuffer (M: Molekulargewichtsmarker; NC: Negativkontrolle).

Die Negativkontrolle zeigt im Eluat keine Bande. Es findet somit nahezu keine unspezifische Bindung von skmMLCK an die Matrix statt. Nach Elution der ATP- und der Inhibitor-Matrix sind auf dem SDS-Gel Banden zu sehen, die skmMLCK zugeordnet werden können. Sowohl ATP als auch der bifunktionelle Inhibitor binden wie erwartet die Protein-Kinase an die Matrix. Beide Liganden sind damit prinzipiell für die Affinitätschromatographie geeignet. (Die Intensitäten der Banden für skmMLCK aus den Vergleichsproben und den Eluaten sind hier für die beiden Matrices unterschiedlich, da die Gele aus verschiedenen Versuchsansätzen stammen und nicht die gleichen Mengen an Proteinen aufgetragen wurden.) Nun soll untersucht werden, ob es möglich ist, mit dieser skmMLCK-spezifischen Inhibitor-Matrix kardiale MLCK aus einem Zelllysate zu isolieren und durch Western-Blot zu identifizieren.

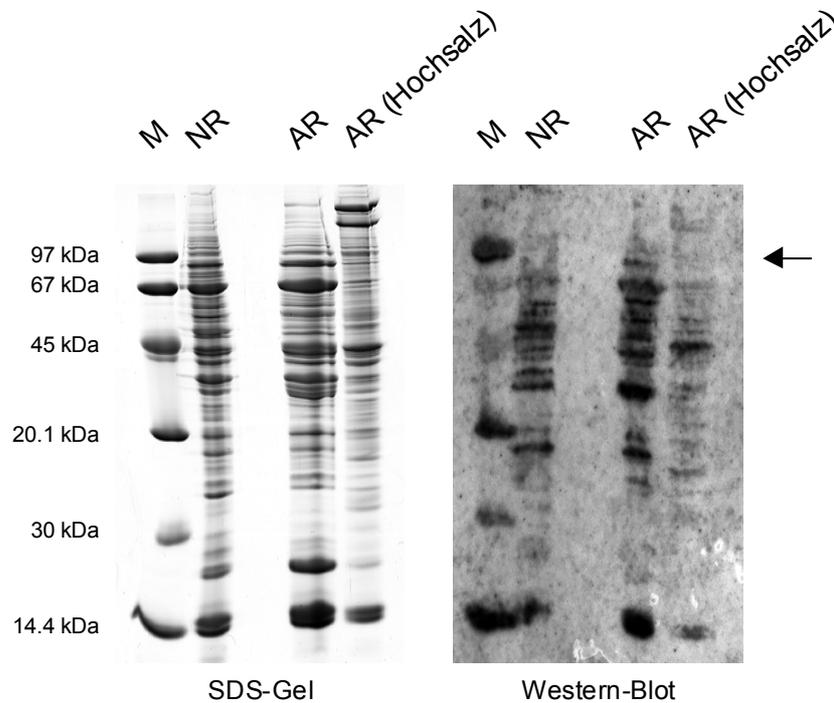
### **3.11.2 Versuche zur Identifizierung nativer kardialer MLCK aus Zelllysaten durch Western-Blot-Analyse**

Für die Identifizierung nativer cMLCK (ca. 90 kDa) werden zunächst verschiedene Zelllysate aus neonatalen und adulten Rattenherzen, sowie adulten Kaninchenherzen hergestellt. Nach Lyse der entsprechenden Gewebeproben werden die Zellrückstände zusätzlich noch mit Hochsalz und Hochsalz/Detergenz extrahiert.

Die Identifizierung von cMLCK aus Zelllysaten soll mittels Western-Blot-Analyse erfolgen. Als Primärantikörper wird ein Antikörper gegen den N-terminalen Teil von cMLCK des menschlichen Herzmuskels,  $\alpha$ -cMLCK-N (aus Kaninchen), verwendet. Der Sekundärantikörper ist entsprechend ein Antikörper gegen Kaninchen (HRP-Konjugat). Die Detektion erfolgt mit dem ECL-Kit der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) durch Auflegen von Röntgenfilmen.

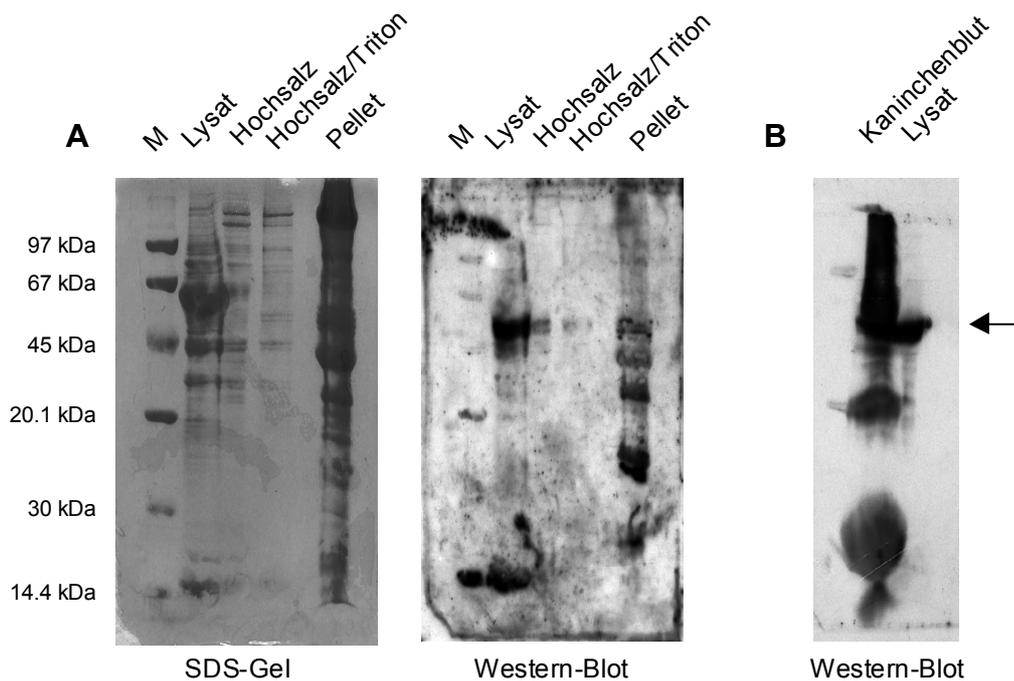
Zuerst wird untersucht, ob cMLCK in Lysaten aus Rattenherzen nachgewiesen werden kann. Dafür wird ein Lysat aus neonatalen Rattenherzen sowie ein Lysat und eine Hochsalzextraktion aus adulten Rattenherzen durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Blotten wird die Membran mit dem Primär- und Sekundärantikörper behandelt. Die Expositionszeit für den Film beträgt 5 min. Im Western-Blot sind für alle aufgetragenen Lysat-Proben eine Vielzahl von Banden zu erkennen (Abbildung 77). Im Bereich um 90 kDa ist für das Lysat aus adulten Rattenherzen eine Bande sichtbar, bei der es sich um cMLCK handeln könnte. Das entsprechende Lysat aus neonatalen Ratten zeigt keine Bande. Möglicherweise wird in neonatalen Rattenherzen die kardiale MLCK erst zu einem späteren Zeitpunkt exprimiert oder ist in der vorliegenden Gewebeprobe in zu geringen

Mengen vorhanden. Da die Erkennung des verwendeten Antikörpers für die Lysate aus Rattenherzen jedoch sehr unspezifisch ist, kann hiermit keine eindeutige Identifizierung von kardialer MLCK erfolgen.



**Abb. 77:** SDS-Gel von Lysaten aus neonatalen und adulten Rattenherzen sowie der entsprechende Western-Blot (M: Molekulargewichtsmarker; NR: neonatale Rattenherzen; AR: adulte Rattenherzen).

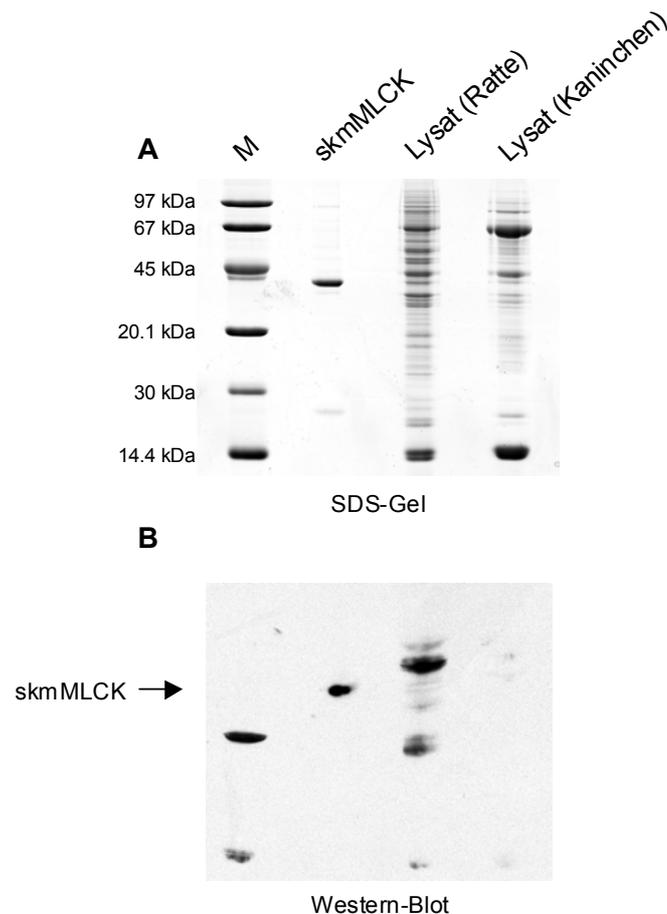
Alternativ werden daher Lysate aus adulten Kaninchenherzen untersucht. In diesem Fall wird neben einem Lysat und der Hochsalzextraktion zur Kontrolle zusätzlich noch eine Hochsalz/Detergenz-Extraktion und das Zellpellet durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Blotting wird die Membran mit dem Primär- und Sekundärantikörper behandelt. Die Expositionszeit für den Film beträgt 5 min. Abbildung 78 zeigt das SDS-Gel (nach Elektrotransfer der Banden) sowie den entsprechenden Western-Blot (A). Im Western-Blot sind wiederum eine Reihe von Banden zu erkennen. Die intensive Bande in dem Lysat bei etwa 50 kDa stammt vermutlich von Immunglobulin G (IgG) aus Resten von Kaninchenblut und entsteht durch Kreuzreaktion mit dem ebenfalls aus Kaninchen stammenden  $\alpha$ -cMLCK-N-Antikörper. Dass hier intensive Kreuzreaktionen auftreten, kann durch eine Kontrolle mit Kaninchenblut (B) gezeigt werden. Außerdem ist in den Lysaten im Bereich von etwa 90 kDa keine Bande für cMLCK zu erkennen. Das Zelllysate aus adulten Kaninchenherzen ist also für eine Identifizierung von kardialer MLCK mit dem verwendeten  $\alpha$ -cMLCK-N-Antikörper ebenfalls nicht geeignet.



**Abb. 78:** (A) SDS-Gel (nach Elektrotransfer) von Lysaten aus adulten Kaninchenherzen sowie der entsprechende Western-Blot. (B) Western-Blot einer Vergleichsprobe aus Kaninchenblut und des Lysats (M: Molekulargewichtsmarker).

### 3.11.3 Isolierung rekombinanter skmMLCK aus einem Zelllysate-Gemisch

Da kein anderer MLCK-Antikörper zur Verfügung steht, soll alternativ untersucht werden, ob rekombinante skmMLCK aus einem Zelllysate-Gemisch isoliert werden kann. Da die rekombinante skmMLCK zusätzlich einen Histag enthält, sollte eine Identifizierung der Kinase durch Western-Blot-Analyse mit einem  $\alpha$ -Histag-Antikörper möglich sein. Dazu werden eine skmMLCK-Vergleichsprobe sowie Lysate aus adulten Ratten- und Kaninchenherzen durch Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Western-Blot analysiert (Abbildung 79). Die Expositionszeit für den Film beträgt 5 min.



**Abb. 79:** (A) SDS-Gel einer skmMLCK-Vergleichsprobe sowie Lysaten aus adulten Ratten- und Kaninchenherzen und (B) der entsprechende Western-Blot. (M: Molekulargewichtsmarker).

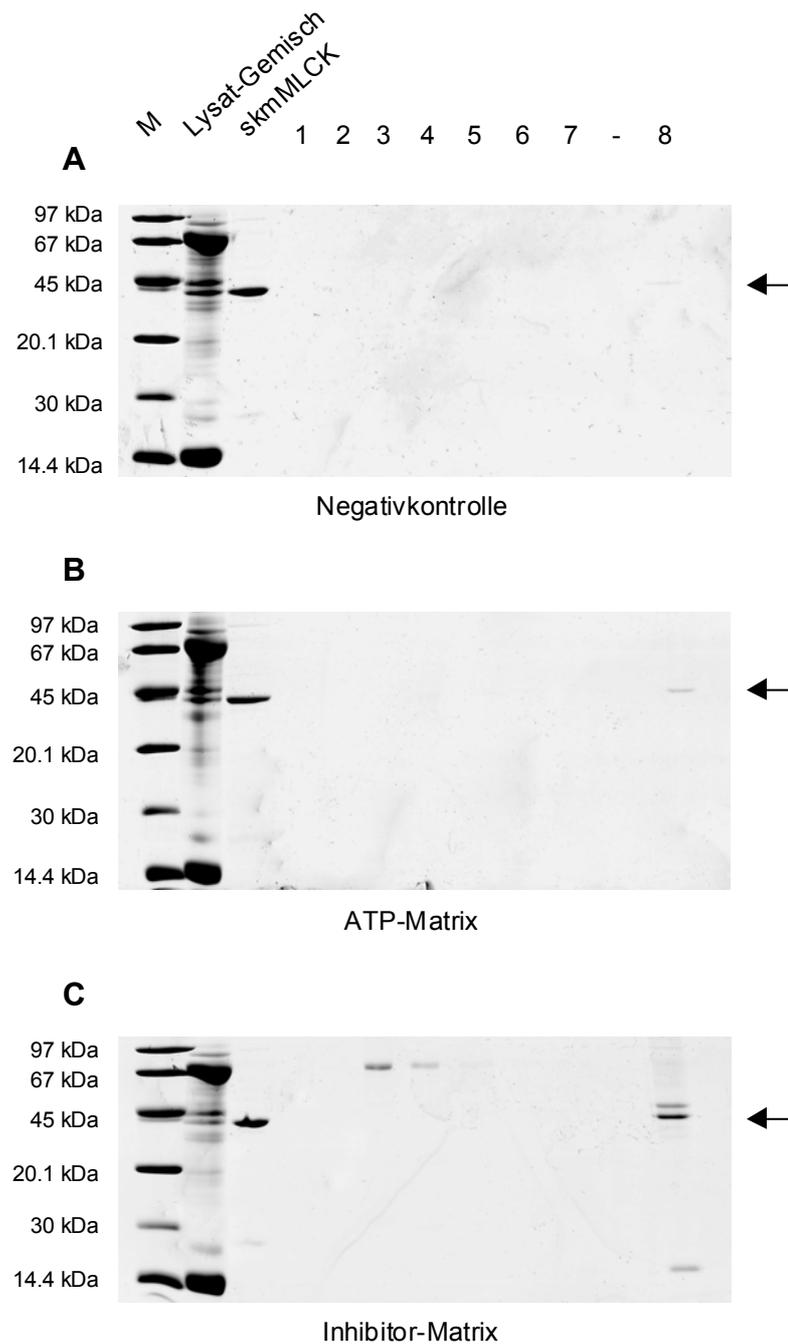
Der Western-Blot (B) zeigt, dass die rekombinante skmMLCK mit Hilfe des verwendeten  $\alpha$ -Histag-Antikörpers eindeutig identifiziert werden kann. Das Lysat aus adulten Rattenherzen zeigt im Western-Blot verschiedene Banden, die wahrscheinlich durch Kreuzreaktionen mit dem aus Maus stammenden Antikörper entstehen. Im Gegensatz dazu zeigt das Lysat aus adulten Kaninchenherzen mit dem  $\alpha$ -Histag-Antikörper nur ganz geringe Hintergrundsignale. Wenn es also gelingt, die rekombinante Kinase aus einem Gemisch mit Lysat aus adulten Kaninchenherzen durch Affinitätschromatographie zu isolieren, sollte die eindeutige Identifizierung von skmMLCK mittels Western-Blot-Analyse möglich sein.

Für die Affinitätschromatographie mit den hergestellten Matrices wird rekombinante skmMLCK mit einem Zelllysat aus adulten Kaninchenherzen gemischt. Die Matrices werden mit dem skmMLCK-Lysat-Gemisch beladen und anschließend gewaschen. Die

Elution der Affinitätssäulen erfolgt mit steigenden Salzkonzentrationen bzw. mit Mg-ATP nach dem folgenden Schema:

- 1.) ohne NaCl
- 2.) 200 mM NaCl
- 3.) 400 mM NaCl
- 4.) 600 mM NaCl
- 5.) 10 mM ATP/20 mM MgCl<sub>2</sub>
- 6.) 10 mM ATP/20 mM MgCl<sub>2</sub>
- 7.) 10 mM ATP/20 mM MgCl<sub>2</sub>
- 8.) SDS-Probenpuffer

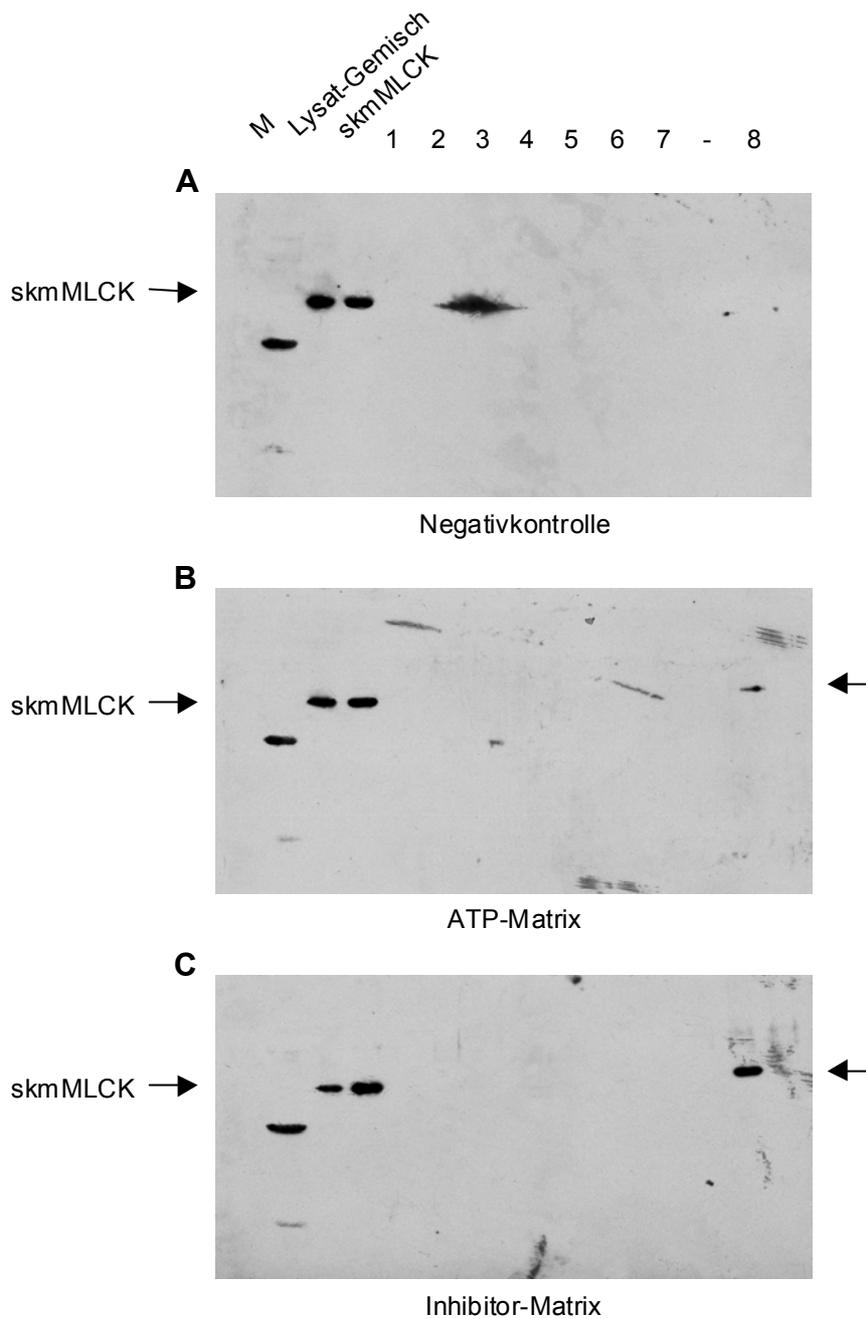
Die jeweiligen Eluate der Liganden-freien Matrix (Negativkontrolle) sowie der ATP- und Inhibitor-Matrix werden anschließend durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Als Kontrolle dienen jeweils die einzelnen Lysat-Gemische nach Beladen der Säule und eine skmMLCK-Vergleichsprobe. In Abbildung 80 sind die SDS-Gele nach Elution der Matrices gezeigt. Für die Negativkontrolle (A) sind während der Elution keine Proteinbanden zu erkennen. Unspezifisch gebundene Proteine werden also bereits vor der Elution durch das wiederholte Waschen der Matrix entfernt. Für die ATP-Matrix (B) sind während der Elution mit steigendem Salzgehalt und mit Mg-ATP ebenfalls keine Banden sichtbar. Wird jedoch mit SDS-Probenpuffer eluiert, ist eine Bande erkennbar. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um skmMLCK. Die Wechselwirkung mit der Matrix scheint jedoch nicht sehr groß zu sein, da die Intensität der Bande sehr gering ist. Bei Elution der Inhibitor-Matrix (C) eluiert zwischen 400 und 600 mM NaCl eine Bande im Bereich um 67 kDa, bei der es sich vermutlich um Albumin aus dem Zelllysate handelt. Da für die ATP-Matrix eine solche Bande nicht beobachtet wird, findet die Wechselwirkung des Albumins wahrscheinlich nur über das Peptid-Fragment des Inhibitors statt. Wird nun mit SDS-Probenpuffer eluiert, erkennt man eine intensive Bande, welche wahrscheinlich von skmMLCK stammt. Die Wechselwirkung des bifunktionellen Inhibitors mit der Protein-Kinase scheint hier wesentlich größer zu sein als mit der ATP-Matrix, was deutlich an der Intensität der eluierten Bande zu sehen ist. Daneben werden vorwiegend noch zwei weitere Banden eluiert. Bei der Bande, die etwas oberhalb liegt, könnte es sich zum Beispiel um eine Protein-Kinase mit ähnlicher Substratspezifität handeln, die ebenfalls über das Peptid-Fragment mit dem Inhibitor wechselwirkt. Die Bande bei etwa 14 kDa könnte von Calmodulin stammen, welches mit der MLCK assoziiert ist.



**Abb. 80:** SDS-Gele nach schrittweiser Elution der mit skmMLCK-Lysat-Gemisch beladenen Affinitätsmatrices. (A) Negativkontrolle, (B) ATP-Matrix und (C) Inhibitor-Matrix (M: Molekulargewichtsmarker).

In Abbildung 81 sind die entsprechenden Western-Blots zu sehen. Die Negativkontrolle (A) zeigt wie erwartet nur in dem Lysat-Gemisch und der Vergleichsprobe eine deutliche Bande für skmMLCK. Bei dem Signal, welches bei Elution mit 200 bis 400 mM NaCl sichtbar ist, handelt es sich nicht um eluierte skmMLCK, sondern um ein Artefakt, das wahrscheinlich auf eine Verunreinigung der Membran in diesem Bereich zurückzuführen

ist. Im Western-Blot für die ATP-Matrix (B) sieht man analog zum SDS-Gel bei Elution mit SDS-Probenpuffer eine schwache Bande, bei der es sich tatsächlich um skmMLCK handelt. Der entsprechende Western-Blot nach Elution der Inhibitor-Matrix (C) zeigt ebenfalls eine Bande für skmMLCK. Die Intensität der Bande ist auch im Western-Blot wesentlich größer, was die erhöhte Anreicherung der Protein-Kinase durch Verwendung des bifunktionellen Inhibitor widerspiegelt.



**Abb. 81:** Western-Blots der SDS-Gele nach schrittweiser Elution der mit skmMLCK-Lysat-Gemisch beladenen Affinitätsmatrices. (A) Negativkontrolle, (B) ATP-Matrix und (C) Inhibitor-Matrix (M: Molekulargewichtsmarker).

## 4 Diskussion

In eukaryontischen Zellen werden wesentliche Aspekte des Lebens über die reversible Phosphorylierung von Proteinen reguliert. Die Phosphorylierung erfolgt durch Protein-Kinasen, die den Transfer des  $\gamma$ -Phosphatrests von ATP auf die alkoholischen (Ser, Thr) und/oder phenolischen (Tyr) Proteingruppen der zugehörigen Substrate katalysieren. Die Familie der Protein-Kinasen bildet eine der größten bekannten Protein-Familien, wobei die physiologische Rolle der meisten bisher identifizierten Kinasen nicht bekannt ist. Die Entwicklung neuer Methoden, die eine Identifizierung der Regulatoren und Substrate von Protein-Kinasen ermöglichen und Untersuchungen der Signaltransduktionswege einzelner Enzyme *in vitro* und *in vivo* erlauben, sind daher von besonderem Interesse. Die gezielte Inhibierung von Protein-Kinasen und eine Visualisierung der beteiligten Signalwege in lebenden Zellen könnten dabei wichtige Informationen über eine mögliche physiologische Rolle der Enzyme liefern. Bifunktionelle Kinase-Inhibitoren scheinen für solche Anwendungen besonders geeignet zu sein. In solchen Bisubstrat-Inhibitoren ist der Phosphat-Donor (ATP) über einen Linker kovalent mit dem Phosphat-Akzeptor (Peptid) verknüpft. Damit soll möglichst die exakte Positionierung der beiden Substrate während des Phosphoryltransfers innerhalb des aktiven Zentrums der Kinase imitiert werden. Im Idealfall kann der Inhibitor dann gleichzeitig mit der Nukleotid- und der Peptid/Protein-Bindungsstelle konkurrieren. Durch die Kombination der beiden Substrat-Fragmente in einem Molekül sollte der Inhibitor dann sowohl eine hohe Affinität als auch eine hohe Spezifität für die jeweilige Ziel-Kinase besitzen. Daneben sollte der Inhibitor die Protein-Kinase, gegebenenfalls nach Stimulation der Enzymaktivität, im „angeschalteten“ Zustand fixieren können. Nach Transfektion in lebende Zellen sollte ein entsprechender fluoreszenzmarkierter bifunktionaler Inhibitor zum einen Informationen über die exakte Lokalisation der Ziel-Kinase in der Zelle liefern können. Zum anderen sollte die Beobachtung der direkten Auswirkungen der Inhibition der Signalwege, an denen die Kinase beteiligt ist, durch mikroskopische Methoden möglich sein.

Das Sarkomer ist die kleinste kontraktile Einheit in quergestreiften Muskeln. Die Bildung der Sarkomere ist ein in der Biologie einzigartiges Beispiel für die exakte Anordnung tausender Moleküle in einer supramolekularen Struktur mit nahezu kristalliner Anordnung. Das Ergebnis dieser präzisen Anordnung ist ein Zusammenwirken vieler verschiedener Klassen von Proteinen. Dadurch ist eine Umwandlung von Bewegungen auf molekularer Ebene, die durch die Wechselwirkungen von Aktin und Myosin hervorgerufen werden, in eine makroskopische Bewegung der Muskeln möglich. Das riesige Muskelprotein Titin, auch bekannt als Connectin, ist die einzige bekannte Struktur, die die Hälfte eines

Sarkomers überspannt und als eine Art „*molecular ruler*“ die zeitliche und örtliche Anordnung einer Vielzahl sarkomerischer Proteine während der Entwicklung von Muskelzellen steuert. Titin besitzt neben Phosphorylierungsstellen für andere Protein-Kinasen und Bindungsstellen für eine Vielzahl weiterer Muskelproteine in seinem C-terminalen Bereich eine Ser/Thr-Kinase-Domäne, die auch als Titin-Kinase (TK) bezeichnet wird. Es wird angenommen, dass Titin und insbesondere die Titin-Kinase maßgeblich an der Signaltransduktion des Sarkomers beteiligt sind. Bis heute konnte jedoch nur ein einziges physiologisches Substrat der Titin-Kinase, das Muskelprotein Telethonin, identifiziert werden und über weitere Substrate, Regulatoren oder physiologische Aspekte ist nur wenig bekannt. Der Einsatz geeigneter Titin-Kinase-Inhibitoren könnte hier die Untersuchung der Signaltransduktionswege von TK in Muskelzellen ermöglichen und eine Visualisierung solcher Signalwege mittels mikroskopischer Methoden könnte weitere wichtige Hinweise über die physiologische Rolle der Kinase liefern. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher an Modellsystemen stellvertretend für die Klasse der Ser/Thr-Kinasen untersucht werden, ob es möglich ist, entsprechende fluoreszenzmarkierte bifunktionelle Kinase-Inhibitoren zu synthetisieren, die für eine Visualisierung von Signalwegen in lebenden Zellen geeignet sind.

#### **4.1 Synthese fluoreszenzmarkierter bifunktioneller Protein-Kinase-Inhibitoren**

In der Literatur finden sich verschiedene Ansätze für die Synthese von bifunktionellen Ser/Thr- und Tyr-Kinase-Inhibitoren. Die Synthese eines neuen bifunktionellen Inhibitors für PKA erfolgt hier ausgehend von einem modifizierten Kemptide-Peptid, in dem das zu phosphorylierende Serin gegen ein Lysin substituiert ist. In Vorversuchen mit N- und C-terminal geschütztem Lysin (Ac-Lys-OMe) kann gezeigt werden, dass eine Carbodiimid-vermittelte Kopplung der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins mit dem  $\gamma$ -Phosphatrest von ATP mittels EDC möglich ist. Es erweist sich hier als großer Vorteil, dass das Carbodiimid wasserlöslich ist und die Kopplungsreaktionen damit in wässrigen Puffern erfolgen können. Die anschließende Kopplung des Peptids mit ATP ist ebenfalls ohne Probleme durchführbar. Die für den Schutz der N-terminalen Aminogruppe verwendete Fmoc-Gruppe kann nach Optimierung der Abspaltungsbedingungen durch Behandlung mit 20 % Piperidin nahezu vollständig abgespalten werden. Aufgrund der Absorption der Fmoc-Gruppe ist dabei eine Kontrolle der Abspaltung mittels HPLC gut möglich. Das N-terminal entschützte Addukt wird dann mit FITC und TRITC umgesetzt. Die erhaltenen Umsätze sind hier trotz Überschuss der verwendeten Fluorophore nicht sehr hoch, was vermutlich

auf eine teilweise Hydrolyse der eingesetzten Isothiocyanate zurückzuführen ist. Hier könnte die Verwendung von entsprechenden NHS-Estern wahrscheinlich zu höheren Umsätzen führen. Die Reinigung der fluoreszenzmarkierten Verbindungen ist anschließend mit HPLC möglich. Aufgrund des kurzen Peptid-Fragments können alle Reinigungen problemlos mit einem neutralen Puffersystem durchgeführt werden. Bei Verwendung von sauren Puffern ist ein teilweiser Zerfall der säurelabilen Phosphoramidate zu beobachten. Die hier verwendete Synthesestrategie stellt eine neue und praktikable Methode für die Synthese eines fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitors für PKA dar. Die kovalente Kopplung eines Peptid-Fragments mit ATP über einen Lysin-Linker sollte ohne weitere Veränderungen auch für andere Peptidsequenzen möglich sein, sofern diese keine weiteren Lysine enthalten. Dadurch sind wahrscheinlich auch Inhibitoren für andere Protein-Kinasen zugänglich.

Die Synthese der beiden fluoreszenzmarkierten bifunktionellen MLCK-Inhibitoren erfolgt ausgehend von Peptid-Fragmenten mit den Sequenzen der skm-rMLC und sm-rMLC. In einem ersten Syntheseversuch wird ein modifiziertes skm-rMLC-Peptid verwendet, in dem das zu phosphorylierende Serin gegen ein Cystein substituiert ist. Das Peptid wird über Festphasensynthese hergestellt. Die gewählte Sequenz erweist sich dabei aus synthetischer Sicht als unproblematisch. Die Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen und die Abspaltung von der festen Phase verlaufen ebenfalls problemlos. Die Reinigung des Rohpeptids ist mit HPLC möglich. Das als zweites Linker-Teilstück verwendete  $\beta$ -Iodethylamin kann durch Umsetzung von Ethanolamin mit wässriger Iodwasserstofflösung erhalten werden. Die anschließende Kopplung von  $\beta$ -Iodethylamin mit ATP/EDC verläuft nahezu vollständig. Während der Reinigung und bei längerer Aufbewahrung ist jedoch ein teilweiser Zerfall des  $\gamma$ -Phosphat-modifizierten ATP-Analogons zu beobachten. Obwohl gezeigt werden kann, dass eine Substitutionsreaktion des Peptids mit  $\beta$ -Iodethylamin stattfindet, liefert die entsprechende Umsetzung mit dem modifizierten ATP-Analogon nicht das gewünschte Substitutionsprodukt. Direkt nach Mischen der beiden Komponenten fällt ein Niederschlag aus, der in verschiedenen organischen Lösungsmitteln und wässrigen Puffern nahezu unlöslich ist, jedoch mit 6 M Gdn/HCl in Lösung gebracht werden. Die Analyse des gelösten Niederschlags zeigt, dass es sich dabei nur um die eingesetzten Ausgangssubstanzen handelt. Da die Reaktion des  $\beta$ -Iodethylamin-Linkers in Abwesenheit des Nukleotids normal verläuft, kommt es vermutlich zur Bildung eines schwerlöslichen Salzkomplexes unter Mitwirkung der negativ geladenen Phosphat-Gruppen. Da auch verschiedene Änderungen der Reaktionsbedingungen und erneute Synthese der Inhibitor-Komponenten nicht zu der Bildung des gewünschten Addukts führen, wird diese Synthesestrategie verworfen. Eine zweite Synthesestrategie

basiert auf einem Linker, der bereits für die Synthese eines bifunktionellen Inhibitors für die Tyrosin-Kinase IRK (Insulin-Rezeptor-Kinase) eingesetzt werden konnte (Parang *et al.*, 2001). Das zu phosphorylierende Serin wird in den Peptiden durch Diaminopropionsäure (Dpr) substituiert. Die für den Schutz der primären Aminogruppe der Dpr-Seitenkette verwendete *iv*(Dde)-Gruppe kann nach Optimierung der Abspaltungsbedingungen durch Behandlung mit einer 2 %igen Lösung von Hydrazinhydrat in DMF nahezu vollständig abgespalten werden. Die anschließende Kopplung von Bromessigsäure, die das zweite Linker-Teilstück bildet, ist mit DIC möglich. Die Kopplung erfolgt hier an der festen Phase. Dies hat den Vorteil, dass das Reaktionsgemisch einfach durch Waschen entfernt werden kann. Die Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen und die Abspaltung von der festen Phase verlaufen problemlos und die Reinigung der Rohpeptide ist mit HPLC möglich. Anschließend wird die Kopplung mit der Thiophosphat-Gruppe von ATP $\gamma$ S durchgeführt. Die Substitutionsreaktion des bromoacylierten Peptids mit ATP $\gamma$ S erfolgt in MeOH/Wasser 4:1, wobei das Produkt als Niederschlag ausfällt und überschüssiges Peptid leicht durch Waschen entfernt werden kann. Eine Reinigung der Phosphorthioate vor der Fluoreszenzmarkierung gestaltet sich schwierig. Unter neutralen HPLC-Pufferbedingungen können die Addukte aufgrund der längeren Peptid-Fragmente nicht von der Säule eluiert werden. Unter sauren Pufferbedingungen ist die Reinigung möglich, es wird jedoch ein teilweiser Zerfall der säurelabilen Phosphorthioate beobachtet. Eine Reinigung über Anionenaustauscher-Chromatographie ist möglich, führt aber bei anschließendem Lyophilisieren des Produktes wahrscheinlich zu einer Zyklisierung unter Mitwirkung der N-terminalen freien Aminogruppe des Peptids. Daher werden die bromoacylierten Peptide bis zur Homogenität gereinigt und dann mit ATP $\gamma$ S in einer vollständigen Reaktion umgesetzt. Die Substitutionsprodukte werden danach direkt mit FITC bzw. Cy5-NHS N-terminal markiert. Die Fluoreszenzmarkierung wird in nahezu neutralem Puffer durchgeführt, um eine Reaktion des Isothiocyanats bzw. des NHS-Esters mit freien Lysin-Seitenketten weitgehend zu verhindern. Trotzdem kommt es, vorwiegend bei der Reaktion mit FITC, zur Bildung von mehrfach markierten Nebenprodukten, die teilweise massenspektrometrisch nachgewiesen werden können. Ein niedrigerer pH-Wert würde wahrscheinlich zu einer noch spezifischeren N-terminalen Markierung führen, gleichzeitig würde jedoch die Reaktionsgeschwindigkeit herabgesetzt, da die Aminogruppen für die Kopplung deprotoniert vorliegen müssen. Eine Abtrennung der einfach fluoreszenzmarkierten Addukte aus den Reaktionsgemischen ist aber mit HPLC möglich. Die notwendigen sauren HPLC-Pufferbedingungen führen dabei zu einer teilweisen Spaltung der Produkte. Die gesammelten Produktfraktionen werden daher direkt auf neutrale Bedingungen umgepuffert. Da das Peptid-Fragment jetzt N-terminal

fluoreszenzmarkiert ist, kann für die Fluorescein-markierten Verbindungen eine zweite Reinigung mit Anionenaustauscher-Chromatographie erfolgen und die Produkte ohne weitere Nebenreaktion lyophilisiert werden. Die Cy5-markierten Verbindungen lassen sich nicht weiter mit Anionenaustauscher-Chromatographie reinigen. Der Cy5-Farbstoff führt dazu, dass die Verbindungen auf der Säule hängen bleiben und keine geeignete Trennung möglich ist. Obwohl Cy5 aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaften und der hohen Photostabilität im Vergleich zu Fluorescein als Fluorophor für die Lasermikroskopie vorzuziehen ist, erweisen sich die hydrophoben Eigenschaften des Farbstoffs aus synthetischer Sicht als Nachteil. Möglicherweise könnten hier als Alternative Alexa-Farbstoffe, die vergleichbare Fluoreszenzeigenschaften besitzen, eingesetzt werden. Die hier angewendete Synthesestrategie ermöglicht erstmalig die Synthese von fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitoren für skmMLCK und smMLCK. Diese Methode sollte unabhängig von der Sequenz der Peptid-Fragmente angewendet werden können, womit eine Übertragung auch auf andere Protein-Kinasen möglich ist. Bei der Synthese eines bifunktionellen Inhibitors für die Tyrosin-Kinase IRK traten entsprechende Probleme bei der Reinigung der Phosphorthioate auf (persönliche Mitteilung P.A. Cole, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA). Die Entwicklung einer Reinigungsstrategie unter neutralen HPLC-Bedingungen wäre damit von besonderem Interesse und würde zu wesentlich geringeren Verlusten führen.

Für die Synthese eines fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitors für die Titin-Kinase wird ebenfalls die zuvor beschriebene Synthesestrategie angewendet. Das Peptid-Fragment des Inhibitors basiert dabei auf dem C-terminalen Bereich der Sequenz von Telethonin, welcher das zu phosphorylierende Serin enthält. In diesem Fall werden die anderen Serine nicht durch Alanin substituiert, da der entsprechende nicht-fluoreszenzmarkierte bifunktionelle TK-Inhibitor für Kristallisationsversuche verwendet wird und die Hydroxyl-Gruppen der Serine möglicherweise an Wechselwirkungen innerhalb der katalytischen Domäne der Titin-Kinase beteiligt sind. Für die Fluoreszenzmarkierung wird der Inhibitor ebenfalls mit Cy5-NHS umgesetzt und zeigt bei der Reinigung die bereits genannten Probleme. Mit Hilfe der verwendeten Synthesestrategie wird hier zum ersten Mal ein potentieller (fluoreszenzmarkierter) bifunktioneller Inhibitor für die Titin-Kinase synthetisiert.

## 4.2 Synthese eines fluoreszenzmarkierten ATP-Analogons

Für die Ausarbeitung einer Methode zur Transfektion der fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitoren in lebende Zellen soll ein fluoreszenzmarkiertes ATP-Analogon

in ausreichender Menge synthetisiert werden. Dies soll über die Modifikation des  $\gamma$ -Phosphatrests von ATP erfolgen. Eine Möglichkeit bietet die Carbodiimid-Kopplung primärer Amine mittels EDC, die bereits bei der Synthese des PKA-Inhibitors angewendet wurde. Als einfache Linker zwischen  $\gamma$ -Phosphatrest und Fluorophor werden hier Diaminoalkane verschiedener Kettenlänge eingesetzt, die aufgrund der zweiten freien Aminogruppe eine Fluoreszenzmarkierung mit FITC erlauben sollten. Die Synthese der  $\gamma$ -Phosphat-modifizierten ATP-Analoga erfolgt ohne Probleme. Die anschließende Fluoreszenzmarkierung mit FITC liefert jedoch nur Spuren der gewünschten Produkte, wobei sich keine Veränderung mit der Länge der Alkylkette zeigt. Der Triphosphatrest des Nukleotids ist nicht streng linear angeordnet, sondern bildet eine räumliche Struktur aus. Daher besteht die Möglichkeit, dass die primäre Aminogruppe der flexiblen Linker auf irgendeine Weise durch die negativen Ladungen der Phosphatgruppen abgeschirmt wird. Damit wäre die Aminofunktion des Linkers für die reaktive Gruppe des Fluorophors nicht mehr zugänglich, was die nur minimalen Ausbeuten erklären würde. Da auch die Veränderung der Reaktionsbedingungen nicht zu ausreichender Produktbildung führt, wird im nächsten Schritt versucht, zuerst den Fluorophor mit den Diaminoalkanen umzusetzen und dann die Kopplung mit ATP durchzuführen. Für die verwendeten Diaminoalkane gelingt die Umsetzung mit FITC, die Kopplung der fluoreszenzmarkierten Linker an den  $\gamma$ -Phosphatrest von ATP ist aber ebenfalls nicht möglich. Eine Erklärung hierfür wird nicht gefunden. Um einer möglichen Abschirmung der freien Aminogruppe des Linkers durch die Phosphatgruppen entgegenzuwirken, wird in einem weiteren Versuch  $\beta$ -(4-Aminophenyl)-ethylamin verwendet, welches im Vergleich zu den verwendeten Diaminoalkanen einen sterisch anspruchsvolleren Linker darstellt. Da Isothiocyanate im Gegensatz zu Carbodiimiden nur mit aliphatischen primären Aminogruppen reagieren, wird die Ethylamino-Gruppe des Linkers als Trifluoracetamid geschützt. Die anschließende Carbodiimid-Kopplung der aromatischen Aminogruppe an den  $\gamma$ -Phosphatrest von ATP mittels EDC ist ohne Probleme möglich. In diesem Fall gelingt, nach Entschützung der primären aliphatischen Aminofunktion, auch die Fluoreszenzmarkierung mit FITC. Die Reinigung ist mit HPLC möglich.

Der  $\beta$ -(4-Aminophenyl)-ethylamin-Linker scheint prinzipiell die Synthese fluoreszenzmarkierter  $\gamma$ -Phosphat-modifizierter ATP-Analoga zu ermöglichen. Diese könnten dann für Untersuchungen an ATP-bindenden Enzymen verwendet werden. Erste Verdrängungsexperimente mit dem synthetisierten Analogon und PKA zeigen, dass dieses trotz der Modifikation am  $\gamma$ -Phosphat immer noch Affinität zu der Protein-Kinase PKA besitzt. Ein kleinerer Fluorophor könnte hier vielleicht zu einer weiter erhöhten Affinität führen. Um genauere Aussagen über das Bindungsverhalten machen zu können,

müssten jedoch noch weitere kinetische Untersuchungen durchgeführt werden. Daneben ist das entsprechende nicht-fluoreszenzmarkierte ATP-Analogon für die Kopplung an NHS-aktivierte Sepharose geeignet, wodurch die Generierung von ATP-Matrices für die Affinitätschromatographie möglich ist.

### 4.3 Untersuchungen zur Affinität und Spezifität der bifunktionellen Inhibitoren

Die Untersuchung der Affinität und Spezifität der synthetisierten fluoreszenzmarkierten Inhibitoren zu der jeweiligen Ziel-Kinase erfolgt durch Phosphorylierungsexperimente mit radioaktiv markiertem [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP. In den Verdrängungsexperimenten mit PKA wird die katalytische Untereinheit von PKA verwendet. Als Protein-Substrat dient das c-C1C2-Fragment des Myosin-bindenden Protein C (MyBP-C). In den durchgeführten Verdrängungsexperimenten zeigen die beiden synthetisierten fluoreszenzmarkierten bifunktionellen PKA-Inhibitoren wie erhofft eine Inhibierung der Phosphorylierungsreaktion. Die Inhibition ist dabei mit der des natürlichen Nukleotid-Substrats ATP vergleichbar. Für PKA findet man  $K_m$ -Werte für ATP von etwa 10  $\mu\text{M}$ . Schätzt man die Affinität der Inhibitoren aus den Autoradiogrammen im Vergleich mit ATP ab, so liegen diese ebenfalls in diesem Bereich oder sogar etwas darunter. Für die Synthese hochaffiner bifunktionaler PKA-Inhibitoren ist die Kopplung der beiden Inhibitor-Fragmente über einen Lysin-Linker damit besser geeignet, als die von Medzihradzky durchgeführte Verknüpfung über Phosphodiesterbindungen (Medzihradzky *et al.*, 1994). Betrachtet man die Verdrängung des Lysin-ATP-Kopplungsaddukts **1** und des Lysin-modifizierten Kemptide-Peptids **4**, so erkennt man, dass die Modifikation durch den Linker einen erheblichen Einfluss auf die Affinität der einzelnen Inhibitor-Komponenten hat. Da dies für die synthetisierten Inhibitoren nicht beobachtet wird, scheint die erhöhte Affinität verglichen mit den modifizierten Einzelkomponenten tatsächlich auf der gleichzeitigen Wechselwirkung des Inhibitors mit beiden Bindungsstellen des Enzyms zu beruhen. Die Affinität des Inhibitors kann vermutlich noch weiter erhöht werden, wenn ein längeres Peptid-Fragment, zum Beispiel basierend auf dem PKI-Inhibitor-Peptid, verwendet wird. Dadurch sollten intensivere Wechselwirkungen mit der Protein-Kinase erfolgen. Mit Hilfe der Kristallstruktur der katalytischen Untereinheit von PKA in Gegenwart von ADP, Aluminiumtrifluorid und eines Peptid-Substrats gelang vor kurzem erstmalig der strukturelle Beweis, dass der Phosphoryltransfer des  $\gamma$ -Phosphatrests von ATP auf das Peptid-/Protein-Substrat bei PKA wahrscheinlich nach einem vorwiegend assoziativen Mechanismus verläuft (Madhusudan *et al.*, 2002). Das bedeutet, dass der Donor-

Akzeptor-Abstand wahrscheinlich kleiner ist als die Länge des hier verwendeten Linkers. Die Verkürzung des Linkers durch die Verwendung von Ornithin anstatt Lysin könnte daher ebenfalls einen erheblichen Einfluss auf die Affinität haben. Daneben ist ein Affinitätsverlust durch die Fluoreszenzmarkierung in Nähe der Phosphorylierungsstelle nicht auszuschließen. Aufgrund der überlagerten Substratspezifität von PKA mit anderen Protein-Kinasen, wie zum Beispiel PKC, wird die mögliche Diskriminierung nahe verwandter Protein-Kinasen aufgrund der Sequenz des Peptid-Fragments eines solchen bifunktionellen Inhibitors an einem zweiten Modellsystem, in diesem Fall an MLCK, untersucht.

Für Verdrängungsexperimente mit den MLCK-Inhibitoren steht rekombinante MLCK aus menschlichem Herzmuskel zur Verfügung, die auch rMLC aus Skelettmuskel phosphoryliert. Diese wird daher im Folgenden auch als skmMLCK bezeichnet. Als Protein-Substrat dient die rekombinante rMLC aus menschlichem Herzmuskel. Bei den Verdrängungsexperimenten mit dem Fluorescein-markierten bifunktionellen skmMLCK-Inhibitor ist wie erwartet eine Inhibition der Phosphorylierungsreaktion zu beobachten. Diese ist sogar etwas stärker als die vergleichbare Verdrängung durch das natürliche Nukleotid-Substrat ATP (siehe Abschnitt 3.6.1). Es handelt sich hier also tatsächlich um einen Inhibitor für skmMLCK. Um auch eine quantitative Abschätzung der Inhibition zu ermöglichen, wird zusätzlich eine kinetische Untersuchung mit einem entsprechenden nicht-fluoreszenzmarkierten Inhibitor durchgeführt. Für die Phosphorylierung der rMLC erhält man nach Anpassung der Daten an die einfache Michaelis-Menten-Gleichung einen  $K_m$ -Wert von  $7.1 \mu\text{M}$  und eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{\text{max}}$  von  $2.7 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Beide Werte liegen in der Größenordnung für die Phosphorylierung synthetischer skm-rMLC-Peptide durch skmMLCK (Kemp *et al.*, 1994). Bei der Bestimmung der Inhibitor-Konstante  $K_i$  für den bifunktionellen skmMLCK-Inhibitor zeigt sich in einer Lineweaver-Burk-Auftragung der Daten deutlich, dass es sich hier nicht um eine einfache kompetitive Inhibition handelt. Es liegt wahrscheinlich eine gemischte Inhibition vor, die auf der gleichzeitigen Konkurrenz des Inhibitors mit beiden Bindungsstellen beruhen kann. Nach Anpassung der Daten an die Michaelis-Menten-Gleichung für eine gemischte Inhibition unter Verwendung der ermittelten  $K_m$ - und  $V_{\text{max}}$ -Werte für die rMLC-Phosphorylierung erhält man zwei Inhibitor-Konstanten  $K_i$  und  $K_i'$ . Mit  $K_i = 2.6 \mu\text{M}$  und  $K_i' = 2.1 \mu\text{M}$  liegt die Hemmung der Enzymreaktion in der Größenordnung, wie sie aus den Verdrängungsexperimenten im Vergleich mit dem natürlichen Nukleotid-Substrat ATP abgeschätzt werden konnte. Ein entsprechender nicht fluoreszenzmarkierter bifunktionaler Inhibitor für die Tyrosin-Kinase IRK zeigt eine Inhibition, die basierend auf dem Bisubstrat-Prinzip, im Vergleich dazu wesentlich höher

ist (Parang *et al.*, 2001). Für IRK gibt es Hinweise für einen eher dissoziativen Mechanismus des Phosphoryltransfers (Ablooglu *et al.*, 1997). Die gewählte Linker-Länge von etwa 5 Å scheint dann nahezu dem tatsächlichen Donor-Akzeptor-Abstand zu entsprechen, was sich in der hohen Affinität des IRK-Inhibitors widerspiegelt. Falls für MLCK jedoch ein eher assoziativer Mechanismus des Phosphoryltransfers vorliegt, dann wäre die Länge des Linkers, ähnlich wie für den synthetisierten PKA-Inhibitor, möglicherweise zu lang. Die Vermutung, dass der synthetisierte MLCK-Inhibitor unter den vorliegenden Reaktionsbedingungen als reines ATP-Analogon fungiert, kann jedoch widerlegt werden. Es ist aber trotzdem denkbar, dass die hier gewählte Linker-Länge oder die Struktur des Linkers für MLCK nicht optimal sind. Im Idealfall sollte die Inhibitor-Erkennung über die Bindung des Peptid-Fragments erfolgen, die dann das Nukleotid-Fragment in die Bindungstasche dirigiert. Im vorliegenden Fall erfolgt die Bindung möglicherweise vorwiegend durch das Nukleotid-Fragment, welches dann durch das Peptid-Fragment teilweise fixiert wird. Für PKA konnte gezeigt werden, dass die Modifikation am  $\gamma$ -Phosphatrest von ATP zu einem erheblichen Affinitätsverlust führt. Dieser Verlust könnte hier durch eine partiell abgeschwächte Bindung des Peptid-Fragments gerade aufgehoben werden, aber nicht zu einer sehr viel größeren Affinität führen. Die Synthese weiterer Inhibitoren mit verschiedenen Linker-Längen würde dazu wichtige Informationen liefern. Eine genauere Analyse des Inhibitionsmechanismus durch zusätzliche Experimente wird nicht durchgeführt, da die erhaltenen kinetischen Konstanten in der Größenordnung der qualitativ abgeschätzten Inhibition liegen. Um weiterhin zu zeigen, dass der synthetisierte skmMLCK-Inhibitor aufgrund der Sequenz des Peptid-Fragments spezifisch für seine Ziel-Kinase ist, werden Verdrängungsexperimente mit dem entsprechenden Fluorescein-markierten smMLCK-Inhibitor durchgeführt. Hier zeigt sich eine im Vergleich zu dem skmMLCK-Inhibitor wesentlich schwächere Inhibition der Phosphorylierungsreaktion. Die Affinität des Inhibitors liegt hier deutlich unter der des natürlichen Nukleotid-Substrats ATP. Damit zeigt sich eindeutig, dass ein solcher bifunktionaler Inhibitor aufgrund seiner Peptid-Sequenz in der Lage ist, nahe verwandte Protein-Kinasen zu diskriminieren. Es handelt sich bei dem synthetisierten skmMLCK-Inhibitor daher um einen Inhibitor, der spezifisch die Phosphorylierungsreaktion von skmMLCK inhibiert.

Aufgrund der beobachteten Affinität und Spezifität der hier synthetisierten fluoreszenzmarkierten bifunktionalen MLCK-Inhibitoren sind diese prinzipiell für eine Visualisierung von Signaltransduktionswegen in lebenden Zellen geeignet. Ob eine spezifische Lokalisation der Inhibitoren mit der jeweiligen Ziel-Kinase auch unter

zellulären Bedingungen erfolgt, wird in den durchgeführten Lokalisationsexperimenten untersucht.

Zur Untersuchung der Inhibition der Phosphorylierungsreaktion von Telethonin durch den potentiellen TK-Inhibitor müssen noch entsprechende Inhibitionsexperimente mit der Titin-Kinase durchgeführt werden. Weiterhin könnte die Kristallisation der nicht-fluoreszenzmarkierten Verbindung im Komplex mit der Titin-Kinase hier ergänzende Informationen liefern. Im Moment liegen jedoch noch keine Strukturdaten vor. Da die Titin-Kinase strukturelle Verwandtschaft mit der MLCK-Familie zeigt, ist es jedoch denkbar, dass der synthetisierte potentielle TK-Inhibitor ähnlich wie die MLCK-Inhibitoren die Phosphorylierung von Telethonin oder weiteren möglichen Kinase-Substraten inhibiert.

#### **4.4 Zelluläre Lokalisation der Inhibitoren**

Um die synthetisierten fluoreszenzmarkierten Inhibitoren für die Visualisierung von Signaltransduktionswegen in lebenden Zellen verwenden zu können, müssen diese auch unter zellulären Bedingungen spezifisch an die jeweilige Ziel-Kinase binden. Für die Transfektion der Inhibitoren in lebende Zellen wird daher mit Hilfe des synthetisierten Fluorescein-markierten ATP-Analogons eine Methode erarbeitet, die basierend auf einem porenbildenden bakteriellen Cytolysin, hier Streptolysin-O, eine reversible Permeabilisierung von Zellmembranen ermöglicht. Die an HeLa-Zellen durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die Transfektion polarer Substanzen, wie das hier verwendete ATP-Analogon, mit Streptolysin-O möglich ist. Die erarbeitete Methodik wird daher im Folgenden für die Transfektion des synthetisierten Fluorescein-markierten PKA-Inhibitors angewendet.

Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation des Fluorescein-markierten PKA-Inhibitors wird dieser mittels Streptolysin-O in HeLa-Zellen und in Herzmuskelzellen aus neonatalen Ratten transfiziert. Nach Transfektion des Inhibitors in HeLa-Zellen werden diese fixiert und anschließend mit einem primären Antikörper gegen die katalytische Untereinheit von PKA (PKA-C) behandelt. Danach erfolgt die Reaktion mit einem Alexa 546-markierten Sekundärantikörper. Die anschließenden fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen eindeutig, dass der synthetisierte PKA-Inhibitor in der Zelle mit PKA kolokalisiert. Nach Transfektion in Herzmuskelzellen erfolgt die Immunanfärbung mit einem Primärantikörper gegen das Titin-T12-Epitop und danach ebenfalls mit einem Alexa 546-markierten Sekundärantikörper. Neben einer vorwiegend diffusen Verteilung des Fluorescein-markierten Inhibitors innerhalb der Herzmuskelzelle erkennt man in Teilbereichen eine

leichte Querstreifung, die eine Kolo­kalisierung mit dem Titin-T12-Epitop zeigt. Die erzielten Transfektionsraten sind in beiden Fällen jedoch nur relativ gering. Hier könnte aber durch weitere Veränderungen der Transfektionsbedingungen wahrscheinlich eine Optimierung der Transfektionsraten erreicht werden. Eine sinnvolle Alternative zu der Verwendung von Transfektionsreagenzien wäre die direkte Mikroinjektion des fluoreszenzmarkierten Inhibitors in lebende Zellen. Die beobachtete Kolo­kalisierung in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen liefert erste Hinweise darauf, dass der fluoreszenzmarkierte bifunktionelle PKA-Inhibitor auch unter zellulären Bedingungen in der Lage ist, spezifisch an seine Ziel-Kinase zu binden. Damit wären die Voraussetzungen für den Einsatz eines solchen Inhibitors für die Visualisierung von Signalwegen erfüllt.

Untersuchungen mit den beiden synthetisierten MLCK-Inhibitoren sollen nun die Hinweise auf eine spezifische Bindung an die Kinase, die mit dem PKA-Inhibitor erhalten wurden, bestätigen. Dazu wird, als Ergänzung zu den Verdrängungsexperimenten, untersucht, ob ein solcher bifunktionaler Inhibitor auch unter zellulären Bedingungen aufgrund seiner Peptid-Komponente spezifisch zwischen nahe verwandten Protein-Kinasen diskriminieren kann. Da die mit Streptolysin-O erzielten Transfektionsraten, insbesondere bei Herzmuskelzellen aus neonatalen Ratten, nur gering waren, werden für die Lokalisationsexperimente mit den MLCK-Inhibitoren Triton-permeabilisierte H9C2-Zellen verwendet. Die Zellen werden dabei in Gegenwart der zu untersuchenden Substanzen unter Gleichgewichtsbedingungen mikroskopiert. In einem Vorversuch mit einem Cy5-markierten sm-rMLC-Peptid kann eindeutig gezeigt werden, dass smMLCK in den verwendeten Zellen mit dem Aktin-Cytoskelett assoziiert ist. In Gegenwart des Cy5-markierten bifunktionalen smMLCK-Inhibitor beobachtet man deutlich eine Kolo­kalisierung mit den Aktin-Stressfasern. Im Gegensatz dazu zeigt der Cy5-markierte skmMLCK-Inhibitor keine definierte Lokalisation innerhalb der Zellen. Der Inhibitor, der als Peptid-Fragment die Sequenz der sm-rMLC enthält, bindet also wie das Cy5-markierte sm-rMLC-Peptid spezifisch an die Ziel-Kinase smMLCK. Der entsprechende Inhibitor mit der Peptid-Sequenz der skm-rMLC zeigt nahezu keine Affinität zu smMLCK. Dies bestätigt die Ergebnisse aus den Verdrängungsexperimenten mit radioaktiv markiertem  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ . Hiermit kann erstmalig gezeigt werden, dass ein solcher bifunktionaler Inhibitor für MLCK aufgrund der Peptid-Sequenz auch in Zellen eine hohe Spezifität für seine Ziel-Kinase besitzt und in der Lage ist, nahe verwandte Protein-Kinasen zu diskriminieren. Damit sollte demnach auch die gezielte Inhibierung einer einzelnen Kinase unter zellulären Bedingungen möglich sein. Bifunktionelle fluoreszenzmarkierte Protein-Kinase-Inhibitoren stellen somit geeignete biochemische Werkzeuge für die Visualisierung von

Signaltransduktionswegen in lebenden Zellen dar. Für den Cy5-markierten smMLCK-Inhibitor wird zusätzlich untersucht, ob in den tritonierten Zellen in Gegenwart von Ca/CaM eine Aktivierung der MLCK beobachtet werden kann. Eine vermutete Anreicherung des Inhibitors entlang des Aktin-Cytoskeletts nach Stimulation durch Ca/CaM kann hier jedoch nicht beobachtet werden. Die auftretende Abschwächung der Fluoreszenz des Cy5-markierten-Inhibitors könnte dagegen ein Hinweis darauf sein, dass nach Aktivierung eventuell eine teilweise Delokalisation der smMLCK von den Stressfasern stattfindet. Dies ist jedoch rein spekulativ. Die untersuchte Aktivierung von smMLCK durch Ca/CaM in den Triton-behandelten Zellen führt also zu keiner eindeutigen Veränderung des Lokalisationsmusters des fluoreszenzmarkierten Inhibitors bzw. der untersuchten Kinase. Um genaue lokale Veränderungen nach Aktivierung von Protein-Kinasen verfolgen zu können sind daher wahrscheinlich Lokalisationsexperimente in lebenden Zellen notwendig.

Für die Untersuchung der Lokalisation des potentiellen Cy5-markierten TK-Inhibitors in tritonierten H9C2-Zellen oder in einzelnen Muskelfasern müssen noch entsprechende Experimente durchgeführt werden. Die für MLCK erhaltenen Ergebnisse, lassen aber vermuten, dass der synthetisierte Inhibitor, der die Peptid-Sequenz des TK-Substrats Telethonin enthält, in Muskelzellen ebenfalls spezifisch mit seiner Ziel-Kinase kolokalisiert. Eine Verwendung des Inhibitors für Untersuchungen der Signaltransduktionswege der Titin-Kinase ist daher denkbar. Dies könnte dann wichtige Informationen über die physiologische Rolle der Titin-Kinase liefern.

Da bisher noch keine Informationen über *in vivo* Experimente mit derartigen fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Inhibitoren existieren, werden hier erste Mikroinjektionsversuche an lebenden Fibroblasten durchgeführt. Interessant ist dabei, ob eine spezifische Lokalisation der MLCK-Inhibitoren beobachtet werden kann und ob durch einen möglichen inhibitorischen Effekt direkte morphologische Veränderungen, wie zum Beispiel die Zellmotilität, auftreten. Nach Mikroinjektion von Cy5-Dextran ist eine ubiquitäre Lokalisation mit starker Anreicherung im Bereich des Zellkerns zu beobachten. Für alle anderen mikroinjizierten Substanzen tritt nahezu keine cytosolische Verteilung auf. Hier kann man dafür vorwiegend eine intensive Lokalisation punktförmiger fluoreszierender Aggregate im einem Bereich um bzw. neben dem Zellkern sowie teilweise auch im Cytoplasma erkennen. Eine Begründung für die Lokalisation gerade in diesem Bereich, der bezogen auf die Bewegungsrichtung der Zellen vor dem Zellkern liegt, und in dem sich bei den Fibroblasten normalerweise der Golgi-Apparat befindet, kann nicht gegeben werden. Eine erhoffte Lokalisation des sm-rMLC-Peptids oder des

smMLCK-Inhibitors entlang des Aktin-Cytoskeletts, wie sie in tritonierten H9C2-Zellen beobachtet werden konnte, ist hier also nicht zu erkennen. Eine davon abweichende Lokalisation für den skmMLCK-Inhibitor ist ebenfalls nicht auszumachen. Ob die beobachtete Lokalisation teilweise auf Wechselwirkungen mit dem hydrophoben Cy5-Farbstoff zurückzuführen ist, kann nicht genau gesagt werden. Für andere Fluoreszenzfarbstoffe kann nach Mikroinjektion zumindest teilweise eine ähnliche Aggregation beobachtet werden (persönliche Mitteilung Mathias Gautel, King's College, London). Dass bei dem Cy5-Dextran keine derartige Lokalisation beobachtet wird, liegt wahrscheinlich daran, dass die Eigenschaft des Moleküls dort vorwiegend durch den ionischen Charakter des Dextrans bestimmt wird. Möglicherweise sind jedoch andere Fluoreszenzfarbstoffe, wie zum Beispiel Alexa-Farbstoffe, die ähnliche Fluoreszenzeigenschaften besitzen, für solche *in vivo* Untersuchungen besser geeignet. Viele der mikroinjizierten Zellen, die nach den mikroskopischen Aufnahmen noch über einen längeren Zeitraum beobachtet wurden, sind in dieser Zeit gestorben. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Bedingungen während der Injektionen und den anschließenden Beobachtungen für die Zellen nicht optimal waren. Außerdem ist denkbar, dass die Konzentrationen der injizierten Substanzen zu hoch waren und daher toxische Wirkungen auftraten. Daher ist die Bestimmung einer geeigneten Substanzkonzentration durch eine Verdünnungsreihe sowie die weitere Optimierung der Injektions- oder Mikroskopie-Bedingungen erforderlich. Da die direkte Mikroinjektion aber eine der effizientesten Methoden ist, um Moleküle in Zellen einzuschleusen und Untersuchungen unter *in vivo* Bedingungen durchzuführen, stellt sie allgemein für die Visualisierung von Signaltransduktionswegen mit Hilfe fluoreszenzmarkierter bifunktionaler Inhibitoren die Methode der Wahl dar.

#### **4.5 Verwendung bifunktionaler Inhibitoren für die Affinitätschromatographie**

Wie in den Versuchen mit den MLCK-Inhibitoren gezeigt werden konnte, besitzen bifunktionelle Kinase-Inhibitoren aufgrund ihrer Nukleotid-Komponente eine hohe Affinität und aufgrund der Peptid-Komponente eine hohe Spezifität für die jeweilige Ziel-Kinase. Solche Inhibitoren sind daher im besonderen Maße für die Affinitätschromatographie geeignet. Mit Hilfe des bifunktionalen skmMLCK-Inhibitors wird hier eine neuartige Sepharose-Martrix für die Affinitätschromatographie hergestellt. Die Kopplung des Inhibitors über die N-terminale freie Aminogruppe an die NHS-aktivierte Sepharose ist ohne Probleme möglich. Dass als Nebenreaktion ebenfalls eine teilweise Vernetzung mit

den Lysin-Seitenketten des Peptid-Fragments stattfindet, kann ähnlich wie bei den Fluoreszenzmarkierungen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Eine Kopplung des  $\gamma$ -Phosphat-modifizierten ATP-Analogons an die Sepharose-Matrix ist ebenfalls möglich. Ein Test der Matrices erfolgt mit rekombinanter skmMLCK, die sowohl an die ATP- als auch an die Inhibitor-Matrix gebunden wird. Ob mit der Inhibitor-Matrix die Isolierung von nativer kardialer MLCK aus Zelllysaten möglich ist, kann nicht eindeutig gezeigt werden, da der verwendete Antikörper gegen die menschliche kardiale MLCK mit den Lysaten aus Kaninchen- und Rattenherzen im Western-Blot unspezifische Wechselwirkungen zeigt. Entsprechende humane Zelllysate stehen jedoch nicht zur Verfügung. Da die verwendete rekombinante skmMLCK einen Histag besitzt, kann die Identifizierung mittels eines  $\alpha$ -Histag-Antikörpers erfolgen. Hier kann alternativ gezeigt werden, dass die Inhibitor-Matrix eine Isolierung der rekombinanten skmMLCK aus einem Lysat-Gemisch aus adulten Kaninchenherzen erlaubt. Die anschließende Identifizierung der Kinase gelingt mittels Western-Blot-Analyse. Die beobachtete Anreicherung der Kinase auf der Inhibitor-Affinitätssäule ist dabei wesentlich höher als mit der monovalenten ATP-Matrix. Dies ist auf die gleichzeitige Wechselwirkung des Enzyms mit dem Nukleotid- und Peptid-Fragment des Inhibitors zurückzuführen. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass bifunktionelle Kinase-Inhibitoren als potentielle Liganden für die Affinitätschromatographie geeignet sind. Damit könnte eine wesentliche Verbesserung bei der Reinigung und Identifizierung von Protein-Kinasen aus komplexen Gemischen erzielt werden. Außerdem ist nach Optimierung eines solchen Verfahrens auch die Verwendung solcher Matrices für vereinfachte proteomische Anwendungen denkbar.

## 4.6 Ausblick

Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, sind fluoreszenzmarkierte bifunktionelle Protein-Kinase-Inhibitoren aufgrund ihrer Eigenschaften für die Visualisierung von Signaltransduktionswegen geeignet. Sie stellen damit biochemische Werkzeuge dar, welche die gezielte Untersuchung einzelner Kinasen unter *in vitro* und *in vivo* Bedingungen ermöglichen sollten. Aufbauend auf dieser Arbeit müsste zunächst eine weitere Optimierung der Eigenschaften der synthetisierten MLCK-Inhibitoren sowie der Bedingungen für Mikroinjektion und Mikroskopie erfolgen. Wenn es dann anhand der ausgewählten Modell-Kinasen möglich ist, eine Methodik für die Visualisierung von Signalwegen in Muskelzellen zu etablieren, könnten im nächsten Schritt Untersuchungen mit einem entsprechenden Titin-Kinase-Inhibitor durchgeführt werden. Damit sollten wichtige Informationen über die Einbindung der Titin-Kinase in die Signaltransduktion des Sarkomers erhalten werden können. Dies könnte entscheidend zum Verständnis der

physiologischen Funktion der Titin-Kinase in quergestreiften Muskeln beitragen. Die in der Arbeit verwendeten Linker können möglicherweise auch für die Synthese von Bisubstrat-Inhibitoren für weitere Ser/Thr- oder Tyrosin-Kinasen verwendet werden. Um eine weitere Steigerung der Inhibitor-Affinitäten zu erreichen ist dann aber wahrscheinlich die individuelle Anpassung der Struktur und Länge des Linkers auf die jeweilige Ziel-Kinase unter Einbeziehung mechanistischer Überlegungen erforderlich. Eine Verwendung bifunktionaler Kinase-Inhibitoren für medizinische Anwendungen ist ebenfalls denkbar. Ein Vorteil ist, dass mittlerweile nahezu beliebige Peptid-Fragmente durch Festphasensynthese zugänglich sind. Des Weiteren scheint auch die kovalente Kopplung anderer, nicht auf Nukleotiden basierender, hochaffiner Inhibitoren mit spezifisch bindenden Peptid-Fragmenten möglich. Ein entscheidender Nachteil für medizinische Anwendungen ist jedoch, dass solche Inhibitoren aufgrund der enthaltenen Peptid-Fragmente, vergleichbar mit reinen Peptid-Inhibitoren, der enzymatischen Proteolyse ausgesetzt sind. Der Einsatz bifunktionaler Inhibitoren als Liganden für die Affinitätschromatographie sollte auf dem Gebiet der Isolierung und Charakterisierung von Protein-Kinasen im Vergleich zu konventionellen chromatographischen Methoden zu einer wesentlichen Vereinfachung führen. Nach Weiterentwicklung und Etablierung solcher speziellen Inhibitor-Matrices könnten diese möglicherweise auch für vereinfachte proteomische Anwendungen verwendet werden.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für ausgewählte Enzyme aus der Gruppe der Ser/Thr-Kinasen erstmalig fluoreszenzmarkierte bifunktionelle Inhibitoren synthetisiert. Diese bestehen aus Peptid-Fragmenten mit spezifischen Erkennungssequenzen für die jeweilige Kinase, die über einen Linker kovalent an den  $\gamma$ -Phosphat-Rest von ATP gekoppelt wurden. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte dabei jeweils an der N-terminalen Aminogruppe der Peptid-Fragmente. Für die cAMP-abhängige Protein-Kinase (PKA) konnte sowohl ein Fluorescein- als auch ein Tetramethylrhodamin-markierter Inhibitor synthetisiert werden. Aus Verdrängungsexperimenten mit radioaktiv markiertem  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  konnten für beide Inhibitoren Affinitäten zu PKA abgeschätzt werden, die im Bereich der Affinität des natürlichen Nukleotid-Substrats ATP lagen. Nach Ausarbeitung einer Transfektionsmethode mit Hilfe eines neuen Fluorescein-markierten ATP-Analogons konnte der Fluorescein-markierte PKA-Inhibitor mittels Streptolysin-O in HeLa-Zellen und in Herzmuskelzellen aus neonatalen Ratten transfiziert werden. Dabei konnte eine Kollokalisierung des Inhibitors mit PKA beobachtet werden. Dies lieferte erste Hinweise darauf, dass ein solcher bifunktionaler Inhibitor auch unter zellulären Bedingungen spezifisch an seine Ziel-Kinase bindet. Um die mit PKA erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen und zu zeigen, dass ein bifunktionaler Inhibitor aufgrund seines Peptid-Fragments nahe verwandte Protein-Kinasen diskriminieren kann, wurden weitere Untersuchungen für die Myosin-Leichtketten-Kinasen aus Skelettmuskel (skmMLCK) und glatter Muskulatur (smMLCK) durchgeführt. Für beide Kinasen konnten sowohl Fluorescein- als auch Cy5-markierte Inhibitoren synthetisiert werden. Aus Verdrängungsexperimenten mit radioaktiv markiertem  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  konnte für den Fluorescein-markierten skmMLCK-Inhibitor eine Affinität zu skmMLCK abgeschätzt werden, die im Bereich der Affinität des natürlichen Nukleotid-Substrats ATP lag. Durch eine zusätzliche kinetische Untersuchung mit einem entsprechenden nicht-fluoreszenzmarkierten skmMLCK-Inhibitor wurde gezeigt, dass hier eine gemischte Enzymhemmung vorliegt. Die beiden Inhibitor-Konstanten konnten zu  $K_i = 2.6 \mu\text{M}$  und  $K_i' = 2.1 \mu\text{M}$  bestimmt werden. Für die Phosphorylierung des natürlichen Protein-Substrats, der regulatorischen leichten Kette des Myosins (rMLC), wurde in Abwesenheit des Inhibitors eine Michaelis-Konstante von  $K_m = 7.1 \mu\text{M}$  und eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von  $V_{\max} = 2.7 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  ermittelt. Verdrängungsexperimente mit dem Fluorescein-markierten smMLCK-Inhibitor zeigten, dass dieser im Gegensatz zu dem skmMLCK-Inhibitor nur eine sehr geringe Affinität zu skmMLCK besitzt. Dies waren Hinweise auf eine hohe Spezifität der synthetisierten Inhibitoren. Ergänzend wurden daher mit den entsprechenden Cy5-markierten MLCK-Inhibitoren

Lokalisationsexperimente mit Triton-permeabilisierten H9C2-Muskelzellen durchgeführt. Hier war deutlich erkennbar, dass der smMLCK-Inhibitor mit smMLCK, die in den Zellen mit dem Aktin-Cytoskelett assoziiert ist, kolokalisiert. Für den skmMLCK-Inhibitor konnte dagegen keine Lokalisation mit smMLCK beobachtet werden. Damit konnte erstmalig gezeigt werden, dass bifunktionelle Kinase-Inhibitoren aufgrund des Peptid-Fragments in der Lage sind, auch unter zellulären Bedingungen zwischen nahe verwandten Protein-Kinasen zu diskriminieren. Die Kombination von Nukleotid- und Peptid-Komponente in einem bifunktionellen Kinase-Inhibitor ermöglicht also die gleichzeitige Wechselwirkung mit beiden Bindungsstellen des Enzyms, was sowohl zu einer hohen Affinität als auch einer hohen Spezifität des Inhibitors führt. Bifunktionelle Inhibitoren sollten daher die gezielte Inhibition einer einzelnen Protein-Kinase unter *in vivo* Bedingungen ermöglichen. Entsprechende fluoreszenzmarkierte Inhibitoren stellen dann geeignete biochemische Werkzeuge dar, um Signaltransduktionswege in lebenden Zellen mittels mikroskopischer Techniken zu visualisieren. Dadurch könnten wichtige Informationen über ausgewählte Protein-Kinasen, deren physiologische Funktionen nicht bekannt sind, erhalten werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte weiterhin eine neuartige Matrix für die Affinitätschromatographie hergestellt werden. Dafür wurde der bifunktionelle skmMLCK-Inhibitor an eine NHS-aktivierte Sepharose-Matrix gekoppelt. Mit Hilfe dieser Affinitätsmatrix war es möglich, rekombinante skmMLCK aus einem Zellysate-Gemisch aus adulten Kaninchenherzen zu isolieren. Die Identifizierung der Kinase erfolgte anschließend durch Western-Blot-Analyse. Die Anreicherung des Enzyms auf der Affinitätssäule war dabei für den verwendeten bifunktionellen Inhibitor wesentlich größer als für eine vergleichbare monofunktionelle ATP-Matrix. Bifunktionelle Kinase-Inhibitoren sollten daher für die Affinitätschromatographie besonders geeignet sein. Nach Etablierung solcher Liganden könnten damit auf dem Gebiet der Isolierung und Charakterisierung von Protein-Kinasen wesentliche Fortschritte erzielt werden.

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Verwendete Materialien

#### 6.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sind vom Reinheitsgrad puriss. p.a., p.a. oder molekularbiologische Reagenzien und werden von den folgenden Firmen bezogen:

[D <sub>6</sub> ]DMSO	ICN (Aurora, USA)
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP	ICN (Aurora, USA)
Aceton	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Acetonitril	Biosolve (Valkenswaard, Niederlande)
Ac-Lys-OMe	Bachem (Heidelberg)
Acrylamid/Bisacrylamid	AppliChem (Darmstadt)
$\beta$ -(4-Aminophenyl)-ethylamin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ammoniak	Messer-Griesheim (Krefeld)
Ammoniumchlorid	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Ammoniumhydrogencarbonat	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
APS	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Ara-Cytosin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Argon	Messer-Griesheim (Krefeld)
ATP	Fluka (Darmstadt)
ATP $\gamma$ S	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Boc-Aminosäuren	Novabiochem (Schwalbach)
Borsäure	Gerbu (Gaiberg)
Bromessigsäure	Fluka (Darmstadt)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
Calciumchlorid	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
CAPS	Roth (Karlsruhe)
Chloroform	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Coomassie Brilliant Blau R 250	Serva (Heidelberg)
Cy5-NHS-Ester	Amersham Biosciences (Freiburg)
Deuteriumoxid	ICN (Aurora, USA)
Diaminobutan	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Diaminohexan	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

---

DIC	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dichlormethan	Biosolve (Valkenswaard, Niederlande)
DIEA	Fluka (Darmstadt)
Diethylether	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Dikaliumhydrogenphosphat	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Dinatriumhydrogenphosphat	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Dioxan	Fluka (Darmstadt)
DMF	Biosolve (Valkenswaard, Niederlande)
DMSO	Fluka (Darmstadt)
DTE	Gerbu (Gaiberg)
DTT	Gerbu (Gaiberg)
EDC	Fluka (Darmstadt)
EDTA	Gerbu (Gaiberg)
EGTA	Serva (Heidelberg)
Essigsäure	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Ethandithiol	Fluka (Darmstadt)
Ethanol	Riedel de Hën (Seelze)
Ethanolamin	Fluka (Darmstadt)
Ethylendiamin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
FITC	Fluka (Darmstadt)
Fmoc-Ala-Wang-Harz	Novabiochem (Schwalbach)
Fmoc-Aminosäuren	Novabiochem (Schwalbach)
Formaldehyd	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Glycerin	Gerbu (Gaiberg)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
HBTU	Novabiochem (Schwalbach)
Hepes	Gerbu (Gaiberg)
Hydrazinhydrat	Fluka (Darmstadt)
Isobuttersäure	Fluka (Darmstadt)
Isopropanol	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Kaliumacetat	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Kaliumdihydrogenphosphat	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Kaliumhydroxid	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Kieselgel	Fluka (Darmstadt)
Leupeptin	Roche (Mannheim)
LMW-Standard	Amersham Biosciences (Freiburg)

---

Magnesiumchlorid	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Mes	Gerbu (Gaiberg)
Methanol	AppliChem (Darmstadt)
Natriumacetat	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Natriumazid	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Natriumchlorid	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Natriumhydrogencarbonat	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Natriumhydroxid	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Natriumvanadat	Merck (Darmstadt)
NGS	GIBCO BRL (Eggenstein)
Ninhydrin	Fluka (Darmstadt)
NP 40 (IGEPAL CA-630)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
N-Propyl-gallat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Pepstatin	Boehringer (Mannheim)
Phenol	Roth (Karlsruhe)
Phenylmethylsulfonylfluorid	Gerbu (Gaiberg)
Phenylephrin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Piperidin	Fluka (Darmstadt)
Pipes	Fluka (Darmstadt)
Ponceau-Rot	Serva (Heidelberg)
Salzsäure	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
SDS	Gerbu (Gaiberg)
Silikonpaste	Bayer AG (Leverkusen)
Stickstoff	Messer-Griesheim (Krefeld)
TEMED	Gerbu (Gaiberg)
TFA	Biosolve (Valkenswaard, Niederlande)
Thioanisol	Fluka (Darmstadt)
Triethanolamin	Fluka (Darmstadt)
Triethylamin	Fluka (Darmstadt)
Trifluoressigsäuremethylester	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Tris	Roth (Karlsruhe)
TRITC	Fluka (Darmstadt)
TRITC-Phalloidin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Triton X-100	Serva (Heidelberg)
Tween 20	Serva (Heidelberg)
Wässrige Ammoniaklösung	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)

Wässrige Iodwasserstofflösung	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Fluka (Darmstadt)

### 6.1.2 Proteine und Peptide

[V6, A7]-Kemptide-Peptid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
BSA	Merck (Darmstadt)
c-C1C2-Fragment	Mathias Grün (MPI, Dortmund)
humane kardiale MLCK	Andrei Iakovenko (MPI, Dortmund)
humane kardiale rMLC	Elena Rostkova (MPI, Dortmund)
N-Fmoc-[K5, V6, A7]-CONH <sub>2</sub> - Kemptide-Peptid	ThermoHybaid (Ulm)
PKA-C	eigene Präparation
Rattenschwanz-Kollagenase	Mathias Gautel (King's College, London)
Streptolysin-O	Difco (Detroit, USA)

### 6.1.3 Antikörper

$\alpha$ -cMLCK-N (aus Kaninchen)	Mathias Gautel (King's College, London)
$\alpha$ -Kaninchen (aus Schwein) HRP	DAKO (Glostrup, Dänemark)
$\alpha$ -Kaninchen (aus Ziege) Alexa 546	Molecular Probes (Eugene, USA)
$\alpha$ -Histag (aus Maus)	Oncogene (Darmstadt)
$\alpha$ -Maus (aus Ziege) Alexa 546	Molecular Probes (Eugene, USA)
$\alpha$ -Maus (aus Ziege) HRP	DAKO (Glostrup, Dänemark)
$\alpha$ -PKA-C (aus Kaninchen)	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
$\alpha$ -Titin-T12 (aus Maus)	Mathias Gautel (King's College, London)

### 6.1.4 Zelllinien und Primärzellen

Fibroblasten aus Mäuseembryonen	Daniel Soong (King's College, London)
H9C2-Zellen	ATCC (Manassas, USA)
HeLa-Zellen	ATCC (Manassas, USA)
Herzmuskelzellen aus neonatalen Ratten	eigene Präparation

### 6.1.5 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

DMEM	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
M199	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trypsin/EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
FCS	GIBCO BRL (Eggenstein)
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

### 6.1.6 Allgemeine Geräte

Analysenwaage Sartorius Basic	Sartorius (Göttingen)
Blot-Apparatur Semi-Phor TE 70	Hoefler (San Francisco, USA)
Gelkammer Mini-Protean 2	BioRad (München)
Gelkammer Novex XCell II	Invitrogen (Karlsruhe)
Geltrockner Modell 583	BioRad (München)
Heizblock Dri-Block DB2A	Techne (Cambridge, UK)
Inkubator US Autoflow	Nuaire (Plymouth, USA)
Lyophile Alpha I-5	Christ (Osterode)
Netzgerät EPS 301	Amersham Biosciences (Freiburg)
Netzgerät LKB ECPS 3000/150	Amersham Biosciences (Freiburg)
Netzgerät Power-Pac 300	BioRad (München)
Netzgerät Power-Pac 3000	BioRad (München)
pH-Meter 761 Calimatic	Knick (Berlin)
Rotationsverdampfer RE 111 mit Wasserbad 461	Büchi (Flawil, Schweiz)
Schmelzpunktbestimmungs- apparatur Electrothermal	Hersteller nicht bekannt
Sterilbank	Nuaire (Plymouth, USA)
Tischzentrifugen 5415 D und 5810 R	Eppendorf (Köln)
Ultraschallbad Sonorex Super RK103H	Bandelin (Berlin)
Ultrazentrifuge Optima L-70 K mit Rotor 50 TI	Beckman (München)
Vakuumpumpen MD 4C und PC 200N Vario	Vacuubrand (Wertheim)
Vortexer Reax 2000	Heidolph (Kelheim)
Waage Mettler P 1200	Mettler (Gießen)
Wasserentsalzungssystem Millipore	Millipore (Eschborn)

## 6.2 Spektroskopische und spektrometrische Methoden

### 6.2.1 NMR-Spektroskopie

Alle  $^1\text{H}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren werden mit dem AVANCE DRX<sub>500</sub>-Spektrometer der Firma Bruker (Karlsruhe) bei 500 MHz in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$  oder  $\text{D}_2\text{O}$  bei Raumtemperatur aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  werden in ppm, bezogen auf TMS ( $\delta = 0$ ) für  $^1\text{H}$ -Spektren und Phosphorsäure ( $\delta = 0$ ) für  $^{31}\text{P}$ -Spektren, angegeben. Die Kalibrierung der Spektren erfolgt anhand des Signals des jeweiligen Lösungsmittels (Hesse *et al.*, 1991). Um die Zuordnung der Signale zu erleichtern, werden die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren  $^1\text{H}$ -entkoppelt. Zur Beschreibung der Multiplizitäten der Signale werden die folgenden Abkürzungen verwendet: s (Singulett), br (breit), d (Dublett), dd (Dublett von Dubletts), t (Triplet), q (Quartett) und m (Multiplet).

### 6.2.2 Massenspektrometrie

Für die Aufnahmen der Massenspektren wird ein LCQ Massenspektrometer der Firma Finnigan MAT (Bremen) verwendet. Vor der jeweiligen Messung werden die Proben zentrifugiert oder mikrofiltriert. Die Messungen erfolgen sowohl im positiven als auch im negativen Ionenmodus. Den einzelnen Signalen wird dabei die relative Intensität in % im Vergleich zum Hauptsignal zugefügt.

### 6.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Nukleotiden, Bisubstrat-Inhibitoren und den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Verbindungen werden mit den UV-VIS-Spektralphotometern Cary 3E der Firma Varian (Darmstadt) und DU 650 der Firma Beckman (München) bestimmt und mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet. Dabei wird, mit Ausnahme von APhEA-ATP, für nichtfluoreszierende ATP-Analoga und Bisubstrat-Inhibitoren der Extinktionskoeffizient von ATP ( $\epsilon_{259\text{nm}} = 15.4 \cdot 10^3 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) verwendet. Der Extinktionskoeffizient von APhEA-ATP wird zu  $\epsilon_{259\text{nm}} = 16.3 \cdot 10^3 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  bestimmt. Bei den fluoreszenzmarkierten Verbindungen wurden die Extinktionskoeffizienten des jeweiligen Fluorophors verwendet: Cy5 ( $\epsilon_{646\text{nm}} = 250.0 \cdot 10^3 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ), Tetramethylrhodamin ( $\epsilon_{555\text{nm}} = 65.0 \cdot 10^3 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) und Fluorescein ( $\epsilon_{494\text{nm}} = 68.0 \cdot 10^3 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ).

## 6.3 Chromatographische Methoden

### 6.3.1 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wird mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (d = 0.2 mm) Aluminiumfolien der Firma Fluka (Darmstadt) durchgeführt. Der Nachweis der Substanzflecken erfolgt unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm.

### 6.3.2 Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie erfolgt mit Kieselgel 60 (230-400 Mesh, Partikelgröße 0.040-0.063 mm) der Firma Merck (Darmstadt). Für die Auftrennung einer bestimmten Substanzmenge wird etwa die 50-100fache Menge an Kieselgel verwendet.

### 6.3.3 Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)

Die RP-HPLC erfolgt mit dem System Gold der Firma Beckman (München). Die Anlage besteht aus einem programmierbaren Lösungsmittelmodul 125 (Pumpensystem) und einem Dioden-Array-Detektormodul 168 (UV-Detektor). Für die Reaktionskontrollen und Reinigungen werden die Säulen C-18 Prontosil AQ (5  $\mu$ M, 120 Å, 4.6 x 250 mm und 8.0 x 250 mm) der Firma Bischoff (Leonberg) und SP 250/10 Nucleosil 300-7 C 8 der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Die Flussraten betragen 1.5-2.5 ml/min. Die jeweiligen Proben werden in Startpuffer aufgenommen und vor dem Auftragen auf die Säule mikrofiltriert. Die HPLC-Pufferlösungen werden vor Gebrauch filtriert und anschließend 15 min im Ultraschallbad entgast. Es werden die folgenden Puffersysteme und Gradienten benutzt:

System 1	Puffer A: 100 mM TEAAc, pH 7.0 Puffer B: 100 mM TEAAc, pH 7.0, 70 % CH <sub>3</sub> CN
System 2	Puffer A: 100 mM TEAHCO <sub>3</sub> , pH 7.5 Puffer B: 70 % CH <sub>3</sub> CN
System 3	Puffer A: H <sub>2</sub> O + 0.1 % TFA Puffer B: CH <sub>3</sub> CN + 0.08 % TFA

System 4	Puffer A: 100 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6.5 Puffer B: 100 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6.5 50 % CH <sub>3</sub> CN
Gradient 1	7.5 % Puffer B isokratisch
Gradient 2	0-100 % Puffer B (0-20 min), 100 % Puffer B (20-30 min), 100-0 % Puffer B (30-32 min)
Gradient 2b	0-100 % Puffer B (0-40 min), 100 % Puffer B (40-50 min), 100-0 % Puffer B (50-52 min)
Gradient 3	0-75 % Puffer B (0-30 min), 75-100 % Puffer B (30-35 min), 100 % Puffer B (35-40 min), 100-0 % Puffer B (40-42 min)
Gradient 4	2.5 % Puffer B (0-5 min), 2.5-65 % Puffer B (5-35 min), 65-75 % Puffer B (35-37 min), 75 % Puffer B (37-43 min), 2.5 % Puffer B (43-45 min)
Gradient 5	2.5 % Puffer B (0-5 min), 2.5-65 % Puffer B (5-65 min), 65-75 % Puffer B (65-67 min), 75 % Puffer B (67-73 min), 2.5 % Puffer B (73-75 min)

### 6.3.4 Anionenaustauscher-Chromatographie

Die Anionenaustauscher-Chromatographie der ATP-Analoga erfolgt mit dem High-Load-System LKB GP-10 der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) mit Pumpe P-50, UV-M-2 Detektor, Konduktivitätsmonitor, Rec-102-Schreiber und Fraktionsammler SuperFrac. Für die Reinigungen werden Säulen (Eigenbau, MPI Dortmund) mit 10-150 ml Q Sepharose Fast Flow der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) verwendet. Die Flussraten betragen 2-5 ml/min. Die Anionenaustauscher-Chromatographie der fluoreszenzmarkierten Bisubstrat-Inhibitoren erfolgt mit dem System Gold der Firma Beckman (München). Für die Reinigungen wird die Säule POROS HQ 20 der Firma Perseptive Biosystems (Weiterstadt) verwendet. Die Flussrate beträgt 2 ml/min. Es werden die folgenden Puffersysteme und Gradienten benutzt:

ATP-Analoga (High-Load-System):

System 5	Puffer A: 5 mM TEAHCO <sub>3</sub> , pH 7.5 Puffer B: 1 M TEAHCO <sub>3</sub> , pH 7.5
Gradient 6	0-50 % Puffer B (1500 ml), 50-100 % Puffer B (300 ml), 100 % Puffer B (300 ml)

Bisubstrat-Inhibitoren (System Gold):

System 6	Puffer A: H <sub>2</sub> O Puffer B: 1 M TEAHCO <sub>3</sub> , pH 7.8
Gradient 7	2.5 % Puffer B (0-10 min), 2.5-50 % Puffer B (10-40 min), 50-100 % Puffer B (40-42 min), 100 % Puffer B (42-47 min), 100-2.5 % Puffer B (47-49 min), 2.5 % Puffer B (49-54 min)
Gradient 8	2.5 % Puffer B (0-20 min), 2.5-50 % Puffer B (20-50 min), 50-100 % Puffer B (50-52 min), 100 % Puffer B (52-57 min), 100-2.5 % Puffer B (57-59 min), 2.5 % Puffer B (59-64 min)

### 6.3.5 Affinitätschromatographie

Die analytische Affinitätschromatographie von skmMLCK und Zelllysaten erfolgt mit einer Gelmatrix aus NHS-aktivierter Sepharose 4 Fast Flow der Firma Amersham Biosciences (Freiburg), an die das jeweilige Substrat gekoppelt wird. Zur Herstellung der Mikro-Affinitätssäulen werden 20-250 µl Gelmatrix (10 µmol freie NHS-Gruppen/ml Gel) mit 5 Volumen eiskalter HCL (1mM) und 5 Volumen Kopplungspuffer gewaschen. Die zu koppelnde Substanz (zweifacher molarer Überschuss bezogen auf die Anzahl freier NHS-Gruppen der Matrix), gelöst in 1 Volumen Kopplungspuffer, wird zu der Matrix gegeben und unter leichtem Schwenken 4 h bei RT inkubiert. Anschließend wird mit 3 Volumen Kopplungspuffer gewaschen und freie NHS-Gruppen 1 h mit 1 M Tris, pH 8.0 geblockt. Dann wird im Wechsel je fünfmal mit 2 Volumen Wasch-Puffer (pH 8.0) und Wasch-Puffer (pH 5.0) gewaschen und dieser Waschzyklus insgesamt dreimal wiederholt. Die fertige Affinitätsmatrix wird dann mit 20 % Ethanol gewaschen und darin bei 4 °C aufbewahrt. Vor Gebrauch der Affinitätsmatrix wird diese noch fünfmal mit je 3 Volumen Lyse-Puffer gewaschen, die Matrix anschließend mit 2 Volumen des skmMLCK-Lysat-Gemisches beladen und 15 min unter leichtem Schwenken bei RT inkubiert. Danach wird zehnmal mit je 3 Volumen Lyse-Puffer (+ 0.05 % Tween 20) gewaschen. Die Elution der Affinitätssäule erfolgt dann mit steigender Salzkonzentration bzw. mit Mg-ATP nach dem folgenden Schema (je 30 µl Puffer pro Elutionsschritt):

- 1.) ohne NaCl
- 2.) 200 mM NaCl
- 3.) 400 mM NaCl
- 4.) 600 mM NaCl
- 5.) 10 mM ATP/20 mM MgCl<sub>2</sub>
- 6.) 10 mM ATP/20 mM MgCl<sub>2</sub>

- 7.) 10 mM ATP/20 mM MgCl<sub>2</sub>
- 8.) SDS-Probenpuffer (50 µl)

Kopplungspuffer:	100 mM Natriumborat, pH 8.0 250 mM NaCl
Wasch-Puffer (pH 8.0):	100 mM Tris, pH 8.0 500 mM NaCl
Wasch-Puffer (pH 5.0):	100 mM Natriumacetat, pH 5.0 500 mM NaCl
Lyse-Puffer:	20 mM Hepes, pH 7.0 2 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EGTA 2 mM DTT 1 mM Natriumvanadat 1 mM PMSF 5 µM Pepstatin 20 µM Leupetin

## 6.4 Proteinchemische Methoden

### 6.4.1 SDS-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteingemischen durch Elektrophorese erfolgt nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Das Trenngel besteht aus 15 % Acrylamid, 0.4 % Bisacrylamid, 0.1 % (w/v) SDS und 375 mM Tris, pH = 8.8. Die Polymerisation wird durch Zugabe von 14 µmol/ml TEMED und 0.5 mg/ml APS gestartet, die Lösung in eine Gelkammer gegossen und mit Isopropanol/Wasser 1:1 überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation wird das Isopropanol/Wasser-Gemisch abgegossen, das Trenngel mit einem Sammelgel aus 5 % Acrylamid, 0.13 % Bisacrylamid, 0.1 % (w/v) SDS, 125 mM Tris, pH = 6.8, 14 µmol/ml TEMED und 0.5 mg/ml APS überschichtet und in Gegenwart eines Gelkammes geeigneter Größe polymerisiert. Die Proteinlösungen, Zellysate und Zellpellets werden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min auf 95 °C erhitzt. Danach werden zwischen 10 und 20 µl der Proben auf das Gel aufgetragen. Der verwendete Protein-Molekulargewichtsmarker (LMW-Standard) stammt von Amersham Biosciences (Freiburg) und setzt sich aus den Proteinen Phosphorylase b (97 kD), Albumin (67 kD), Ovalbumin (43 kD), Carboanhydrase (30 kD), Trypsininhibitor (20.1 kD)

und Lysozym (14.4 kD) zusammen. Die Elektrophorese erfolgt bei 50 mA in SDS-Laufpuffer. Die mit dem Gel aufgetrennten Proteine werden mit einer Coomassie-Blau-Lösung angefärbt. Anschließend wird der nicht an die Proteine gebundene Farbstoff durch Schütteln in einer Entfärbelösung entfernt. Die Gele werden anschließend auf Whatman-Papier gelegt und mit einem Gelrockner im Vakuum getrocknet.

SDS-Probenpuffer:	50 mM Tris, pH = 8.9 100 mM DTE 2 % (w/v) SDS 0.25 % (w/v) Bromphenolblau 10 % Glycerin
SDS-Laufpuffer:	25 mM Tris, pH = 8.3 192 mM Glycin 0.1 % (w/v) SDS
CooMaßie-Lösung:	0.25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R 250 45 % Ethanol 10 % Essigsäure
Entfärbelösung:	5 % Ethanol 10 % Essigsäure

#### 6.4.2 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten aus neonatalen und adulten Rattenherzen sowie adulten Kaninchenherzen wird die jeweilige gefrorene Gewebeprobe in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill pulverisiert. 300 mg pulverisiertes Material werden anschließend in 5 ml Lyse-Puffer aufgenommen und 4 min bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Danach wird das Lysat in einer Ultrazentrifuge der Firma Beckman (München) mit Rotor TI 50 für 30 min bei 90000 x g zentrifugiert, der Lyse-Überstand abgenommen und nochmals filtriert. Das Zellpellet wird nach dem gleichen Verfahren nochmals mit 5 ml Hochsalz-Puffer (Lyse-Puffer + 500 mM NaCl) und 5 ml Hochsalz/Detergenz-Puffer (Lyse-Puffer + 500 mM NaCl, + 0.05 % Triton X-100) extrahiert. Die erhaltenen Lysate werden dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C gelagert.

Lyse-Puffer:	20 mM Hepes, pH 7.0 2 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EGTA 2 mM DTT
--------------	--

1 mM Natriumvanadat  
 1 mM PMSF  
 5  $\mu$ M Pepstatin  
 20  $\mu$ M Leupetin

### 6.4.3 Permeabilisierung von Zellen mit Streptolysin-O und Transfektion fluoreszenzmarkierter Analoga

Streptolysin-O (SLO) ist ein Cholesterol-bindendes Toxin, mit dem Membranen von Zellen permeabilisiert werden können. Direkt vor Gebrauch wird Streptolysin-O in einer Konzentration von 0.2-0.5 U/ml in SLO/DTT-Puffer gelöst und für 15 min auf Eis aktiviert. Die zu permeabilisierenden Zellen werden zweimal mit eiskaltem PBS und einmal mit eiskaltem SLO-Puffer gewaschen. Nach Inkubation der Zellen für weitere 10 min in SLO-Puffer auf Eis werden diese noch zweimal mit SLO/DTT-Puffer gewaschen. Die Transfektion der Zellen erfolgt in SLO/DTT-Puffer in Gegenwart von 0-50  $\mu$ M der zu transfizierenden Fluorescein-markierten Analoga für 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Anschließend werden die Zellen mit PBS gewaschen, in Kulturmedium (+ Serum, + Antibiotika) aufgenommen und für weitere 30-60 min in den Inkubator gestellt. Danach werden die Zellen entweder direkt mikroskopiert oder fixiert.

SLO-Puffer:	25 mM Hepes, pH 7.4 115 mM KOAc 2.5 mM MgCl <sub>2</sub>
SLO/DTT-Puffer:	SLO-Puffer + 1mM DTT
PBS:	137 mM NaCl 2.68 mM KCl 10.1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /0.76 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7.4

### 6.4.4 Phosphorylierungsexperimente mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP

Um die Inhibition der Protein-Kinasen durch die synthetisierten ATP- und Bisubstrat-Analoga zu untersuchen werden Verdrängungsexperimente mit radioaktiv markiertem [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP durchgeführt. Betrachtet wird die Phosphorylierung natürlicher Peptid- bzw. Protein-Substrate durch die jeweilige Protein-Kinase. Aus der beobachteten Verdrängung von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP durch die nicht radioaktiv markierten Substrate kann dabei die Inhibition der Phosphorylierungsreaktion qualitativ abgeschätzt werden. Das verwendete [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP hat eine spezifische Aktivität von 3000 Ci/mmol und 10 mCi/ml.

#### 6.4.4.1 Verdrängungsexperimente mit PKA-C

Die Phosphorylierungsansätze (20 µl Gesamtvolumen) enthalten je 4 µg des c-C1C2-Fragments, 17 nM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP und 0-1500 µM der nicht radioaktiv markierten Substanzen in Phosphorylierungspuffer. Nach Zugabe von 200-400 ng PKA-C (die Konzentration des Enzyms wird aus einem SDS-Gel durch Vergleich mit einem BSA-Standard abgeschätzt) werden die Reaktionsansätze 30 min bei 37 °C inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von je 10 µl SDS-Probenpuffer gestoppt und die Proben anschließend 5 min bei 95 °C erhitzt. Nach Gelelektrophorese wird mit Hilfe des Molecular Imager System GS-525 der Firma BioRad (München) ein Autoradiogramm der Gele aufgenommen und entwickelt.

Phosphorylierungspuffer: 20 mM Hepes, pH 7.0  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM DTT

#### 6.4.4.2 Verdrängungsexperimente mit skmMLCK

Die Phosphorylierungsansätze (20 µl Gesamtvolumen) enthalten je 4 µg der rMLC, 17 nM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP und 0-1500 µM der nicht radioaktiv markierten Substanzen in Phosphorylierungspuffer. Nach Zugabe von 0.28-2.8 µg skmMLCK werden die Reaktionsansätze 30 min bei 37 °C inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von je 10 µl SDS-Probenpuffer gestoppt und die Proben anschließend 5 min bei 95 °C erhitzt. Nach Gelelektrophorese wird mit Hilfe des Image Readers FLA-5000 der Firma Fuji (Elmsford) ein Autoradiogramm der Gele aufgenommen und mit der AIDA Image Analyzer Software (V. 3.22) der Firma Raytest (Straubenhardt) ausgewertet.

Phosphorylierungspuffer: 20 mM Hepes, pH 7.0  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM DTT  
0.1 % (w/v) BSA  
0.05 % Tween 20

#### 6.4.4.3 Kinetische Untersuchungen an skmMLCK

Die Phosphorylierungsansätze (25 µl Gesamtvolumen) für die kinetischen Untersuchungen enthalten je 50 µM ATP, 50 µM CaCl<sub>2</sub>, 2 µg CaM und 13 nM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP in Phosphorylierungspuffer. Die Substratkonzentrationen an rMLC betragen 0, 1, 2, 5, 10, 20 und 50 µM bei jeweils konstanter Inhibitorkonzentration von 0, 0.5, 1, 5 oder 10 µM. Nach Zugabe von 112 ng skmMLCK werden die Reaktionsansätze 5 min bei 30 °C

inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von je 15 µl SDS-Probenpuffer gestoppt und die Proben anschließend 1 min bei 95 °C erhitzt. Nach Gelelektrophorese wird mit Hilfe des Image Readers FLA-5000 der Firma Fuji (Elmsford) ein Autoradiogramm der Gele aufgenommen und mit der AIDA Image Analyzer Software (V. 3.22) der Firma Raytest (Straubenhardt) ausgewertet. Die Auswertung der kinetischen Daten erfolgt anschließend mit dem Programm GraFit 3.0 der Firma Erithracus Software Ltd. (Horley, UK).

Phosphorylierungspuffer:    20 mM Hepes, pH 7.0  
                                      5 mM MgCl<sub>2</sub>  
                                      1 mM DTT  
                                      0.1% (w/v) BSA  
                                      0.05 % Tween 20

## 6.5 Immunologische Methoden

### 6.5.1 Western-Blot

Mit Hilfe des Western-Blots können Proteine spezifisch durch einen Antikörper identifiziert werden. Die jeweiligen Proteine und Proteinmischungen werden nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit der Blot-Apparatur Semi-Phor TE 70 der Firma Hoefer (San Francisco, USA) auf eine Protran Nitrozellulose-Membran der Firma Schleicher & Schuell (Dassel) elektrotransferiert. Nach dem Transfer wird die Membran zur Kontrolle mit Ponceau-Rot gefärbt, die Markerbanden mit Bleistift markiert und der Farbstoff anschließend mit Wasser abgewaschen. Um freie Bindungsstellen an der Membran abzusättigen wird diese 45 min bei RT mit 2 % (w/v) BSA in PBS behandelt. Die Reaktion mit dem primären Antikörper erfolgt in 1 % (w/v) BSA in PBST (Verdünnung 1:500 - 1:1000) für 1 h bei RT unter leichtem Schwenken. Nach dreimaligem Waschen mit PBST für je 5 min wird die Reaktion mit dem sekundären Antikörper (HRP (*horse-radish peroxidase*)-Konjugate, Verdünnung 1:2000 - 1:3000) in gleicher Weise durchgeführt. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBST für je 5 min wird die Membran mit Wasser gewaschen und auf Papier angetrocknet. Die Detektion erfolgt dann mit dem ECL-Kit der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) durch Auflegen von Röntgenfilmen. Diese werden nach Bedarf zwischen 30 s und 30 min exponiert.

PBS:                                137 mM NaCl  
                                      2.68 mM KCl  
                                      10.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 0.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4

---

PBST:	PBS + 0.05 % Tween 20
Blot-Puffer:	100 mM CAPS, pH 11.0 10 % Methanol

## 6.5.2 Immunanfärbungen

Für Immunanfärbungen werden die Zellen fixiert und mit primären Antikörpern gegen die gewünschten Epitope inkubiert. Die Detektion erfolgt mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern. Die mikroskopischen Aufnahmen für die Immunanfärbungen werden an einem Lichtmikroskop Axiophot mit Kamera AxioCam der Firma Zeiss (Oberkochen) durchgeführt. Die Bearbeitung aller mikroskopischen Aufnahmen erfolgt mit dem Programm Adobe Photoshop der Firma Adobe Systems (San Jose, USA).

### 6.5.2.1 Immunanfärbung von HeLa-Zellen

Die Zellen werden mit PBS gewaschen und dann mit einer Lösung von 2 % (w/v) Paraformaldehyd/0.1 % (w/v) Glutaraldehyd in PBS für 10 min fixiert. Nach Entfernen der Lösung wird der Fixiervorgang durch Behandeln mit 100 mM Glycin in PBS für 20 min gestoppt. Es wird mit PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch Behandeln mit 5 % NGS, 1 % (w/v) BSA in PBS + 1 mM  $\text{NaN}_3$  für 20-30 min geblockt. Nach Waschen mit PBS erfolgt die Reaktion mit dem primären Antikörper  $\alpha$ -PKA-C (aus Kaninchen) für 1 h bei RT (Verdünnung 1:100 in 1% (w/v) BSA in PBST + 1 mM  $\text{NaN}_3$ ). Es wird jeweils dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und anschließend erfolgt die Reaktion mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper  $\alpha$ -Kaninchen (aus Ziege) Alexa 546 für 30 min bei RT (Verdünnung 1:500 in 1% (w/v) BSA in PBST + 1 mM  $\text{NaN}_3$ ). Es wird wiederum jeweils dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und danach werden die Zellen in eine *anti-bleach* Lösung eingebettet, um ein Ausbleichen der Fluorophore während des Mikroskopierens zu vermindern.

<i>anti-bleach</i> Lösung:	20 mM Tris, pH 8.0 10 mg N-Propyl-gallat 60 % Glycerin (vor Gebrauch 1:10 in 50 % Glycerin in PBS verdünnen)
----------------------------	---

### 6.5.2.2 Immunanfärbung von Herzmuskelzellen aus neonatalen Ratten

Die Zellen werden mit PBS gewaschen und dann mit einer Lösung von 2 % (w/v) Paraformaldehyd/0.1 % (w/v) Glutaraldehyd in PBS für 10 min fixiert. Nach Entfernen der Lösung wird der Fixiervorgang durch Behandeln mit 100 mM Glycin in PBS für 20 min gestoppt. Es wird mit PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch Behandeln mit 5 % NGS, 1 % (w/v) BSA in PBS + 1 mM NaN<sub>3</sub> für 20-30 min geblockt. Nach Waschen mit PBS erfolgt die Reaktion mit den primären Antikörpern  $\alpha$ -PKA-C (aus Kaninchen) (Verdünnung 1:100 in 1% (w/v) BSA in PBST + 1 mM NaN<sub>3</sub>) bzw.  $\alpha$ -Titin-T12 (aus Maus) (direkt aus Serum oder Verdünnung 1:10 in 1% (w/v) BSA in PBST + 1 mM NaN<sub>3</sub>). Es wird jeweils dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und anschließend erfolgt die Reaktion mit den fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern  $\alpha$ -Kaninchen (aus Ziege) Alexa 546 bzw.  $\alpha$ -Maus (aus Ziege) Alexa 546 für 20 min bei RT (Verdünnung 1:500 in 1% (w/v) BSA in PBST + 1 mM NaN<sub>3</sub>). Es wird wiederum jeweils dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und danach werden die Zellen in eine *anti-bleach* Lösung eingebettet, um ein Ausbleichen der Fluorophore während des Mikroskopierens zu vermindern.

## 6.6 Mikroinjektionen in Fibroblasten

Die für die Mikroinjektionsversuche verwendeten Fibroblasten aus Mäuseembryonen werden von Daniel Soong (King's College, London) zur Verfügung gestellt. Die Fibroblasten werden 48 h vor Injektion in 3.5 cm Kulturschalen mit Glasboden passagiert und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die zu injizierenden Substanzen werden in Konzentrationen von 50-100  $\mu$ M in Injektionspuffer gelöst und danach 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die Konzentrationen der Cy5- und TRITC-markierten Dextrane wird nicht bestimmt. Nach Mikroinjektion werden die Zellen zur Regenerierung 30-60 min in den Inkubator gestellt und anschließend mikroskopiert. Die Mikroinjektionen erfolgen an einem Lichtmikroskop Eclipse TS 100 der Firma Nikon (Tokyo, Japan) mit der Mikroinjektionseinheit Femtojet/InjectMan NI2 der Firma Eppendorf (Hamburg). Die anschließenden mikroskopischen Aufnahmen werden an einem Lichtmikroskop Axiovert 100 der Firma Zeiss (Oberkochen) mit einer Digitalkamera ORCA-FR (4742-95) der Firma Hamamatsu (Hamamatsu, Japan) aufgenommen. Die Bearbeitung aller mikroskopischen Aufnahmen erfolgt mit dem Programm Adobe Photoshop der Firma Adobe Systems (San Jose, USA).

Injektionspuffer: 2 mM Tris/Acetat, pH 7.1

## 6.7 Kolokalisationsexperimente in H9C2-Zellen

Die Kolokalisationsexperimente werden mit Triton X-100-permeabilisierten H9C2-Zellen durchgeführt. Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen und danach 5 min mit BRB 80-Puffer + 0.1 % Triton X-100, + TRITC-Phalloidin (Verdünnung 1:1000) behandelt. Anschließend wird mit BRB 80-Puffer gewaschen und die Zellen in BRB 80-Puffer + 0.1 % Triton X-100, + TRITC-Phalloidin (Verdünnung 1:1000) in Gegenwart von 0-5  $\mu\text{M}$  der Cy5-markierten Analoga für 5-15 min inkubiert. Danach werden die Zellen unter diesen Gleichgewichtsbedingungen ohne Fixierung direkt mikroskopiert. Dazu werden Plexiglasringe (Dicke: 1 mm; Außendurchmesser: 12 mm; Innendurchmesser: 10 mm) mit Silikonpaste auf Objektträgern befestigt, 50  $\mu\text{l}$  des Puffers mit der entsprechenden Konzentration der Cy5-markierten Analoga aufgetragen und die Deckgläschen mit den Zellen (in Richtung des Puffers) fest aufgelegt. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgen an einem konfokalen Lasermikroskop DM IRB mit Konfokal-Scanner TCS SP 2 der Firma Leica (Heidelberg). Die Bearbeitung aller mikroskopischen Aufnahmen erfolgt mit dem Programm Adobe Photoshop der Firma Adobe Systems (San Jose, USA).

BRB 80-Puffer:                    8 mM Pipes, pH 6.8  
                                      1 mM  $\text{MgCl}_2$   
                                      1 mM EGTA

## 6.8 Kultur von Zelllinien und Primärzellen

### 6.8.1 Präparation und Kultur von Herzmuskelzellen aus neonatalen Ratten

Die Präparation und Kultur von Herzmuskelzellen aus neonatalen Ratten erfolgt nach einem modifizierten Protokoll des *neonatal cardiomyocyte isolation system* der Firma Worthington (Lakewood, USA). Die für Kultur, Transfektionen und Immunanfärbungen verwendeten 3.5 cm Kulturschalen werden vorher mit Rattenschwanz-Kollagenase beschichtet und unter UV-Licht getrocknet.

### 6.8.2 Kultur von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen werden in 10 cm Kulturschalen in einem  $\text{CO}_2$ -begasteten Inkubator bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert. Als Kulturmedium dient DMEM (1000 mg Glucose pro Liter) + 10 % FCS, + 1 x Penicillin/Streptomycin. Die Zellen werden jeweils bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % kultiviert und danach passagiert. Zum Passagieren der Zellen werden diese

mit DMEM (ohne Serum und Antibiotika) gewaschen und danach durch Inkubation mit 2 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung für 2-3 min unter leichtem Schwenken vom Boden der Kulturschalen abgelöst. Die Zellen werden dann 1:4 bis 1:7 in DMEM + 10 % FCS, + 1 x Penicillin/Streptomycin verdünnt und wie vorher kultiviert. Für Transfektionen und Immunanfärbungen werden die HeLa-Zellen in 3.5 cm Kulturschalen passagiert und auf 12 mm Deckgläschen aus Glas (für die Mikroskopie) kultiviert.

### **6.8.3 Herstellen von HeLa-Stocks**

Um Zell-Stocks von HeLa-Zellen herzustellen werden die Zellen zweimal mit DMEM (ohne Serum und Antibiotika) gewaschen und danach durch Inkubation mit 1.5 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung für 2-3 min unter leichtem Schwenken vom Boden der Kulturschalen abgelöst. Die Zellen werden in 10 ml DMEM + 10 % FCS, + 1 x Penicillin/Streptomycin resuspendiert und in einem 15 ml Falcon-Gefäß für 2 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Medium wird vollständig abgesaugt, das Zellpellet in FCS + 7 % DMSO (1 ml pro Kulturschale) resuspendiert und in kleine Cryo-Gefäße überführt. Zum schonenden Einfrieren der Zell-Stocks werden diese nach 15 min Inkubation auf Eis in eine mit Papier ausgefüllte Styropor-Box überführt und für 2-3 Tage auf -80 °C heruntergekühlt. Die Lagerung erfolgt anschließend ebenfalls bei -80 °C.

### **6.8.4 Kultur von H9C2-Zellen**

H9C2-Zellen werden in 10 cm Kulturschalen in einem CO<sub>2</sub>-begasteten Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Kulturmedium dient DMEM (4500 mg Glucose pro Liter) + 10 % FCS, + 1 x Penicillin/Streptomycin. Die Zellen werden jeweils bis zu einer Konfluenz von ca. 40 % kultiviert und danach passagiert. Zum Passagieren der Zellen werden diese mit DMEM (ohne Serum und Antibiotika) gewaschen und danach durch Inkubation mit 2 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung für 2-3 min im Inkubator vom Boden der Kulturschalen abgelöst. Die Zellen werden dann 1:3 bis 1:5 in DMEM + 10 % FCS, + 1 x Penicillin/Streptomycin verdünnt und wie vorher kultiviert. Für Immunanfärbungen und Kollokalisationsexperimente werden die H9C2-Zellen in 3.5 cm Kulturschalen passagiert und auf 12 mm Deckgläschen aus Glas (für die Mikroskopie) bis zu einer Konfluenz von 100 % kultiviert. Die Differenzierung der Zellen erfolgt dann für 7 bis 10 Tage, wobei alle 2-3 Tage das Medium erneuert wird.

## 6.9 Chemische Methoden

### 6.9.1 Synthese von P<sup>3</sup>-(N<sup>ε</sup>-(N-acyl-O-methyl)-lysyl)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat 1

55.1 mg ATP (0.1 mmol) und 190 mg EDC (1 mmol) werden in 2 ml 100 mM Triethanolamin, pH 8.0 gelöst und 10 min bei 50 °C gerührt. Danach werden 119.5 mg Ac-Lys-OMe (0.5 mmol) zugegeben und die Lösung 1 h bei 50 °C weiter gerührt (HPLC-Reaktionskontrolle). Anschließend wird die Lösung am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wird in 200 ml 5 mM TEAHCO<sub>3</sub>, pH 7.5 aufgenommen, die Lösung auf pH 7.5 eingestellt und mit Anionenaustauscher-Chromatographie gereinigt. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und dreimal mit je 5 ml Methanol koevaporiert. Der Rückstand wird in 500 µl Wasser aufgenommen und die Ausbeute photometrisch bestimmt.

Ausbeute: 44 µmol = 44 %

MS (ESI): 690.1 [M-H]<sup>-</sup> (MW 691.4)

<sup>1</sup>H-NMR: (D<sub>2</sub>O, 500 MHz): δ = 1.31 (t, 27H, CH<sub>3</sub>, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>-Gegenion); 1.44 (m, 2H), 1.64 (m, 2H), 1.72 (m, 2H), (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 1.97 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>); 2.93 (s, br, 2H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 3.23 (q, 18H, CH<sub>2</sub>, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>-Gegenion); 3.76 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>); 4.25 (m, 2H, 5'-H); 4.43 (m, 1H, 4'-H); 4.60 (m, 1H, 3'-H); 4.78 (m, 1H, 2'-H); 6.18 (d, 1H, 1'-H); 8.31/8.60 (2s, 2H, 2/8-H)

<sup>31</sup>P-NMR: (D<sub>2</sub>O, 500 MHz): δ = - 0.24 (d, γ-Phosphat); - 10.23 (d, α-Phosphat); - 21.80 (m, β-Phosphat)

Anionenaustauscher-Chromatographie-Bedingungen:

Säule: 50 ml Q-Sepharose Fast Flow

Flussrate: 5 ml/min

Puffer: System 5

Gradient: Gradient 6

Detektion: 259 nm

HPLC-Bedingungen:

Reaktionskontrolle

Säule: C-18 Prontosil AQ (5 µM, 120 Å, 4.6 x 250 mm)

Flussrate: 1.5 ml/min

Puffer: System 1

Gradient: Gradient 1

Detektion: 259 nm  
 Retentionszeit: 9.3 min

### 6.9.2 Synthese von P<sup>3</sup>-(N<sup>ε</sup>-([K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide)-lysyl)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **6**

11.0 mg ATP (20 μmol) und 38.0 mg EDC (200 μmol) werden in 1 ml 100 mM Triethanolamin, pH 8.0 gelöst und 15 min bei 50 °C gerührt. Danach werden 10 mg N-Fmoc-[K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide **4** (9.7 μmol) gelöst in 1 ml DMSO zugegeben und die Lösung 3 h bei 50 °C weiter gerührt (HPLC-Reaktionskontrolle). Anschließend wird der Reaktionsansatz portionsweise mit HPLC gereinigt und über Nacht lyophilisiert. Zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe wird das Lyophilisat in 600 μl 20 % Piperidin aufgenommen und 30 min bei RT gerührt (HPLC-Reaktionskontrolle). Der entstandene Niederschlag wird in 200 μl DMSO gelöst und mit HPLC gereinigt. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und über Nacht lyophilisiert.

Ausbeute: nicht bestimmt  
 MS (ESI): 1301.5 [M+H]<sup>+</sup> (MW 1300.2) **6**  
 1523.5 [M+H]<sup>+</sup> (MW 1523.4) **5**

HPLC-Bedingungen:

#### Reaktionskontrolle

Säule: C-18 Prontosil AQ (5 μM, 120 Å, 4.6 x 250 mm)  
 Flussrate: 1.5 ml/min  
 Puffer: System 2  
 Gradient: Gradient 2  
 Detektion: 259 nm  
 Retentionszeit: 9.8 min **6**  
 16.0 min **5**

#### Reinigung

Säule: C-18 Prontosil AQ (5 μM, 120 Å, 8.0 x 250 mm)  
 Flussrate: 2.5 ml/min  
 Puffer: System 2  
 Gradient: Gradient 2  
 Detektion: 259 nm  
 Retentionszeit: 10.0 min **6**  
 15.8 min **5**

### 6.9.3 Synthese von P<sup>3</sup>-(N<sup>ε</sup>-(N-FITC-[K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide)-lysyl)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat 2 und P<sup>3</sup>-(N<sup>ε</sup>-(N-TRITC-[K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide)-lysyl)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat 3

1 Moläquivalent P<sup>3</sup>-(N<sup>ε</sup>-([K5, V6, A7]-CONH<sub>2</sub>-Kemptide)-lysyl)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **6** wird in 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.5 gelöst, 2-3 Moläquivalente FITC bzw. TRITC gelöst in DMSO (1/10 des verwendeten Puffer-Volumens) hinzugegeben und die Lösung 3 h bei RT gerührt (HPLC-Reaktionskontrolle). Danach wird der Reaktionsansatz portionsweise mit HPLC gereinigt. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert.

Ausbeuten: nicht bestimmt

MS (ESI): 1690.5 [M+H]<sup>+</sup> (MW 1690.6) **2**

1713.6 [M+H]<sup>+</sup> (MW 1713.6) **3**

HPLC-Bedingungen:

#### Reaktionskontrolle und Reinigung

Säule: C-18 ProntoSIL AQ (5 μM, 120 Å, 8.0 x 250 mm)

Flussrate: 2.5 ml/min

Puffer: System 2

Gradient: Gradient 2b

Detektion: 259 nm und 494 nm (FITC) bzw. 555 nm (TRITC)

Retentionszeit: 17.3 min **2**

22.8 min **3**

### 6.9.4 P<sup>3</sup>-(Aminohexyl-amino)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat 9

1.162 g Diaminohexan (10 mmol) werden in 2 ml Wasser gelöst, der pH-Wert mit konz. HCl auf 8.2 eingestellt und die Lösung auf 5 ml mit Wasser aufgefüllt. 110.0 mg ATP (0.2 mmol) und 382.0 mg EDC (2 mmol) werden in 10 ml 100 mM Triethanolamin, pH 8.0 gelöst und 15 min bei 50 °C gerührt. Danach wird die wässrige Lösung des Diaminohexans zugegeben und die Lösung 4 h bei 50 °C weiter gerührt (HPLC-Reaktionskontrolle). Der Reaktionsansatz wird anschließend in 200 ml 5 mM TEAHCO<sub>3</sub>, pH 7.5 aufgenommen und mit Anionenaustauscher-Chromatographie gereinigt. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und dreimal mit je 5 ml Methanol koevaporiert. Der Rückstand wird anschließend in HPLC-Puffer A aufgenommen und portionsweise mit HPLC gereinigt. Die

Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und dreimal mit je 5 ml Methanol koevaporiert. Man erhält das Produkt als weißen Feststoff.

Ausbeute: 45 mg (74  $\mu\text{mol}$ ) = 37 %

MS (ESI): 604.1  $[\text{M-H}]^-$  (MW 605.4)

$^1\text{H-NMR}$ : ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz):  $\delta$  = 1.10 (m, 4h,  $\text{CH}_2$ ); 1.15 (m, 27H,  $\text{CH}_3$ ,  $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{NH}^+$ -Gegenion); 1.25 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 1.45 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2.69 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ); 2.82 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ); 3.07 (q, 18H,  $\text{CH}_2$ ,  $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{NH}^+$ -Gegenion); 4.11 (m, 2H, 5'-H); 4.27 (m, 1H, 4'-H); 4.45 (m, 1H, 3'-H); 4.68 (m, 1H, 2'-H); 6.02 (d, 1H, 1'-H); 8.14/8.44 (2s, 2H, 2/8-H)

$^{31}\text{P-NMR}$ : ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz):  $\delta$  = 0.42 (d,  $\gamma$ -Phosphat); - 10.29 (d,  $\alpha$ -Phosphat); - 21.86 (m,  $\beta$ -Phosphat)

Anionenaustauscher-Chromatographie-Bedingungen:

Säule: 100 ml Q-Sepharose Fast Flow

Flussrate: 5 ml/min

Puffer: System 5

Gradient: Gradient 6

Detektion: 259 nm

HPLC-Bedingungen:

Reaktionskontrolle

Säule: C-18 Prontosil AQ (5  $\mu\text{M}$ , 120 Å, 4.6 x 250 mm)

Flussrate: 1.5 ml/min

Puffer: System 4

Gradient: Gradient 2

Detektion: 259 nm

Retentionszeit: 7.6 min

Reinigung

Säule: C-18 Prontosil AQ (5  $\mu\text{M}$ , 120 Å, 8.0 x 250 mm)

Flussrate: 2.5 ml/min

Puffer: System 2

Gradient: Gradient 2

Detektion: 259 nm

Retentionszeit: 8.5 min

### 6.9.5 P<sup>3</sup>-(Aminobutyl-amino)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat 8

868 mg Diaminobutan (10 mmol) werden in 2 ml Wasser gelöst, der pH-Wert mit konz. HCl auf 8.2 eingestellt und die Lösung auf 5 ml mit Wasser aufgefüllt. 110.0 mg ATP (0.2 mmol) und 382.0 mg EDC (2 mmol) werden in 10 ml 100 mM Triethanolamin, pH 8.0 gelöst und 15 min bei 50 °C gerührt. Danach wird die wässrige Lösung des Diaminobutans zugegeben und die Lösung 4 h bei 50 °C weiter gerührt (HPLC-Reaktionskontrolle). Der Reaktionsansatz wird anschließend in 200 ml 5 mM TEAHCO<sub>3</sub>, pH 7.5 aufgenommen und mit Anionenaustauscher-Chromatographie gereinigt. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und dreimal mit je 5 ml Methanol koevaporiert. Der Rückstand wird anschließend in HPLC-Puffer A aufgenommen und portionsweise mit HPLC gereinigt. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und dreimal mit je 5 ml Methanol koevaporiert. Man erhält das Produkt als weißen Feststoff.

Ausbeute: 56 mg (97 µmol) = 49 %

MS (ESI): 576.3 [M-H]<sup>-</sup> (MW 577.3)

<sup>1</sup>H-NMR: (D<sub>2</sub>O, 500 MHz): δ = 1.15 (m, 27H, CH<sub>3</sub>, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>-Gegenion); 1.39 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.57 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2.78 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N); 2.87 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N); 3.06 (q, 18H, CH<sub>2</sub>, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>-Gegenion); 4.12 (m, 2H, 5'-H); 4.27 (m, 1H, 4'-H); 4.45 (m, 1H, 3'-H); 4.67 (m, 1H, 2'-H); 6.01 (d, 1H, 1'-H); 8.11/8.40 (2s, 2H, 2/8-H)

<sup>31</sup>P-NMR: (D<sub>2</sub>O, 500 MHz): δ = - 0.04 (d, γ-Phosphat); - 10.46 (d, α-Phosphat); - 21.94 (m, β-Phosphat)

Anionenaustauscher-Chromatographie-Bedingungen:

Säule: 100 ml Q-Sepharose Fast Flow

Flussrate: 5 ml/min

Puffer: System 5

Gradient: Gradient 6

Detektion: 259 nm

HPLC-Bedingungen:

Reaktionskontrolle

Säule: C-18 Prontosil AQ (5 µM, 120 Å, 4.6 x 250 mm)

Flussrate: 1.5 ml/min

Puffer: System 4

Gradient: Gradient 2  
 Detektion: 259 nm  
 Retentionszeit: 7.0 min

#### Reinigung

Säule: C-18 Prontosil AQ (5  $\mu$ M, 120 Å, 8.0 x 250 mm)  
 Flussrate: 2.5 ml/min  
 Puffer: System 2  
 Gradient: Gradient 2  
 Detektion: 259 nm  
 Retentionszeit: 8.0 min

### 6.9.6 P<sup>3</sup>-(Aminoethyl-amino)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat 7

672 mg Ethylendiamin (10 mmol) werden in 2 ml Wasser gelöst, der pH-Wert mit konz. HCl auf 8.2 eingestellt und die Lösung auf 5 ml mit Wasser aufgefüllt. 110.0 mg ATP (0.2 mmol) und 382.0 mg EDC (2 mmol) werden in 10 ml 100 mM Triethanolamin, pH 8.0 gelöst und 15 min bei 50 °C gerührt. Danach wird die wässrige Lösung des Ethylendiamins zugegeben und die Lösung 4 h bei 50 °C weiter gerührt (HPLC-Reaktionskontrolle). Der Reaktionsansatz wird anschließend in 200 ml 5 mM TEAHCO<sub>3</sub>, pH 7.5 aufgenommen und mit Anionenaustauscher-Chromatographie gereinigt. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und dreimal mit je 5 ml Methanol koevaporiert. Der Rückstand wird anschließend in HPLC-Puffer A aufgenommen und portionsweise mit HPLC gereinigt. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und dreimal mit je 5 ml Methanol koevaporiert. Man erhält das Produkt als weißliches Öl.

Ausbeute: 34 mg (62  $\mu$ mol) = 31 %

MS (ESI): 548.2 [M-H]<sup>-</sup> (MW 549.3)

<sup>1</sup>H-NMR: (D<sub>2</sub>O, 500 MHz):  $\delta$  = 1.16 (m, 27H, CH<sub>3</sub>, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>-Gegenion); 2.86 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N); 2.93 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N); 3.07 (q, 18H, CH<sub>2</sub>, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>-Gegenion); 4.10 (m, 2H, 5'-H); 4.28 (m, 1H, 4'-H); 4.45 (m, 1H, 3'-H); 4.68 (m, 1H, 2'-H); 6.02 (d, 1H, 1'-H); 8.14/8.44 (2s, 2H, 2/8-H)

<sup>31</sup>P-NMR: (D<sub>2</sub>O, 500 MHz):  $\delta$  = - 0.28 (d,  $\gamma$ -Phosphat); - 10.62 (d,  $\alpha$ -Phosphat); - 22.03 (m,  $\beta$ -Phosphat)

## Anionenaustauscher-Chromatographie-Bedingungen:

Säule:	100 ml Q-Sepharose Fast Flow
Flussrate:	5 ml/min
Puffer:	System 5
Gradient:	Gradient 6
Detektion:	259 nm

## HPLC-Bedingungen:

Reaktionskontrolle

Säule:	C-18 Prontosil AQ (5 $\mu$ M, 120 Å, 4.6 x 250 mm)
Flussrate:	1.5 ml/min
Puffer:	System 4
Gradient:	Gradient 2
Detektion:	259 nm
Retentionszeit:	8.1 min

Reinigung

Säule:	C-18 Prontosil AQ (5 $\mu$ M, 120 Å, 8.0 x 250 mm)
Flussrate:	2.5 ml/min
Puffer:	System 2
Gradient:	Gradient 2
Detektion:	259 nm
Retentionszeit:	8.3 min

**6.9.7 N-FITC-aminohexyl-amin 12**

3.49 g Diaminohexan (30 mmol) werden bei 50 °C verflüssigt und 50 mg FITC (128  $\mu$ mol) hinzugegeben. Der abgedunkelte Reaktionsansatz wird dann für 16 h bei 50 °C gerührt. Anschließend wird der Reaktionsansatz mit Kieselgelchromatographie gereinigt. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wird dreimal mit je 5 ml Methanol koevaporiert. Man erhält das Produkt als roten Feststoff.

Ausbeute:	nicht bestimmt
MS (ESI):	504.1 [M-H] <sup>-</sup> (MW 505.6)

Kieselgelchromatographie-Bedingungen:

Säule: 20 g Kieselgel 60  
Eluent: Methanol/Dichlormethan/Triethylamin 49:49:2

Dünnschichtchromatographie-Bedingungen:

DC-Platte: Kieselgel 60 Aluminiumfolie  
Laufmittel: Methanol/Dichlormethan/Triethylamin 49:49:2  
R<sub>f</sub>-Wert: 0.16

### 6.9.8 N-FITC-aminobutyl-amin 11

Zu 2.64 g Diaminobutan (30 mmol) werden 50 mg FITC (128 µmol) hinzugegeben und der abgedunkelte Reaktionsansatz für 16 h bei 30 °C gerührt. Der Reaktionsansatz wird unter Erhitzen im Hochvakuum eingeengt und der Rückstand anschließend mit Kieselgelchromatographie gereinigt. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wird dreimal mit je 5 ml Methanol koevaporiert. Man erhält das Produkt als roten Feststoff.

Ausbeute: nicht bestimmt  
MS (ESI): 476.1 [M-H]<sup>-</sup> (MW 477.5)

Kieselgelchromatographie-Bedingungen:

Säule: 20 g Kieselgel 60  
Eluent: Methanol/Dichlormethan/Triethylamin 49:49:2

Dünnschichtchromatographie-Bedingungen:

DC-Platte: Kieselgel 60 Aluminiumfolie  
Laufmittel: Methanol/Dichlormethan/Triethylamin 49:49:2  
R<sub>f</sub>-Wert: 0.14

### 6.9.9 N-FITC-aminoethyl-amin 10

Zu 1.80 g Ethylendiamin (30 mmol) werden 50 mg FITC (128 µmol) hinzugegeben und der abgedunkelte Reaktionsansatz für 16 h bei 30 °C gerührt. Anschließend wird der Reaktionsansatz mit Kieselgelchromatographie gereinigt. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wird dreimal mit je 5 ml Methanol koevaporiert. Man erhält das Produkt als roten Feststoff.

Ausbeute: 19 mg (42  $\mu$ mol) = 33 %  
MS (ESI): 448.1 [M-H]<sup>-</sup> (MW 449.5)  
<sup>1</sup>H-NMR: (D<sub>2</sub>O, 500 MHz):  $\delta$  = 2.89 (t, 2H, CH<sub>2</sub>N), 3.58 (t, 2H, CH<sub>2</sub>N); 6.49-7.11 (m, 8H, Fluorescein-H), 7.39-7.59 (m, 1H, Fluorescein-H)

Kieselgelchromatographie-Bedingungen:

Säule: 20 g Kieselgel 60  
Eluent: Methanol/Dichlormethan/Triethylamin 49:49:2

Dünnschichtchromatographie-Bedingungen:

DC-Platte: Kieselgel 60 Aluminiumfolie  
Laufmittel: Methanol/Dichlormethan/Triethylamin 49:49:2  
R<sub>F</sub>-Wert: 0.18

#### 6.9.10 4-(Trifluoracetamido-ethyl)-phenylamin 16

681 mg  $\beta$ -(4-Aminophenyl)-ethylamin (5 mmol) werden in 25 ml Chloroform gelöst, danach 1.921 g Trifluoressigsäuremethylester (15 mmol) zugegeben und der Reaktionsansatz 1 h bei RT gerührt (DC-Kontrolle). Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhält das Produkt als weißen Feststoff.

MS (GC): 232.0 (MW 232.2)  
Ausbeute: 987 mg (4.25 mmol) = 85 %  
<sup>1</sup>H-NMR: ([D<sub>6</sub>]DMSO, 500 MHz):  $\delta$  = 2.61 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.30 (t, 2H, CH<sub>2</sub>); 4.86 (s, 2H, Aryl-NH<sub>2</sub>), 6.49 (d, 2H, Aryl-H), 6.84 (d, 2H, Aryl-H), 9.41 (s, br, 1H, CON-H)

Dünnschichtchromatographie-Bedingungen:

DC-Platte: Kieselgel 60 Aluminiumfolie  
Laufmittel: Isobuttersäure/Wasser/Ammoniak 75:24:1  
R<sub>F</sub>-Wert: 0.71 **16**  
0.62  $\beta$ -(4-Aminophenyl)-ethylamin

### 6.9.11 P<sup>3</sup>-(4-Aminoethyl-phenylamino)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat 18

121 mg ATP (0.22 mmol) werden in 10 ml Wasser gelöst und danach innerhalb von 3 min 500 mg EDC (2.61 mmol) zugegeben. Nach 10 min wird eine Suspension von 460 mg 4-(Trifluoracetamido-ethyl)-phenylamin **16** (2.00 mmol) in 6 ml Dioxan zugegeben, der pH-Wert mit 0.2 M HCl auf 6.5 eingestellt und 90 min bei RT gerührt (HPLC-Reaktionskontrolle). Anschließend wird die Lösung auf 4 °C gekühlt und für 25 min Ammoniak durch die Lösung geleitet. Danach wird die Lösung 6 h bei RT gerührt. Nach Austreiben des restlichen Ammoniaks durch Stickstoff wird der Reaktionsansatz am Rotationsverdampfer auf ein kleines Volumen eingengt, in 200 ml 5 mM TEAHCO<sub>3</sub>, pH 7.5 aufgenommen und mit Anionenaustauscher-Chromatographie gereinigt. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und dreimal mit je 5 ml Methanol koevaporiert. Man erhält das Produkt als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 150 mg (160 μmol) 73 %

MS (ESI): 624.1 [M-H]<sup>-</sup> (MW 625.4)

<sup>1</sup>H-NMR: (D<sub>2</sub>O, 500 MHz): δ = 1.16 (t, 27H, CH<sub>3</sub>, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>-Gegenion); 2.59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.02 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.08 (q, 18H, CH<sub>2</sub>, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>-Gegenion); 4.03 (m, 2H, 5'-H); 4.15 (m, 1H, 4'-H); 4.30 (m, 1H, 3'-H); 4.34 (m, 1H, 2'-H); 5.92 (d, 1H, 1'-H); 6.08 (m, 4H, Aryl-H); 8.11/8.32 (2s, 2H, 2/8-H)

<sup>31</sup>P-NMR: (D<sub>2</sub>O, 500 MHz): δ = - 8.85 (d, γ-Phosphat); - 10.09 (d, α-Phosphat); - 21.75 (m, β-Phosphat)

Anionenaustauscher-Chromatographie-Bedingungen:

Säule: 70 ml Q-Sepharose Fast Flow

Flussrate: 5 ml/min

Puffer: System 5

Gradient: Gradient 6

Detektion: 259 nm

HPLC-Bedingungen:

Reaktionskontrolle

Säule: C-18 Prontosil AQ (5 μM, 120 Å, 4.6 x 250 mm)

Flussrate: 1.5 ml/min

Puffer: System 4

Gradient: Gradient 2

Detektion: 259 nm

Retentionszeit: 6.9 min

### 6.9.12 P<sup>3</sup>-(4-(N-FITC-Aminoethyl)-phenylamino)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **19**

Zu einer Lösung von 30 mg P<sup>3</sup>-(4-Aminoethyl-phenylamino)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **18** (32.3 µmol) in 3 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.0 werden 50 mg FITC (129.2 µmol) gelöst in 1 ml DMSO zugegeben. Der Reaktionsansatz wird 24 h bei RT gerührt (HPLC-Reaktionskontrolle) und anschließend portionsweise mit HPLC gereinigt. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und der Rückstand dreimal mit je 5 ml Methanol koevaporiert. Der rote Feststoff wird in 1.5 ml Wasser gelöst, die Ausbeute photometrisch bestimmt und das Produkt lyophilisiert.

Ausbeute: 6.6 µmol = 20 %

MS (ESI): 1013.1 [M-H]<sup>-</sup> (MW 1014.7)

HPLC-Bedingungen:

#### Reaktionskontrolle

Säule: C-18 Prontosil AQ (5 µM, 120 Å, 4.6 x 250 mm)

Flussrate: 1.5 ml/min

Puffer: System 2

Gradient: Gradient 2

Detektion: 259 nm und 494 nm

Retentionszeit: 10.6 min

#### Reinigung

Säule: C-18 Prontosil AQ (5 µM, 120 Å, 8.0 x 250 mm)

Flussrate: 2.5 ml/min

Puffer: System 2

Gradient: Gradient 3

Detektion: 259 nm und 494 nm

Retentionszeit: 15.4 min

### 6.9.13 P<sup>3</sup>-(4-(N-Cy5-Aminoethyl)-phenylamino)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **38**

3.53 mg P<sup>3</sup>-(4-Aminoethyl-phenylamino)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat **18** (3.79  $\mu\text{mol}$ ) und 1 mg Cy5-NHS-Ester (1.26  $\mu\text{mol}$ ) werden in 1 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.3 gelöst und 30 min bei RT gerührt (HPLC-Reaktionskontrolle). Der Reaktionsansatz wird anschließend portionsweise mit HPLC gereinigt. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert. Das Lyophilisat wird in 1 ml Wasser gelöst, die Ausbeute photometrisch bestimmt und das Produkt lyophilisiert.

Ausbeute: 2.4  $\mu\text{mol}$  = 64 %

MS (ESI): 1264.2 [M-H]<sup>-</sup> (MW 1264.2)

HPLC-Bedingungen:

#### Reaktionskontrolle und Reinigung

Säule: C-18 Prontosil AQ (5  $\mu\text{M}$ , 120 Å, 8.0 x 250 mm)

Flussrate: 2.5 ml/min

Puffer: System 2

Gradient: Gradient 2

Detektion: 259 nm und 595 nm

Retentionszeit: 16.2 min

### 6.9.14 $\beta$ -Iodethylamin **17**

22.44 ml 57 %ige wässrige Iodwasserstofflösung (100 mmol) werden auf 4 °C gekühlt und 3.054 g Ethanolamin (50 mmol) zugegeben. Anschließend wird die Lösung langsam bis zu Hälfte des Volumens abdestilliert und danach über Nacht bei 4 °C stehen gelassen. Der Niederschlag wird mit Chloroform gewaschen und dann zweimal aus Chloroform/Ethanol 1:1 umkristallisiert. Nach Trocknen im Hochvakuum über Nacht erhält man das Hydroiodid von **17** als weißen blättrigen Feststoff.

Ausbeute: 5.992 g (20 mmol) = 40 %

Schmp.: 197-199 °C

### 6.9.15 P<sup>3</sup>-( $\beta$ -Iodethylamino)-P<sup>1</sup>-adenosin-triphosphat 20

276 mg ATP (0.5 mmol) und 959 mg EDC (5 mmol) werden in 25 ml 100 mM Triethanolamin, pH 8.0 gelöst und 15 min bei 50 °C gerührt. Dann werden 747 mg  $\beta$ -Iodethylamin (2.5 mmol) zugegeben und 2 h bei 50 °C weiter gerührt (HPLC-Reaktionskontrolle). Anschließend wird der Reaktionsansatz in 275 ml 5 mM TEAHCO<sub>3</sub>, pH 7.5 aufgenommen und mit Anionenaustauscher-Chromatographie gereinigt. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und dreimal mit je 5 ml Methanol koevaporiert. Danach wird der Rückstand in 1 ml Wasser aufgenommen und portionsweise mit HPLC gereinigt. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und dreimal mit je 5 ml Methanol koevaporiert. Der Rückstand wird über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Man erhält das Produkt als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 298 mg (309  $\mu$ mol) = 62 %

MS (ESI): 659.0 [M-H]<sup>-</sup> (MW 660.2)

<sup>1</sup>H-NMR: (D<sub>2</sub>O, 500 MHz):  $\delta$  = 1.17 (t, 27H, CH<sub>3</sub>, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>-Gegenion); 3.10 (q, 18H, CH<sub>2</sub>, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>-Gegenion); 3.26 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 4.14 (m, 2H, 5'-H); 4.29 (m, 1H, 4'-H); 4.48 (m, 1H, 3'-H); 4.63 (m, 1H, 2'-H); 6.03 (d, 1H, 1'-H); 8.16/8.45 (2s, 2H, 2/8-H)

<sup>31</sup>P-NMR: (D<sub>2</sub>O, 500 MHz):  $\delta$  = - 1.74 (d,  $\gamma$ -Phosphat); - 10.48 (d,  $\alpha$ -Phosphat); - 21.98 (t,  $\beta$ -Phosphat)

Anionenaustauscher-Chromatographie-Bedingungen:

Säule: 70 ml Q-Sepharose Fast Flow

Flussrate: 5 ml/min

Puffer: System 5

Gradient: Gradient 6

Detektion: 259 nm

HPLC-Bedingungen:

#### Reaktionskontrolle

Säule: C-18 Prontosil AQ (5  $\mu$ M, 120 Å, 4.6 x 250 mm)

Flussrate: 1.5 ml/min

Puffer: System 2

Gradient: Gradient 2

Detektion: 259 nm

Retentionszeit: 13.4 min

### Reinigung

Säule:	C-18 ProntoSil AQ (5 $\mu$ M, 120 Å, 8.0 x 250 mm)
Flussrate:	2.5 ml/min
Puffer:	System 2
Gradient:	Gradient 2
Detektion:	259 nm
Retentionszeit:	13.5 min

### **6.9.16 Festphasensynthese von Peptiden**

Das N-Fmoc-[K5, V6, V7)-CONH<sub>2</sub>-Kemptide-Peptid **4** wird von der Firma ThermoHybaid (Ulm) bezogen. Alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Peptide werden durch Festphasensynthese hergestellt (Merrifield, 1963). Die Peptide werden manuell nach einem *in situ* Neutralisations- und HBTU-Aktivierungsprotokoll für die Fmoc-Schutzgruppenstrategie synthetisiert (Atherton und Sheppard, 1989). Als feste Phase für alle Peptidsynthesen dient Fmoc-Ala-Wang-Harz. Die Seitenketten der verwendeten Fmoc-Aminosäuren sind durch die folgenden Gruppen geschützt: Arg(Pbf), Asn(Trt), Cys(Trt), Dpr(iv(Dde)), Gln(Trt), Glu(OtBu), Lys(Boc), Ser(tBu) und Thr(tBu). Die Seitenketten der nicht aufgeführten Aminosäuren sind ungeschützt. Die Synthesen werden alle im 0.2 mmol-Maßstab durchgeführt. Für die Reaktionen werden Glasgefäße mit Fritten-Einsatz (Porengröße 3 bis 4) und Dreiwegehahn für Vakuum- und Stickstoff-Anschluss verwendet. Vor Beginn der ersten Kopplung wird das Fmoc-Ala-Wang-Harz mindestens 80 min in DMF gequollen. Die Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Gruppen erfolgt durch zweimaliges Behandeln mit 20 % Piperidin in DMF für jeweils 3 bzw. 7 min. Zwischen den beiden Abspaltungsschritten wird einmal mit 10 ml DMF gewaschen. Nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe wird zehnmal mit je 10 ml DMF pro Gramm Harz gewaschen. Zur Kopplung der Aminosäuren werden 2.5 Moläquivalente der Fmoc-Aminosäure mit 2.38 Moläquivalenten HBTU und 5 Moläquivalenten DIEA für 3 min aktiviert und anschließend 15 min mit dem Harz inkubiert. Nach der Kopplung wird wiederum zehnmal mit je 10 ml DMF pro Gramm Harz gewaschen. Anschließend kann die Kopplung der nächsten Aminosäure erfolgen. Um die Effizienz der durchgeführten Entschützungen und Kopplungen zu überprüfen werden stichprobenartig Kaiser-Tests durchgeführt (Sarin *et al.*, 1981).

### 6.9.17 Bromoacylierung von Peptiden mit Bromessigsäure/DIC

Um die iv(Dde)-Schutzgruppe der Seitenkette der Diaminopropionsäure zu entfernen, wird das Harz sechsmal für je 10 min mit 2 % Hydrazinhydrat in DMF (25 ml pro Gramm Harz) behandelt. Danach wird zehnmal mit je 10 ml DMF pro Gramm Harz gewaschen. Die Kopplung der Bromessigsäure an die entschützte Aminosäure-Seitenkette erfolgt mit 8.3 Moläquivalenten Bromessigsäure/DIC (bezogen auf die Menge des eingesetzten Harzes) für 5 h. Danach wird wiederum zehnmal mit je 10 ml DMF pro Gramm Harz gewaschen.

### 6.9.18 Entschützung und Abspaltung der Peptide

Die N-terminalen Fmoc-Gruppen werden entsprechend den Entschützungreaktionen während der Peptidsynthese abgespalten. Vor Entschützung der Aminosäure-Seitenketten und Abspaltung von der festen Phase wird das Harz mit Dichlormethan gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Die Abspaltung der Peptide von den getrockneten Harzen erfolgt mit einem Abspaltungs-Mix aus 33 mg Phenol, 25 µl Ethandithiol, 50 µl Wasser, 50 µl Thioanisol und 900 µl TFA (pro 100 mg Harz) für 3 h bei RT. Nach Abtrennung des Harzes wird die Lösung am Rotationsverdampfer auf ein kleines Volumen eingeeengt und die Peptide in wasserfreiem, eiskaltem Diethylether gefällt. Nach zweimaligem Waschen und Abzentrifugieren des gefällten Rohpeptids in Diethylether wird dieses in 50 % CH<sub>3</sub>CN + 0.1 % TFA aufgenommen und lyophilisiert.

### 6.9.19 Reinigung der Rohpeptide

Alle Rohpeptide werden über RP-HPLC gereinigt. Dazu wird die Säule SP 250/10 Nucleosil 300-7 C 8 der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Alle Reinigungen werden mit dem Puffer-System 3 und den Gradienten 3 und 4 bei einer Flussrate von 2.5 ml/min durchgeführt. Vor Auftragen auf die Säule werden die Rohpeptide in Wasser oder in Puffer A gelöst und danach portionsweise gereinigt. Die Detektion erfolgt bei 214 nm. Bei den bromoacylierten Peptiden erfolgt die Detektion zusätzlich bei 259 nm, um die Vollständigkeit der iv(Dde)-Abspaltung zu überprüfen. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert.

### 6.9.20 Kopplung der bromoacylierten Peptide mit ATP $\gamma$ S

1-2 Moläquivalente des gereinigten bromoacylierten Peptids werden in Methanol/Wasser 4:1 gelöst und 1 Moläquivalent ATP $\gamma$ S hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wird 24 h bei RT gerührt. Der entstehende Niederschlag wird abzentrifugiert und noch dreimal mit Methanol/Wasser 4:1 gewaschen um nicht abreagiertes Peptid zu entfernen. Anschließend wird das Pellet an der Luft getrocknet und bei - 80 °C aufbewahrt. Das synthetisierte Phosphorthioat wird ohne weitere Reinigung für die folgenden Messungen und Synthesen eingesetzt. Ausbeuten werden nicht bestimmt.

### 6.9.21 Synthese von Fluorescein-markierten Peptiden

1 Moläquivalent des Phosphorthioats wird in 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.5 gelöst, 2-3 Moläquivalente FITC gelöst in DMSO (1/10 des verwendeten Puffer-Volumens) hinzugegeben und die Lösung 1 h bei RT gerührt (HPLC-Reaktionskontrolle). Danach wird der Reaktionsansatz portionsweise mit HPLC gereinigt, wobei die Produktfraktionen direkt in 100 mM TEAHCO<sub>3</sub>, pH 7.5 gepuffert werden. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert. Der rote Rückstand wird in 1 ml Wasser aufgenommen und portionsweise mit HPLC-Anionenaustauscher-Chromatographie gereinigt. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert. Die Ausbeuten werden nicht bestimmt.

HPLC-Bedingungen:

#### Reaktionskontrolle und Reinigung

Säule: SP 250/10 Nucleosil 300-7 C 8  
 Flussrate: 2.5 ml/min  
 Puffer: System 3  
 Gradient: Gradient 4  
 Detektion: 259 nm und 494 nm

#### Anionenaustauscher-Chromatographie

Säule: POROS HQ 20  
 Flussrate: 2 ml/min  
 Puffer: System 6  
 Gradient: Gradient 7 und 8  
 Detektion: 259 nm und 494 nm

### 6.9.22 Synthese von Cy5-markierten Peptiden

2-3 Moläquivalente des Phosphorthioats bzw. des Peptids werden in 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.5 gelöst, 1 Moläquivalent Cy5-NHS-Ester gelöst in DMSO (1/10 des verwendeten Puffer-Volumens) hinzugegeben und die Lösung 2 h bei RT gerührt (HPLC-Reaktionskontrolle). Danach wird der Reaktionsansatz portionsweise mit HPLC gereinigt, wobei die Produktfraktionen direkt in 100 mM TEAHCO<sub>3</sub>, pH 7.5 gepuffert werden. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert. Die Ausbeuten werden nicht bestimmt.

HPLC-Bedingungen:

#### Reaktionskontrolle und Reinigung

Säule:	SP 250/10 Nucleosil 300-7 C 8
Flussrate:	2.5 ml/min
Puffer:	System 3
Gradient:	Gradient 5
Detektion:	259 nm und 595 nm

### 6.9.23 Peptidanalytik

Die Analyse aller Peptide erfolgt durch HPLC und Massenspektrometrie. Für die Charakterisierung mittels HPLC wird die Säule SP 250/10 Nucleosil 300-7 C 8 der Firma Macherey-Nagel (Düren) und die Anionenaustauscher-Säule POROS HQ 20 der Firma Perseptive Biosystems (Weiterstadt) mit den jeweils angegebenen Puffer-Systemen und Puffer-Gradienten verwendet. Für die Aufnahmen der Massenspektren wird ein LCQ Massenspektrometer der Firma Finnigan MAT (Bremen) verwendet. Vor der jeweiligen Messung werden die Proben zentrifugiert oder mikrofiltriert. Die Messungen erfolgen sowohl im positiven als auch im negativen Ionenmodus.

## 7 Literatur

Ablooglu, A.J., Tills, J.H., Kim, K., Parang, K., Cole, P.A., Hubbard, S.R., Kohanski, R.A. (2000). Probing the catalytic mechanism of the insulin receptor kinase with a tetrafluorotyrosine-containing peptide-substrate. *J. Biol. Chem.* **275**, 30394-30398.

Atherton, E. und Sheppard, R.C. (1989). Solid phase synthesis: a practical approach. *IRL Press at Univ. Press, Oxford*.

Bennet, P., Craig, R., Starr, R., Offer, G. (1986). The ultrastructural localization of C-protein, X-protein and H-protein in rabbit muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **7**, 550-567.

Berglund, L., Ljungström, O., Engström, L. (1977). Studies on the cyclic 3':5'-AMP-stimulated pig liver protein kinase with pyruvate kinase as substrate. *J. Biol. Chem.* **252**, 613-619.

Bhakdi, S., Weller, U., Walev, I., Martin, E., Jonas, D., Palmer, M. (1993). A guide to the use of pore-forming toxins for controlled permeabilization of cell membranes. *Med. Microbiol. Immunol.* **182**, 167-175.

Billimoria, J.D. und Lewis, K.O. (1968). The synthesis of phospholipids. Part I. Phosphatidyl and lysophosphatidyl ethanolamines. *J. Chem. Soc. C*, 1404-1412.

Blue, E.K., Goeckeler, Z.M., Jin, Y., Hou, L., Dixon, S.A., Herring, B.P., Wysolmerski, R.B., Gallagher, P.J. (2002). 220- and 130-kDa MLCKs have distinct tissue distributions and intracellular localization patterns. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **282**, C451-C460.

Cotte, A., Bader, B., Kuhlmann, J., Waldmann, H. (1999). Synthesis of the N-terminal lipohexapeptide of human G<sub>α0</sub>-protein and fluorescent-labeled analogues for biological studies. *Chem. Eur. J.* **5**, 922-936.

Crivici, A. und Ikura, M. (1995). Modular und structural basis for target recognition by calmodulin. *Annu. Rev. Biomol. Struct.* **24**, 85-116.

Davies, S.P., Hawley, S.A., Woods, A., Carling, D., Haystead, T.A., Hardie, D.G. (1994). Purification of the cAMP-activated protein kinase on ATP-gamma-sepharose and analysis of its subunit structure. *Eur. J. Biochem.* **223**, 351-357.

Davis, P.D., Hill, C.H., Keech, E., Lawton, G., Nixon, J.S., Sedgwick, A.D., Wadsworth, J., Westmacott, D., Wilkinson, S.E. (1989). Potent selective inhibitors of protein kinase C. *FEBS Lett.* **259**, 61-63.

de Gier, J. (1992). Permeability barriers formed by membrane lipids. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **27**, 1-10.

Dennis, J.E., Shimzu, T., Reinach, F.C., Fischman, D.A. (1984). Localization of C-protein isoforms in chicken skeletal muscle: ultrastructural detection using monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.* **98**, 1524-1522.

Desaubry, L. und Johnson R. (1997). Conjugation of nucleoside triphosphates to an amino linker. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**, 123-126.

Edlund, B., Zetterqvist, Ö., Ragnarsson, U., Engström, L. (1977). Phosphorylation of synthetic peptides by (<sup>32</sup>P)ATP and cyclic GMP-stimulated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **79**, 139-144.

Eppenberger, H.M., Perriard, J.C., Rosenberg, U.B., Strehler, E.E. (1981). The Mr 165.000 M-protein myomesin: a specific protein of cross-striated muscle cells. *J. Cell Biol.* **89**, 185-193.

Fawcett, J.M., Harrison, S.M., Orchard, C.H. (1998). A method for reversible permeabilization of isolated rat ventricular myocytes. *Exp. Physiol.* **83**, 293-303.

Franzen, G. (1999). Untersuchungen an neuartigen Nukleotid-Analoga zur allelspezifischen Markierung der direkten Substrate von Serin/Threonin-Kinasen. Diplomarbeit, Universität Dortmund.

Fürst, D.O. und Gautel, M. (1995). The anatomy of a molecular giant: how the sarcomere cytoskeleton is assembled from immunoglobulin superfamily molecules. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **27**, 951-960.

Fürst, D.O., Osborn, M., Nave, R., Weber, K. (1988). The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z-line extends to the M-line. *J. Cell Biol.* **106**, 1563-1572.

- Gautel, M., Castiglione Morelli, M.A., Pfuhl, M., Motta, A. Pastore, A. (1995b). A calmodulin-binding sequence in the C-terminus of human cardiac titin kinase. *Eur. J. Biochem.* **230**, 752-759.
- Gautel, M., Zuffardi, O., Freiburg, A., Labeit, S. (1995a). Phosphorylation switches specific for the cardiac isoform of myosin binding protein-C: a modulator of cardiac contraction? *EMBO J.* **14**, 1952-1960.
- Gleeson, P.A., Anderson, T.J., Stow, J.L., Griffiths, G., Toh, B.H., Matheson, F. (1996). p230 is associated with vesicles budding from the trans-golgi network. *J. Cell Science* **109**, 2811-2821.
- Gregorio, C.C., Granzier, H., Sorimachi, H., Labeit, S. (1999). Muscle assembly: a titanic achievement? *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 18-25.
- Gregorio, C.C., Trombitas, K., Centner, T., Kolmerer, B., Stier, G., Kunke, K., Suzuki, K., Obermayr, F., Herrmann, B., Granzier, H., Sorimachi, H., Labeit, S. (1998). The NH<sub>2</sub> terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with an novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity. *J. Cell Biol.* **143**, 1013-1027.
- Grove, B.K., Cerny, L., Perriard, J.-C., Eppenberger, H.M. (1985). Myomesin and M-protein: expression of two M-band proteins in pectoral muscle and heart during development. *J. Cell Biol.* **101**, 1413-1421.
- Grove, B.K., Kurer, V., Lehner, C., Doetschmann, T.C., Perriard, J.-C., Eppenberger (1984). A new 185.000-dalton skeletal muscle protein detected by monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.* **98**, 518-524.
- Hanks, S.K. und Hunter, T. (1995). Protein kinases. 6. The eucaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**, 576-596.
- Haribabu, B., Hook, S.S., Selbert, M.A., Goldstein, E.G., Tomhave, E.D., Edelman, A.M., Snyderman, R., Means, A.R. (1995). Human calcium-calmodulin dependent protein kinase I: cDNA cloning, domain structure and activation by phosphorylation at threonine-177 by calcium-calmodulin dependent protein kinase I kinase. *EMBO J.* **14**, 3679-3686.

- Haystead, C.M., Gregory, P., Sturgill, T.W., Haystead, T.A. (1993). Gamma-phosphate-linked ATP-sepharose for the affinity purification of protein kinases. Rapid purification to homogeneity of skeletal muscle mitogen-activated protein kinase. *Eur. J. Biochem.* **214**, 459-467.
- Heierhorst, J., Kobe, B., Feil, S., Parker, M.W., Benian, G.M., Wiess, K.R. (1996a).  $\text{Ca}^{2+}$ /S100 regulation of giant protein kinases. *Nature* **380**, 636-639.
- Heierhorst, J., Tang, X., Lei, J., Probst, W.C., Weiss, K.R., Kemp, B.E., Benian, G.B. (1996b). Substrate specificity and inhibitor sensitivity of  $\text{Ca}^{2+}$ /S100-dependent twitchin kinases. *Eur. J. Biochem.* **242**, 454-459.
- Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B. (1991). Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. G. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S., Sasaki, Y. (1984). Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* **23**, 5036-5041.
- Horowitz, R., Kempner, E.S., Bisher, M.E., Podolsky, R.J. (1986). A physiological role for titin and myosin. *Nature* **323**, 160-164.
- Hunter, T. (1987). A thousand and one protein kinases. *Cell* **50**, 823-829.
- Huxley, H.E. und Hanson, J. (1954). The cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* **173**, 973-976.
- Huxley, H.E. und Niedergerke, R.M. (1954). Structural changes in muscle during contraction. Interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* **173**, 971-973.
- Johnson, L.N., Noble, M.E.M., Owen, D.J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for activation. *Cell* **85**, 149-158.
- Kemp, B.E. und Pearson, R.B. (1991). Design and use of peptide substrates for protein kinases. *Methods Enzymol.* **200**, 121-134.

Kemp, B.E., Faux, M.C., Means, A.R., House, C., Tiganis, T., Hu, S.-H., Mitchelhill, K.I. (1994). Protein Kinases (ed. Woodget, J.). *IRL Press, Oxford*. 30-67.

Kemp, B.E., Pearson, R.B., House, C.M. (1991). Pseudosubstrate-based peptide inhibitors. *Methods Enzymol.* **201**, 287-304.

Knighton, D.R., Zheng, J., ten Eyck, L.F., Ashford, V.A., Xuong, N., Taylor, S.S., Sowadski, M. (1991). Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**, 407-413.

Knorre, D.G., Kurbatov, V.A., Samukov, V.V. (1976). General method for the synthesis of ATP gamma-derivatives. *FEBS Lett.* **70**, 105-108.

Kobe, B., Heierhorst, J., Feil, S.C., Parker, M.W., Benian, G.M., Weiss, K.R., Kemp, B.E. (1996). *EMBO J.* **15**, 6810-6821.

Kruger, M., Wright, J., Wang, K. (1991). Nebulin as a length regulator of thin filaments of skeletal muscles: correlation of thin filament length, nebulin size, and epitope profile. *J. Cell Biol.* **115**, 97-107.

Kruse, C.H., Holden, K.G., Offen, P.H., Pritchard, M.L., Feild, J.A., Rieman, D.J., Bender, P.E., Ferguson, B., Greig, R.G., Poste, G. (1988b). Synthesis and evaluation of multisubstrate inhibitors of oncogene-encoded tyrosine-specific protein kinase. 2. *J. Med. Chem.* **31**, 1768-1772.

Kruse, C.H., Holden, K.G., Pritchard, M.L., Feild, J.A., Rieman, D.J., Greig, R.G., Poste, G. (1988a). Synthesis and evaluation of multisubstrate inhibitors of oncogene-encoded tyrosine-specific protein kinase. 1. *J. Med. Chem.* **31**, 1762-1767.

Kudryashov, D.S., Chibalina, M.V., Birukov, K.G., Lukas, T.J., Sellers, J.R., van Eldik, L.J., Watterson, D.M., Shirinsky, V.P. (1999). Unique sequence of high molecular weight myosin light chain kinase is involved in interaction with actin cytoskeleton. *FEBS Lett.* **463**, 67-71.

Labeit, S., Gautel, M., Lakey, A., Trinick, J. (1992). Towards a molecular understanding of titin. *EMBO J.* **11**, 1711-1716.

- Labeit, S. und Kolmerer B. (1995). Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* **270**, 293-296.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bakterioophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lawrence, D.S. und Niu, J. (1998). Protein kinase inhibitors: the tyrosine-specific protein kinases. *Pharmacol. Ther.* **77**, 81-114.
- Littlefield, R. und Fowler, V.M. (1998). Defining actin filament length in striated muscle: rulers and caps or dynamic stability? *Annu. Rev. Cell Biol.* **14**, 487-525.
- Loog, M., Uri, A., Raidaru, G., Järv, J., Ek, P. (1999). Adenosine-5'-carboxylic acid peptidyl derivatives as inhibitors of protein kinases. *Biorg. Med. Chem. Letters* **9**, 1447-1452.
- Madhusudan, Akamine, P., Xuong, N.-H., Taylor, S.S. (2002). Crystal structure of a transition state mimic of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Nature* **9**, 273-277.
- Maruyama, K. (1994). Connectin, an elastic protein of striated muscle. *Biophys. Chem.* **50**, 73-85.
- Maruyama, K., Matsubara, S., Natori, R., Nonomura, Y., Ohashi, K., Murakami, F., Handa, S., Eguchi, G. (1977). Connectin, an elastic protein of muscle. *J. Biochem.* **82**, 317-337.
- Maruyama, K., Yoshioka, T., Higuchi, H., Kimura, S., Natori, R. (1985). Connectin filaments link thick filaments and Z-lines in frog skeletal muscle as revealed by immunoelectron microscopy. *J. Cell Biol.* **101**, 2167-2172.
- Mayans, O., van der Ven, P.F.M., Wilm, M., Mues, A., Young, P., Fürst, D.O., Wilmanns, M., Gautel, M. (1998). Structural basis for the activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature* **395**, 863-869.
- Means, A.R. (1998). The clash in titin. *Nature* **395**, 846-847.

Medzihradzky, D., Chen, S.L., Kenyon, G.L., Gibson, B.W. (1994). Solid-phase synthesis of adenosine phosphopeptides as potential bisubstrate inhibitors of protein kinases. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 9413-9419.

Merrifield, R.B. (1963). Solid phase peptide synthesis. 1. Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149-2156.

Mett, H., Furet, P., Traxler, P., Fretz, H. (1997). 50. Synthesis of modified tripeptides and tetrapeptides as potential bisubstrate inhibitors of the epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase. *Helv. Chim. Acta* **80**, 653-670.

Meyer, T., Regenass, U., Fabbro, D., Alteri, E., Rosel, J., Muller, M., Caravatti, G., Matter, A. (1989). A derivative of staurosporine (CGP 41 251) shows selectivity for protein kinase C inhibition and in vitro anti-proliferative as well as in vivo anti-tumor activity. *Int. J. Cancer* **43**, 851-856.

Moncman, C.L. und Wang, K. (1995). Nebulette: a 107 kD nebulin-like protein in cardiac muscle. *Cell. Motil. Cytoskeleton* **32**, 205-225.

Moos, C., Offer, G., Starr, R., Bennet, P. (1975). Interaction of C-protein with myosin rod and light meromyosin. *J. Mol. Biol.* **97**, 1-9.

Mues, A., van der Ven, P.F.M., Young, P., Fürst, D.O., Gautel, M. (1998). Two immunoglobulin-like domains of the Z-disc portion of titin interact in a conformation dependent way with telethonin. *FEBS Lett.* **428**, 111-114.

Müller-Seitz, M., Kaupmann, K., Labeit, S., Jockusch, H. (1993). Chromosomal localization of the mouse titin gene and its relation to „muscular dystrophy with myositis“ and nebulin genes on chromosome 2. *Genomics* **18**, 559-561.

Nave, R., Fürst, D.O., Weber, K. (1989). Visualization of the polarity of isolated titin molecules: a single globular head on a long thin rod as the M band anchoring domain? *J. Cell. Biol.* **109**, 2177-2187.

Offer, G., Moos, C., Starr, R. (1973). A new protein of the thick filaments. Extraction, purification, and characterization. *J. Mol. Biol.* **74**, 653-676.

- Ohtsuka, H., Yajima, H., Maruyama, K., Kimura, S. (1997). The N-terminal Z repeat 5 of connectin/titin binds to the C-terminal region of alpha-actinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**, 1-3.
- Olsen, S.R. und Uhler, M.D. (1989). Affinity purification of the c alpha and c beta isoforms of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **264**, 18662-18666.
- Parang, K., Till, J.H., Ablooglu, A.J., Kohanski, R.A., Hubbard, S.R., Cole, P.A. (2001). Mechanism-based design of a protein kinase inhibitor. *Nature* **8**, 37-41.
- Pelin, K., Ridanpaa, M., Donner, K., Wilton, S., Krishnarajah, J., Laing, N., Kolmerer, B., Millevoi, S., Labeit, S., de la Chapelle, A., Wallgren-Pettersson, C. (1997). Refined localization of the genes for nebulin and titin on chromosome 2q allows the assignment of nebulin as a candidate gene for autosomal recessive nemaline myopathy. *Eur. J. Hum. Genet.* **5**, 229-234.
- Poperechnaya, A., Varlamova, O., Lin, P., Stull, J.T., Bresnick, A.R. (2000). Localization and activity of myosin light chain kinase isoforms during the cell cycle. *J. Cell Biology* **151**, 697-707.
- Ricouart, A., Gesquiere, J.C., Tartar, A., Sergheraert, C.J. (1991). Design of potent kinase inhibitors using the bisubstrate approach. *J. Med. Chem.* **34**, 73-78.
- Sarin, V.K., Kent, S.B.H., Tam, J.P., Merrifield, R.B. (1981). Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Analyt. Biochem.* **117**, 147-157.
- Sorimachi, H., Freiburg, A., Kolmerer, B., Ishiura, S., Stier, G., Gregorio, C.C., Labeit, D., Linke, W.A., Suzuki, K., Labeit, S. (1997). Tissue-specific expression and alpha-actinin binding properties of the Z-disc titin: implications of the nature of vertebrate Z-discs. *J. Mol. Biol.* **270**, 688-695.
- Starr, R. und Offer, G. (1978). The interaction of C-protein with heavy meromyosin and subfragment-2. *Biochem. J.* **171**, 813-816.
- Stryer, L. (1975). *Biochemistry*. W.H. Freeman and Company, San Francisco.

Takahashi, I., Kobayashi, E., Nakano, H., Murakata, C., Saitoh, H., Suzuki, H., Suzuki, K., Tamaoki, T. (1990). Potent selective inhibition of 7-O-methyl UCN-01 against protein kinase C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **255**, 1218-1221.

Tokuyasu, K.T., Maher, P.A. (1987a). Immunocytochemical studies of cardiac myofibrillogenesis in early chick embryos. I. Presence of immunofluorescent titin spots in premyofibril stages. *J. Cell Biol.* **105**, 2781-2793.

Tokuyasu, K.T., Maher, P.A. (1987b). Immunocytochemical studies of cardiac myofibrillogenesis in early chick embryos. II. Generation of  $\alpha$ -actinin dots within titin spots at the time of the first myofibril formation. *J. Cell Biol.* **105**, 2795-2801.

Trinick, J. (1994). Titin and nebulin: protein rulers in muscle? *TIBS* **19**, 405-409.

Valle, G., Faulkner, G., De Antoni, A., Pacchioni, B., Pallavicini, A., Pandolfo, D., Tiso, N., Toppo, S., Trevisan, S., Lanfranchi, G. (1997). Telethonin, a novel sarcomeric protein of heart and skeletal muscle. *FEBS Lett.* **415**, 163-168.

van der Ven, P.F.M., Bartsch, J.W., Gautel, M., Jockusch, H., Fürst, O. (2000). A functional knock-out of titin results in defective myofibril assembly. *J. Cell Sci.* **113**, 1405-1414.

van der Ven, P.F.M., Schaart, G., Croes, H.J.E., Jap, P.H.K., Ginsel, L.A., Ramaekers, F.C.S. (1993). Titin aggregates associated with intermediate filaments align along stress fiber-like structures during human skeletal muscle cell differentiation. *J. Cell Sci.* **106**, 749-759.

Vigoreaux, J.O. (1994). The muscle Z-band: lessons in stress management. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **15**, 237-255.

Vinkemeier, U., Obermann, W., Weber, K., Fürst, D.O. (1993). The globular head domain of titin extends into the center of the sarcomeric M-band. *J. Cell Sci.* **106**, 319-330.

Voet, D. und Voet, J.G. (1994). Biochemie. *VCH Verlag*, Weinheim.

- Walsh, D.A. und Glass, D.B. (1991). Utilization of the inhibitor protein of adenosine cyclic monophosphate-dependent protein kinase, and peptides derived from it, as tools to study adenosine cyclic monophosphate-mediated cellular processes. *Methods Enzymol.* **201**, 304-316.
- Wang, K., McClure, J., Tu, A. (1979). Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 3698-3702.
- Weisberg, A. und Winegrad, S. (1996). Alteration of myosin cross bridges by phosphorylation of myosin-binding protein C in cardiac muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8999-9003.
- Weisberg, A. und Winegrad, S. (1998). Relation between crossbridge structure and actomyosin ATPase activity in rat heart. *Circ. Res.* **83**, 60-72.
- Whiting, A., Wardale, J., Trinick, J. (1989). Does titin regulate the length of thick filaments? *J. Mol. Biol.* **205**, 263-268.
- Wilmanns, M., Gautel, M. und Mayans O. (2000). Activation of calcium/calmodulin regulated kinases. *Cell. Mol. Biol.* **46**, 883-894.
- Winegrad, S. (1999). Cardiac myosin binding protein C. *Circ. Res.* **84**, 1117-1126.
- Yang J., Drazba, J.A., Ferguson, D.G. und Bond, M. (1998). A-kinase anchoring protein 100 (AKAP100) is localized in multiple subcellular compartments in the adult rat heart. *J. Cell Biol.* **142**, 511-522.
- Young, P., Ferguson, C., Banuelos, S., Gautel, M. (1998). Molecular structure of the sarcomeric Z-disc: two types of titin interactions lead to an asymmetrical sorting of alpha-actinin. *EMBO J.* **17**, 1614-1624.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. Gautel danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit, die interessante Themenstellung, die vielen guten Ideen und die finanzielle Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. R.S. Goody danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens, die ständige Diskussionsbereitschaft und die finanzielle Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. W. Kreiser danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und das stetige Interesse gegenüber meiner Arbeit.

Meiner Arbeitsgruppe mit Nathalie, Mathias, Cristina, Andrei und Elena danke ich für die erstklassige Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft. Mathias danke ich weiterhin für das Korrekturlesen.

Christian, Goran, Andrea, Petra, Almut, Heike und Lili danke ich für die vielen lustigen Stunden im Labor und die große Hilfsbereitschaft. Almut danke ich weiterhin für ihre „Glückshaarspange“, ohne die vielleicht alles anders gelaufen wäre...

Jochen, Sandra und Janina danke ich für die Unterstützung rund um das Thema Kinetik.

Allen weiteren Mitarbeitern aus dem Labor B 2.15 und der Abteilung III danke für die gute Arbeitsatmosphäre und die vielen kleinen und grossen Hilfestellungen.

Dörte und Kerstin von den „Waldmännern“ danke ich für die Aufnahme zahlloser Massenspektren und einen ständigen Probenplatz im vorderen Drittel des Autosamplers.

Bernhard Griewel danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Den Mitarbeitern der Zentralen Einrichtungen danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Daniel Soong danke ich für die Hilfe bei den Mikroinjektionen.

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich für ihre Unterstützung in jeglichen Belangen.

Meinem Sohn Julius danke ich für viel Sonnenschein und Freude nach der Arbeit sowie das gute Gefühl zu wissen, wofür man eigentlich arbeitet.

Meiner Frau Annette danke ich für ihr Verständnis, ihre moralische Unterstützung und vieles, vieles mehr.

## Lebenslauf

<b>Persönliche Daten:</b>	Name:	Gereon Johannes Franzen
	Geburtsdatum:	08.05.1973
	Geburtsort:	Lüdinghausen
	Familienstand:	verheiratet, ein Kind
	Nationalität:	deutsch
<b>Schulbildung:</b>	08/1979 - 07/1983	Grundschule „Auf den Äckern“, Bork
	08/1983 - 06/1992	St. Christophorus Gymnasium, Werne
<b>Bundeswehr:</b>	10/1992 - 12/1992	Grundausbildung im Luftwaffenausbildungsregiment 1, Goslar
	01/1993 - 09/1993	Luftwaffenkraftfahrzeugtransportstaffel 61, Oldenburg (Oldb.)
<b>Studium:</b>	10/1993 - 11/1998	Chemie an der Universität Dortmund
	02/1999 - 09/1999	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund mit dem Thema: „Untersuchungen an neuartigen Nukleotid-Analoga zur allelspezifischen Markierung der direkten Substrate von Serin/Threonin-Kinasen“
	seit 11/1999	Promotion am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund