



DESIGN UND SYNTHESE EINES  
SPEZIFISCHEN INHIBITORS DER  
*MIRCOTUBULE AFFINITY*  
*REGULATING KINASE (MARK)*

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Department Chemie

vorgelegt von

**Robin Job**

im September 2010



**meinen Eltern**



*Die Wissenschaft, richtig verstanden, heilt den Menschen von seinem Stolz;  
denn sie zeigt ihm seine Grenzen.*

Albert Schweitzer



Die praktischen Arbeiten der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Juni 2005 bis Oktober 2009 am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Bernd Meyer, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Bernd Meyer danke ich für die Überlassung des Themas und die stets wertvolle, freundliche und motivierende Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.



1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Meyer

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Wittko Francke

Tag der Disputation: 19.11.2010



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Aminosäuren</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die Alzheimer-Krankheit.....	1
1.2 Pathologie der Alzheimer-Krankheit.....	2
1.3 Amyloide Plaques.....	4
1.4 Neuronen und Mikrotubuli.....	6
1.5 Die Kinase MARK.....	8
1.6 Das Tau-Protein.....	11
1.7 Ursachen, Diagnose und Therapieansätze.....	16
<b>2 Methoden</b> .....	<b>19</b>
2.1 Peptidsynthese.....	19
2.2 Oberflächenplasmonenresonanz (SPR).....	22
2.3 Molecular modelling.....	26
2.4 Kinase-Assays.....	28
<b>3 Problemstellung</b> .....	<b>31</b>
<b>4 Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>32</b>
4.1 Übersicht der synthetisierten Peptide.....	32
4.2 Peptid-Synthese und -Untersuchung.....	33
4.2.1 Synthese der Peptide und Phosphopeptide.....	33
4.2.2 SPR-Studien der Peptide und Phosphopeptide.....	33
4.3 molecular modelling.....	43
4.3.1 Strukturoptimierungen.....	44
4.3.2 Definition der ATP-Bindungskavität.....	46
4.3.3 <i>Docking</i> .....	48
4.3.4 Modelle des regulatorischen <i>loops</i> .....	57

4.3.5 Potentielle Inhibitoren .....	73
4.4 Übersicht der synthetisierten Substanzen .....	78
4.5 Synthese der inhibitorischen Bausteine für die Peptidsynthese .....	81
4.6 Übersicht der inhibitorischen Peptide .....	88
4.7 Synthese der inhibitorischen Peptide .....	91
4.8 SPR-Messungen der inhibitorischen Peptide .....	96
4.9 Ergebnisse der Kinase-Assays .....	108
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>125</b>
<b>6 Summary.....</b>	<b>129</b>
<b>7 Experimenteller Teil .....</b>	<b>132</b>
7.1 Verwendete Chemikalien.....	132
7.2 Verwendete Geräte und Materialien .....	134
7.3 Peptidsynthesen.....	135
7.3.1 Automatisierte Festphasenpeptidsynthese .....	135
7.3.2 Manuelle Kupplung von Aminosäuren.....	136
7.3.3 Photometrische Bestimmung der Kupplungsausbeute .....	136
7.3.4 Abspaltung der Peptide von der Festphase .....	137
7.3.5 Reinigung der Peptide mittels RP-HPLC .....	137
7.3.6 MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	140
7.3.7 Charakterisierung der Peptide durch NMR .....	142
7.4 Molecular modelling.....	158
7.4.1 Docking-Experimente.....	158
7.4.2 Modelle für die regulatorische Schleife.....	159
7.4.3 Design potentieller Inhibitoren.....	160
7.5 Synthese der inhibitorischen Bausteine .....	162
7.5.1 Synthese von 4-Brombutansäurebenzylester ( <b>12</b> ) .....	162
7.5.2 Synthese von 4-(6'-Aminopurin-9'-yl)-butansäurebenzylester ( <b>13</b> ) .....	163
7.5.3 Synthese von 4-[( <i>N, N</i> -Di-( <i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)]-butansäurebenzylester ( <b>14</b> ) .....	164

7.5.4 Synthese von 4-[( <i>N, N</i> -Di-( <i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)]-butansäure ( <b>15</b> ) .....	165
7.5.5 Synthese von 5-Brompentansäurebenzylester ( <b>18</b> ) .....	166
7.5.6 Synthese von 5-(6'-Aminopurin-9'-yl)-pentansäurebenzylester ( <b>19</b> ) .....	167
7.5.7 Synthese von 5-[( <i>N, N</i> -Di-( <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)]-pentansäurebenzylester ( <b>20</b> ) .....	168
7.5.8 Synthese von 5-[( <i>N, N</i> -Di-( <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)]-pentansäure ( <b>21</b> ) .....	169
7.5.9 Synthese von $N_{\alpha}$ -Fluorenylmethyloxycarbonyl- $N_{\epsilon}$ -(4-[ <i>N, N</i> -di-( <i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)]-butylcarbonyl)-L-lysinbenzylester ( <b>16</b> ) .....	170
7.5.10 Synthese von $N_{\alpha}$ -Fluorenylmethyloxycarbonyl- $N_{\epsilon}$ -(4-[ <i>N, N</i> -di-( <i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)]-butylcarbonyl)-L-lysin ( <b>17</b> ) .....	171
7.5.11 Synthese von $N_{\alpha}$ -Fluorenylmethyloxycarbonyl- $N_{\epsilon}$ -(5-[ <i>N, N</i> -di-( <i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)]-pentylcarbonyl)-L-lysinbenzylester ( <b>22</b> ) .....	173
7.5.12 Synthese von $N_{\alpha}$ -Fluorenylmethyloxycarbonyl- $N_{\epsilon}$ -(5-[ <i>N, N</i> -di-( <i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)]-pentylcarbonyl)-L-lysin ( <b>23</b> ) .....	174
7.5.13 Synthese von 5-(6-Amino-purin-9-yl)-pentannitril ( <b>24</b> ) .....	176
7.5.14 Synthese von 5-[ <i>N, N</i> -Di-( <i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-(6'-amino-purin-9'-yl)]-pentannitril ( <b>25</b> ) .....	177
7.5.15 Synthese von 5-[ <i>N, N</i> -Di-( <i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-(6'-amino-purin-9'-yl)]-pentanamin ( <b>26</b> ) .....	178
7.5.16 Synthese von 6-(6'-Amino-purin-9'-yl)-hexannitril ( <b>29</b> ) .....	179
7.5.17 Synthese von 6-[ <i>N, N</i> -Di-( <i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-(6'-amino-purin-9'-yl)]-hexannitril ( <b>30</b> ) .....	180
7.5.18 Synthese von 6-[ <i>N, N</i> -Di-( <i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-(6'-amino-purin-9'-yl)]-hexanamin ( <b>31</b> ) .....	181
7.6 SPR-Mesungen .....	182
7.6.1 Immobilisierung von MARK .....	182
7.6.2 Konzentrationsreihen .....	183
7.7 Kinase-Assays .....	184
7.7.1 Kinase-Assay mit radioaktiv dotiertem ATP .....	184
7.7.2 FRET-Assay .....	185

<b>8 Toxikologie .....</b>	<b>186</b>
<b>9 Literatur .....</b>	<b>188</b>
<b>10 Anhang.....</b>	<b>195</b>
10.1 Proteinsequenzen .....	195
10.2 Substanzübersicht .....	198
<b>11 Danksagung .....</b>	<b>203</b>
<b>12 Lebenslauf und Erklärungen.....</b>	<b>206</b>



## Abkürzungsverzeichnis

1D, 2D	ein-, zweidimensional
Ac <sub>2</sub> O	Essigsäureanhydrid
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycimtsäure
CI	<i>chemical ionisation</i>
CV	Säulenvolumen ( <i>column volume</i> )
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	<i>N,N</i> -Di- <i>iso</i> -propylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSP	<i>dose-response</i>
DTT	Dithiothreitol
EA	Ethanolamin
EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
EI	Elektronenstoß-Ionisation
EM	Exakte Masse
ESI	<i>electron-spray-ionisation</i>
FID	<i>free induction decay</i>
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
FTIR	<i>fourier transformed infrared spectroscopy</i>
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HD	Hymenialdisin
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum correlation</i>
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>

$k_{\text{on}}$	Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
$k_{\text{off}}$	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
$K_{\text{D}}$	Gleichgewichtskonstante der Dissoziation
LC	<i>liquid chromatography</i>
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption / ionisation - time of flight</i>
MAP	<i>microtubule associated protein</i>
MARK	<i>microtubule affinity regulating kinase</i>
MeCN	Acetonitril
MS	Massenspektrometrie
MW	<i>molecular weight</i>
NFT	Neurofibrillenbündel
NOE	<i>nuclear overhauser enhancement</i>
NOESY	<i>nuclear overhauser enhancement and exchange spectroscopy</i>
OSB	<i>one site binding</i>
PAL	<i>peptide amide linker</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PEG	Polyethylenglycol
PHF	<i>paired helical filaments</i>
PS	<i>polystyrene support</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylchlorid
RNA	Ribonukleinsäure
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
RU	<i>resonance unit</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
STD	<i>saturation transfer difference</i>
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluoroborat
tBu	<i>tert</i> -Butyl
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i>
TFE	2,2,2-Trifluorethanol
TIPS	Tri- <i>iso</i> -propylsilan
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
Trt	Trityl (Triphenylmethyl)
WATERGATE	<i>water suppression by gradient tailored excitation</i>
WHO	<i>world health organization</i>

# Aminosäuren

Aminosäure	Abkürzung	Code	Schutzgruppe
Alanin	Ala	A	
Arginin	Arg	R	Pbf
Asparagin	Asn	N	Trt
Asparaginsäure	Asp	D	<i>t</i> Bu
Cystein	Cys	C	Trt
Glutamin	Gln	Q	Trt
Glutaminsäure	Glu	E	<i>t</i> Bu
Glycin	Gly	G	
Histidin	His	H	Trt
Isoleucin	Ile	I	
Leucin	Leu	L	
Lysin	Lys	K	Boc
Methionin	Met	M	
Phenylalanin	Phe	F	
Prolin	Pro	P	
Serin	Ser	S	<i>t</i> Bu
Threonin	Thr	T	<i>t</i> Bu
Tryptophan	Trp	W	Boc
Tyrosin	Tyr	Y	<i>t</i> Bu
Valin	Val	V	

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Alzheimer-Krankheit

Im Jahr 1907 diagnostizierte der Arzt Alois Alzheimer erstmals eine neuartige neurodegenerative Erkrankung.<sup>1</sup> Aufgrund von Mechanismen, die bis heute nicht vollständig aufgeklärt sind, beginnen Neuronen in immer größeren Mengen abzusterben. Je intensiver ein Gehirnareal dadurch betroffen ist, desto stärker ist die Beeinträchtigung der dort angesiedelten Funktionen. Die ersten Symptome sind leichte Vergesslichkeit und reichen im fortgeschrittenen Stadium über Konfusion, das Nichterkennen nahestehender Personen bis hin zum Verlust von unbewussten Funktionen wie der Steuerung von Organen. Morbus Alzheimer manifestiert sich in zunehmendem Maß im Alter und entwickelt sich über einen Zeitraum von mehreren Jahren. Die Krankheit endet immer tödlich, Ursache ist meist eine Infektion als Folge der langen Bettlägerigkeit. Weltweit waren im Jahr 2009 schätzungsweise 18 Millionen Menschen von Morbus Alzheimer betroffen, davon 1,4 Millionen in Deutschland.<sup>2</sup> Mit zunehmendem Alter steigt der Anteil der Demenzkranken in der Bevölkerung rapide an, bei den über 90-Jährigen beträgt er bereits mehr als ein Drittel (siehe Abb. 1-1).<sup>3</sup> Medizinisch wird der Verlauf der Krankheit in drei Phasen eingeteilt. Am Anfang sind es noch leichte Gedächtnis- und Wortfindungsstörungen, unter denen die Patienten leiden; danach folgt der langsame Verlust der Selbstständigkeit, Orientierungslosigkeit, Stimmungsschwankungen und Wahnvorstellungen. In Phase 3 versagt das Gedächtnis gänzlich, Sprache und Motorik sind kaum noch vorhanden. Die Patienten sind apathisch, Kauen und Schlucken wird immer schwieriger, und sie nehmen sich selbst und ihre Umgebung kaum noch wahr.<sup>4, 5</sup> Sicher diagnostizieren lässt sich die Krankheit lediglich *post mortem* durch eine pathologische Untersuchung des Gehirns. Der Beweis wird durch das Vorhandensein von charakteristischen Proteinablagerungen geliefert, die schon Alois Alzheimer entdeckte. Die meisten heute angewandten Tests zur Charakterisierung von Demenzen wie der *mini-mental-state-examination*-Test von Galasko sind psychiatrischer Natur und lassen keine eindeutige Diagnose zu.<sup>6</sup> Die Suche nach eindeutigen Biomarkern in Blut oder Rückenmarksflüssigkeit hat bisher keine zuverlässigen Daten liefern können.<sup>7-12</sup> Die molekularen Mechanismen von Alzheimer und die des natürlichen Alterns überlagern sich

und machen so eine exakte Diagnose sehr schwierig, zumal die Vorgänge hinter dieser Demenz nicht restlos verstanden sind.<sup>13</sup>

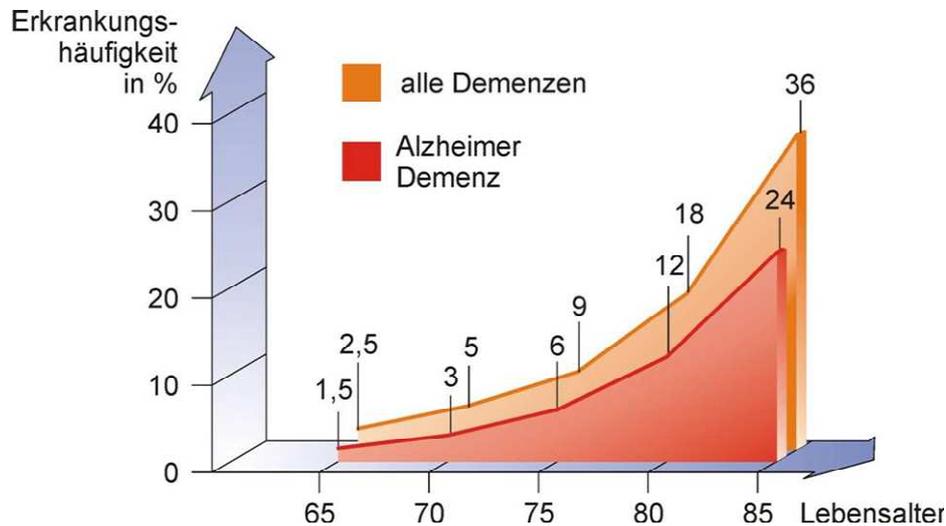


Abbildung 1-1: Zusammenhang zwischen Demenzen und Lebensalter<sup>3</sup>. Statistisch betrachtet ist mehr als jeder dritte im Alter von 85 Jahren an Demenz erkrankt. Rund 65 % dieser Menschen leiden unter Morbus Alzheimer. In der Altersgruppe der 95 jährigen sind diese Zahlen doppelt so hoch.<sup>3</sup>

Momentan liegen die Behandlungskosten je nach Schwere der Krankheit zwischen 40.000 und 90.000 € pro Patient und Jahr.<sup>3</sup> 2002 wurde das deutsche Gesundheitssystem mit Behandlungskosten für Demenzen in der Höhe von 5,6 Milliarden € belastet, was 2,5 % der Gesamtausgaben entspricht.<sup>14</sup> Es wird geschätzt, dass im Jahr 2025 bereits 34 Millionen Menschen weltweit an Alzheimer erkrankt sein werden und sich diese Zahl etwa alle 20 Jahre verdoppeln wird.<sup>2</sup> Diese Tatsachen werden sich zusammen mit der Stagnation der Geburtenraten in den Industrieländern und der zunehmenden Lebenserwartung als große Belastung für die Gesundheitssysteme erweisen. Erfolgreiche Behandlungsstrategien, die den Krankheitsverlauf hinauszögern, könnten zu enormen finanziellen Entlastungen führen.

## 1.2 Pathologie der Alzheimer-Krankheit

Das physiologische Altern eines Menschen geht nicht zwangsläufig mit geistigem Verfall einher. Einige Prozesse des Alterungsvorgangs laufen im Falle einer Alzheimer-Erkrankung jedoch extrem beschleunigt ab, was zum Absterben immer größerer Mengen an Neuronen und damit zwangsläufig zum Verlust kognitiver Fähigkeiten führt.<sup>13</sup> Man unterscheidet in diesem

## Einleitung

Zusammenhang die sporadische von der erblichen Alzheimer-Erkrankung. Die familiäre Variante zeichnet sich durch Fehl- beziehungsweise Überfunktionen der beteiligten Proteine aus und zeigt in der Regel wesentlich früher Symptome als die sporadisch auftretende Variante.<sup>15, 16</sup>

Auf molekularer Ebene findet man zwei verschiedene Proteinablagerungen im Gehirn Betroffener. Hierbei handelt es sich zum einen um extrazelluläre amyloide Plaques und zum anderen um intrazelluläre neurofibrilläre Bündel, die in Abbildung 1-2 im Vergleich zu gesundem Gehirngewebe dargestellt sind.

Das Fortschreiten der Erkrankung beeinträchtigt die Funktionen des Gehirns in zunehmendem Maß und wurde von Braak *et al.* im Jahre 1991 nach gründlicher Auswertung von Patientendaten und anhand der Autopsie von 83 Gehirnen in sechs Stufen eingeteilt.<sup>17</sup> In den ersten vier Stufen treten zunehmend Ablagerungen und Funktionsstörungen im enthorinalen Cortex auf. In diesen Bereichen werden durch Ohren und Augen eingehende Signale einer ersten Bearbeitung unterzogen und mit anderen Impulsen zu Gedächtnisinhalten verarbeitet, die anschließend an den Hippocampus weitergeleitet werden.<sup>18</sup> Durch die Beschädigung dieser Regionen gehen langsam Gedächtnis und Sprache verloren. Die letzten beiden Stufen beschreiben den Verfall fast sämtlicher Gehirnregionen mit den beschriebenen dramatischen Folgen für den Patienten.

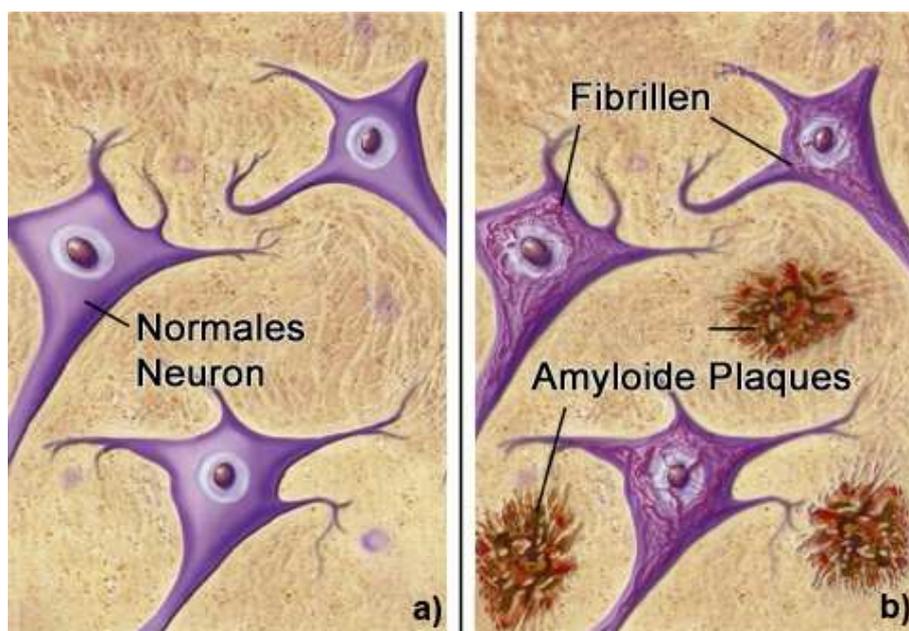


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung a) gesunder und b) an Alzheimer erkrankter Neuronen, die durch amyloide Plaques im extrazellulären Raum und Fibrillen im intrazellulären Raum gekennzeichnet sind.<sup>3</sup>

### 1.3 Amyloide Plaques

In geringen Mengen sind amyloide Plaques Teil des natürlichen Alterungsprozesses. Die Bezeichnung amyloid beruht auf der Färbbarkeit durch Jodreagenzien.<sup>19</sup> Ihr Basisbaustein ist das Amyloid- $\beta$ -Peptid, ein Fragment des Amyloid-Precursor-Proteins (APP). APP ist ein Typ-I-Transmembranprotein, welches in allen Nervenzellen des gesamten Körpers vorkommt und je nach Isoform zwischen 753 und 770 Aminosäuren lang ist.<sup>20</sup> Seine Funktion ist weitestgehend ungeklärt, es wird aber angenommen, dass es unter anderem bei der Bildung von Synapsen eine Rolle spielt. Auf der Oberfläche von Neuronen ist APP insbesondere in den axonalen und dendritischen Bereichen stark angereichert.

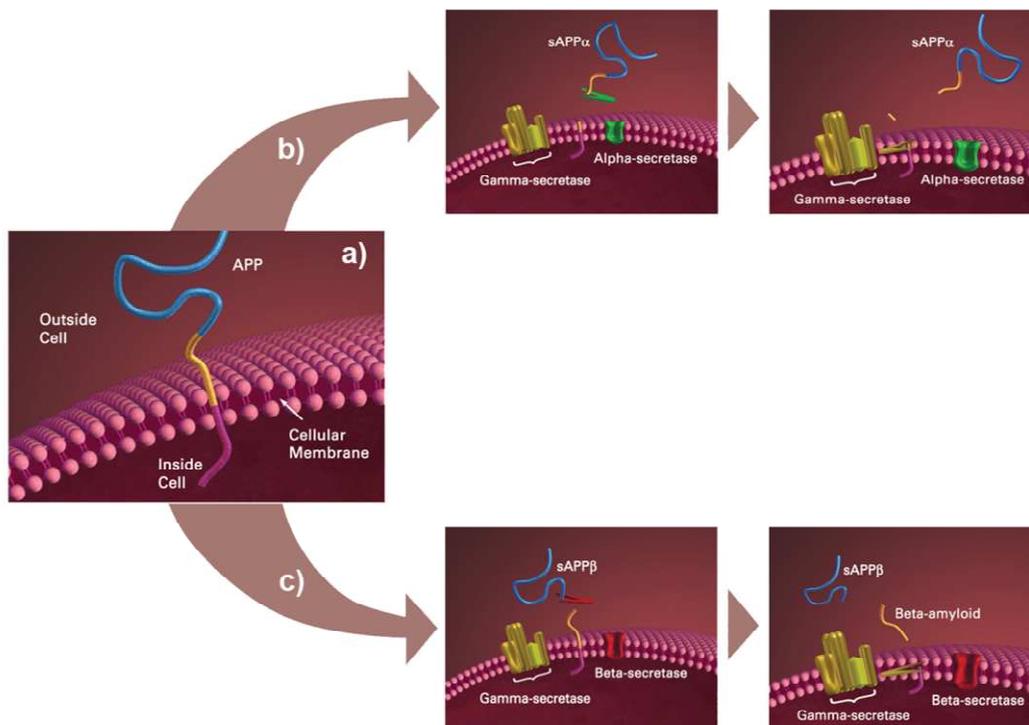


Abbildung 1-3: Ablauf der APP-Prozessierung. a) APP in der Membran. Der orange Bereich symbolisiert das amyloide Peptid; b) physiologischer Weg, auf dem sAPP $\alpha$  entsteht. Die Alphasekretase schneidet den amyloiden Bereich mittig und es entsteht kein pathogenes Peptid; c) amyloidogener Weg. Gamma- und Beta-Sekretase schneiden den amyloiden Bereich aus APP aus, es entstehen sAPP $\beta$  und das Amyloid- $\beta$ -Protein.<sup>3</sup>

APP wird in zwei verschiedenen Varianten abgebaut (siehe Abbildung 1-3 und 1-4). Auf dem physiologischen Weg spalten erst  $\alpha$ - und dann  $\gamma$ -Sekretase das APP, es entstehen sAPP $\alpha$ , ein 74 kDa Protein mit unbekannter Funktion, und das p3-Peptid mit einer Größe von 3 kDa. Auf

## Einleitung

dem amyloiden Weg prozessieren die  $\beta$ - und die  $\gamma$ -Sekretase das APP, es entstehen 2 Fragmente: das sAPP $\beta$  (72 kDa) und das Amyloid- $\beta$ -Protein mit etwa 4 kDa.<sup>21, 22</sup> Dieser Vorgang läuft mit einer gewissen Varianz ab, weshalb die Länge des amyloiden Fragments zwischen 39 und 42 Aminosäuren beträgt.

Während die Spaltung der  $\gamma$ -Sekretase an der Zelloberfläche stattfindet, verläuft die zweite Hälfte des amyloiden Pfades im Inneren der Zelle. Teile der Membran, die hohe Konzentrationen der Aspartatprotease  $\beta$ -Sekretase aufweisen, werden durch Endozytose abgeschnürt und wandern über das *trans*-Golgi-Netzwerk wieder zur Zellwand zurück.<sup>23</sup> Beim Verschmelzen der Endosomen mit der Zellmembran werden Amyloid- $\beta$ -Proteine in den extrazellulären Raum entlassen, wo ihre Aggregation beginnt.<sup>24, 25</sup>

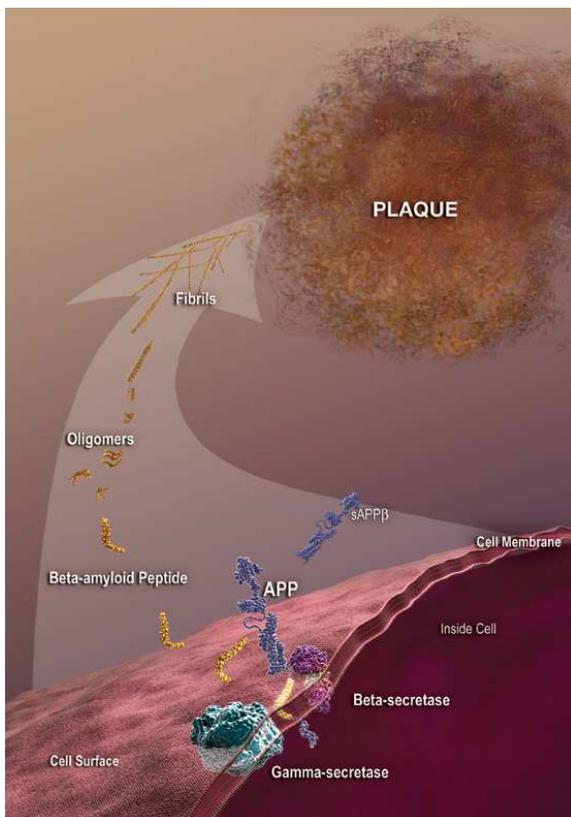


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der Entstehung der amyloiden Plaques.  $\gamma$  und  $\beta$ -Sekretase schneiden Amyloid- $\beta$ -Peptide aus APP aus. Diese beginnen nach der Freisetzung aus den Endosomen in den extrazellulären Bereich zu oligomerisieren und bilden letztendlich Plaques.<sup>26</sup>

Bei einem pH-Wert von circa 7 an der Zelloberfläche ist die Aktivität der  $\beta$ -Sekretase relativ gering, was sich jedoch im sauren Milieu der Endosomen ändert. Der pH-Wert entspricht hier in etwa dem pH-Optimum der Sekretase (pH Optimum bei pH=5.5). So entsteht der Großteil des im extrazellulären Bereich aggregierenden Proteins paradoxerweise im Inneren der Zelle. Systematische neuropathologische Untersuchungen an älteren Patienten haben gezeigt, dass sich Amyloid- $\beta$ -Proteine ohne Demenzsymptome zu erzeugen im Gehirn anreichern können.

Und dies in denselben Größenordnungen, die auch bei erwiesenen Alzheimer-Patienten nachgewiesen wurden.<sup>27</sup> Die Bereiche mit starken neuronalen Schäden korrelieren kaum mit den Arealen, in denen die Plaques aus Amyloid- $\beta$ -Proteinen in größeren Anhäufungen auftreten.<sup>28-30</sup> Dies lässt vermuten, dass die Plaques weder Ursache noch Hauptsymptom der Demenz sind, auch wenn in einigen Modellsystemen die Verringerung der Plaques durch entsprechende Antikörper die Symptome der Demenz gemildert haben.<sup>31</sup>

Allerdings sind die zugrunde liegenden Mechanismen noch ungeklärt und es existieren auch gegenteilige Studien.<sup>31, 32</sup> Ein möglicher Zusammenhang könnte mit der noch nicht vollständig bewiesenen Bildung von Ionenkanälen in den Zellmembranen durch Amyloid- $\beta$ -Oligomere bestehen.<sup>33, 34</sup> Für diese Mischungen aus Tri- bis Oktameren konnte nachgewiesen werden, dass sie die ionische Homöostase stören und so mit weitreichenden Folgen in den Zellstoffwechsel eingreifen können.

### 1.4 Neuronen und Mikrotubuli

Rund 100 Milliarden ( $10^{11}$ ) Neuronen kommunizieren im menschlichen Gehirn über etwa 100 Billionen ( $10^{14}$ ) Synapsen miteinander und erzeugen so einzigartige elektrische Muster. Im Gegensatz zu „normalen“ Zellen besitzen Neuronen neben dem mit Zytoplasma und Organellen gefüllten Zellkörper (Soma) 2 unterschiedliche Arten von Fortsätzen. Dabei handelt es sich zum einen um die sogenannten Dendriten, plasmatische Verästelungen mit geringer Reichweite, und zum anderen um das Axon, welches mit den Dendriten anderer Neuronen verbunden ist und eine deutlich größere Reichweite besitzt (siehe Abbildung 1-5). Dendritische Fasern empfangen Aktionspotenziale von den Axonen anderer Zellen und leiten sie ihrerseits weiter. Da die Länge der Axone bis ins Makroskopische hineinreicht, wird ein System benötigt, um das Axonende effektiv mit Energie und Nährstoffen zu versorgen, damit die Aufrechterhaltung der elektrischen Muster gewährleistet werden kann.

Eine besondere Rolle spielen in diesem Zusammenhang die Mikrotubuli, lineare Proteinpolymere, die eine Vielzahl an Aufgaben erfüllen. Das Protein Tubulin ist 55 kDa schwer, 450 Aminosäuren lang und kommt beim Menschen in erster Linie als  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin vor.<sup>35, 36</sup> Beide Varianten treten in einer Vielzahl von Isoformen auf. Im nativen Zustand liegen sie als Monomere oder Heterodimere vor.<sup>37</sup> Letztere aggregieren zu Protofilamenten, deren Enden unterscheidbar sind. Ein Ende neigt zur Anlagerung von weiteren Heterodimeren, das andere Ende zur Dissoziation.

## Einleitung

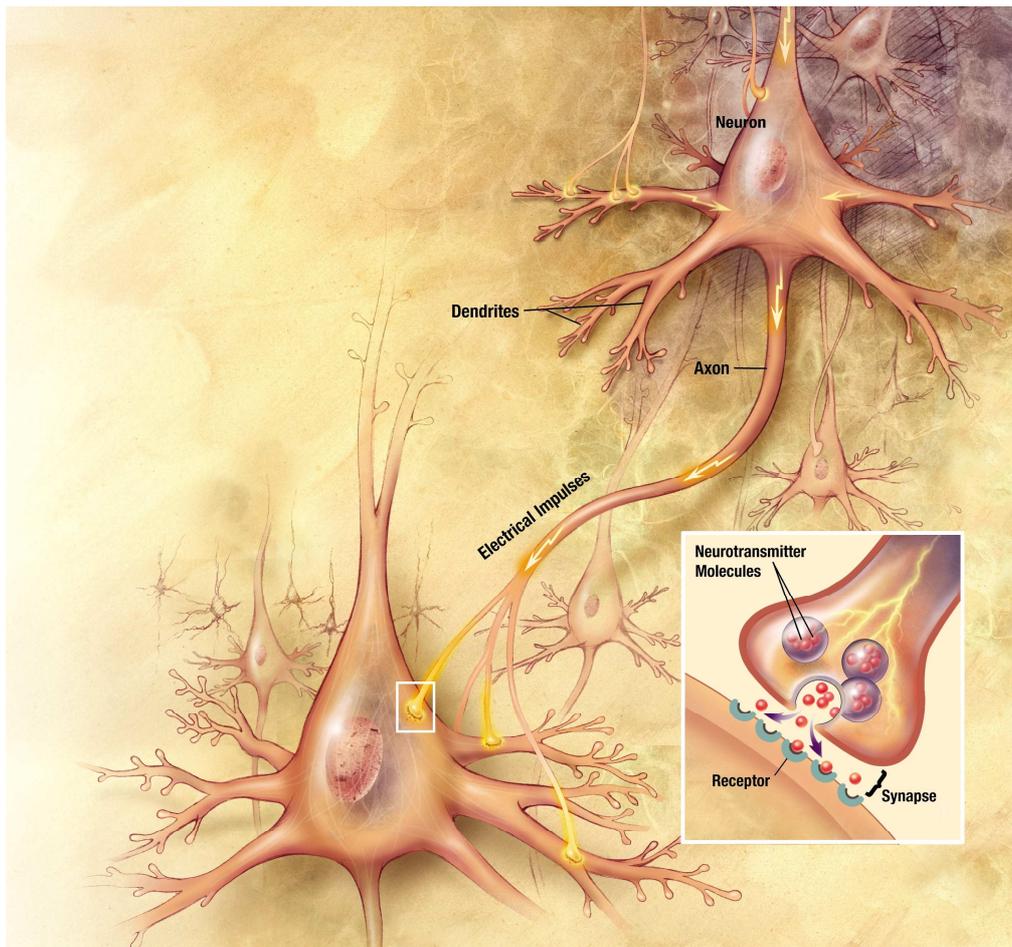


Abbildung 1-5: Darstellung der Verknüpfung der Somata von Neuronen über synaptische Verbindungen zwischen Axonen und Dendriten. Elektrische Signale werden von weiter außerhalb an das obere Neuron gesendet. Dessen Axon transportiert die Elektrizität zu verschiedenen Kontakten mit dem unteren Neuron. An diesen Synapsen werden die Signale durch Neurotransmitter an Rezeptoren der empfangenden Dendriten übertragen.<sup>26</sup>

Diese Protofilamente aggregieren in Gegenwart stabilisierender Proteine zu röhrenförmigen Strukturen mit einem Außendurchmesser von etwa 24 nm und einem Innendurchmesser von 14 nm. Sie bilden zusammen mit anderen Filamenten das Zytoskelett und geben so der Zelle ihre Form; sie sind für die koordinierten Bewegungen von Geißeln verantwortlich, die zum Beispiel die Bewegungen von Spermien lenken; sie bilden die Spindelfasern, die während Mitose und Meiose Chromosomen positionieren, und sie bilden die Transportwege, auf denen Kinein und Dynein die Synapse am Axonende mit Nährstoffen versorgen und Metabolite zurück zum Soma transportieren.<sup>35</sup>

Diese komplexen Netzwerke befinden sich in einem dynamischen Gleichgewicht und werden stetig auf- und abgebaut, ein Vorgang, der von sogenannten *microtubule associated proteins* (MAPs) unterstützt und koordiniert wird. Zu diesen gehören MAP1 (345 kDa), MAP2 (271-

286 kDa) sowie die Tau-Proteine (55-77 kDa). MAPs werden durch komplexe Regulierungskaskaden aktiviert, deaktiviert und reguliert; sie unterstützen aktiv die Assemblierung der Protofilamente zu größeren Strukturen.

Innerhalb eines Axons befinden sich mehrere Mikrotubuli, auf denen in regelmäßigen Abständen MAPs und Tau-Proteine nicht-kovalent gebunden sind und die helikale Struktur der miteinander verknüpften Tubulinheterodimere stabilisieren.<sup>38</sup>

Die Menge der gebundenen Tau-Proteine wird durch den Grad der Phosphorylierung von Tau gesteuert. Ist Tau hyperphosphoryliert, dissoziiert es von den Mikrotubuli ab, und deren Struktur wird instabil. Wird Tau nicht in ausreichendem Maß phosphoryliert, binden zu viele Moleküle an die Mikrotubuli und der Bewegungsmechanismus der Motormoleküle wird gestört. Die *microtubule affinity regulating kinase* (MARK) spielt eine besondere Rolle im Rahmen der Regulation des Phosphorylierungsgrades von Tau.

### 1.5 Die Kinase MARK

Kinasen sind Enzyme, die Phosphatgruppen auf Substrate übertragen, die entsprechenden Antagonisten werden Phosphatasen genannt. Durch das Einführen oder Entfernen einer großen polaren Gruppe werden häufig konformationelle Änderungen induziert, die ein Protein aktivieren, deaktivieren oder anderweitig regulieren können. Die Übertragung von Phosphatgruppen ist einer der wichtigsten Regulationsmechanismen in der Zelle.

518 von den rund 31000 Genen des humanen Genoms kodieren Kinasen.<sup>39</sup> Bei circa 90 % dieser Proteine handelt es sich um Serin-/Threoninkinasen, die das  $\gamma$ -Phosphat eines Adenosin- oder Guanosintriphosphats auf die Hydroxyl-Gruppe der Seitenkette eines Serins oder Threonins übertragen.

Die Einteilung der eukaryotischen Proteinkinasen erfolgt anhand ihrer Kinasedomänen, die 250 bis 270 Aminosäuren umfassen und bis auf wenige atypische Ausnahmen einen analogen Aufbau aus 11 Subdomänen aufweisen (siehe Abbildung 1-6). Diese verfügen über eine hochkonservierte Anordnung von sekundären Strukturelementen wie  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern. Die wichtigsten Unterscheidungsmerkmale liegen in den Substratbindungsregionen und zusätzlichen regulatorischen Bereichen.

Die Kinase MARK (*microtubule affinity regulating kinase*, 110 kDa) ist für die Aufrechterhaltung des dynamischen Gleichgewichts der Mikrotubuli von essenzieller Bedeutung.<sup>40, 41</sup> Ein besonders wichtiges Strukturelement dieses Proteins ist der regulatorische

## Einleitung

*loop* (Subdomäne VIII in Abbildung 1-6), dessen Konformation darüber bestimmt, ob das aktive Zentrum für Substrate zugänglich ist oder nicht. Der Aktivierungs-*loop* beinhaltet 2 wichtige Phosphorylierungsstellen, die die Aktivität des Enzyms steuern.

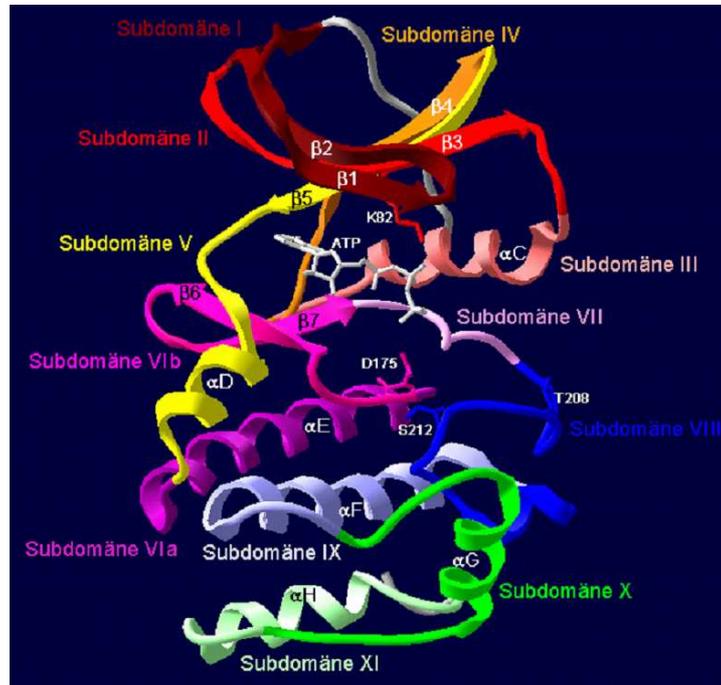


Abbildung 1-6: Schema des Aufbaus typischer eukaryotischer Proteinkinasedomänen. Das katalytische Zentrum (erkennbar am gebundenen ATP (weiß)) liegt an der Schnittstelle der beiden Untereinheiten, die jeweils von den Subdomänen I bis V und VIa bis XI gebildet werden. Von besonderer Wichtigkeit ist die Aktivierungsschleife (Subdomäne VIII), deren Konformation darüber bestimmt, ob das katalytische Zentrum zugänglich ist oder nicht.

MARKK, eine MARK aktivierende Kinase, phosphoryliert Thr<sup>208</sup>. Die darauf folgende Konformationsänderung gibt den Zugang zum katalytischen Zentrum frei. Wird das benachbarte Ser<sup>212</sup> hingegen durch Gsk3 $\beta$  phosphoryliert, positioniert sich die Schleife ungeachtet einer Phosphorylierung an Thr<sup>208</sup> so, dass kein Substrat mehr gebunden werden kann (siehe Abbildung 1-7).<sup>42</sup>

## Einleitung

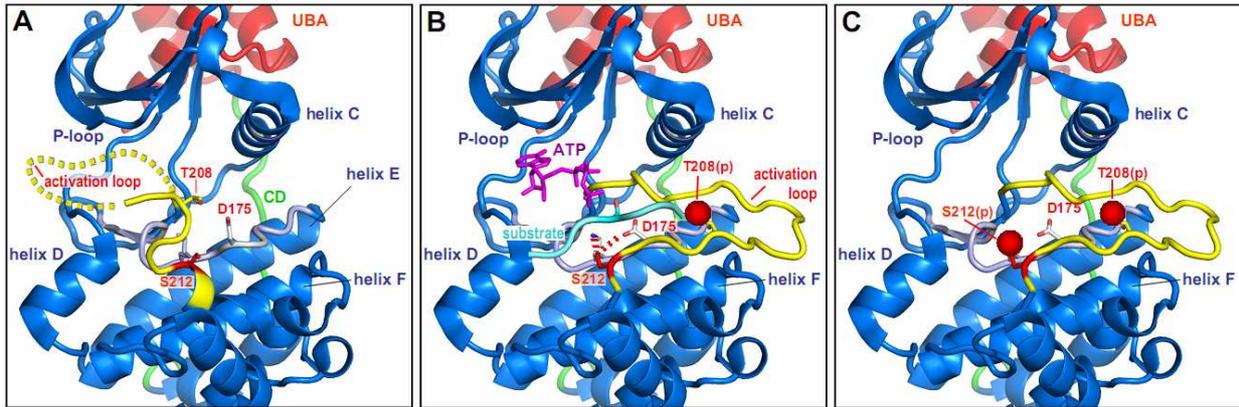


Abbildung 1-7: Modell der durch Phosphorylierung erzeugten Konformationsänderung der Aktivierungsschleife von MARK. A: Der katalytische Bereich *a* liegt tief in der Tasche und wird durch den regulatorischen loop (gelb) blockiert. B: Die Phosphorylierung von Thr<sup>208</sup> (rote Kugel) bewirkt, dass sich diese Schleife aus der Vertiefung herausfaltet und das katalytische Zentrum freigibt. C: Die Phosphatgruppe an Ser<sup>212</sup> (rote Kugel links) blockiert die Substratbindungsstelle, verändert die Konformation des katalytischen Bereichs und inaktiviert so das Enzym.<sup>43</sup>

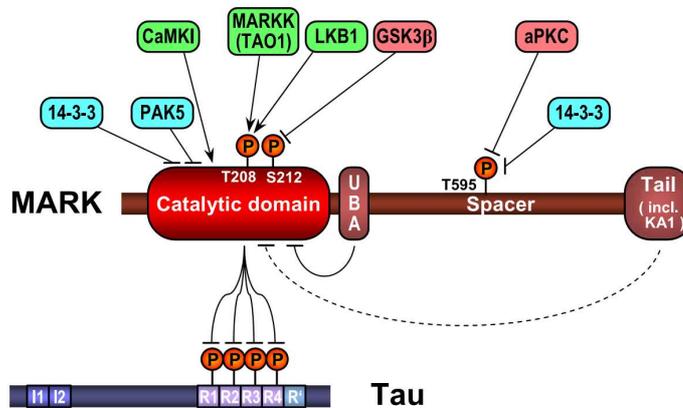


Abb. 1-8: MARK wird durch eine Reihe von Phosphorylierungen reguliert. Sie können aktivierend (grün) oder desaktivierend (rosa) sein und beeinflussen sich auch gegenseitig. Des Weiteren kann die Bindung anderer Proteine (türkis) und sogar die eigener Elemente (UBA- und Tail-Domäne) regulierende Wirkung haben. Diese komplexen Vorgänge steuern den Phosphorylierungsgrad von Tau und damit dessen Fähigkeit zur Mikrotubuli-Stabilisierung.<sup>44</sup>

Neben der katalytischen Domäne beinhaltet MARK eine Ubiquitin-assoziierte Domäne (UBA), einen *spacer* und kurze Abschnitte an N- und C-Terminus.<sup>45</sup> Zu den wichtigsten Aufgaben der Kinasen aus der MARK/Par-1/KIN-Familie gehören die Entwicklung der

Zellpolarität, Steuerungsaufgaben innerhalb des Zellzyklus und die Aufrechterhaltung des dynamischen Stabilitätsgleichgewichts der Mikrotubuli.<sup>41, 46, 47</sup>

### 1.6 Das Tau-Protein

Die sogenannten neurofibrillären Bündel, die zweite Art von Proteinablagerung, korrelieren in Verteilung und Dichte wesentlich besser mit den symptomatischen Regionen als die amyloiden Plaques.<sup>17, 18, 30, 48</sup> Sie bestehen aus aggregierten hyperphosphorylierten Tau-Molekülen, die ihre native Funktion nicht mehr erfüllen können. Tau-Proteine treten in 7 Isoformen im menschlichen Körper auf und sind Produkte des MAPT-Gens, welches auf Chromosom 17 lokalisiert ist.<sup>49-52</sup> Tau besitzt eine hohe Hydrophilie und wird in 3 Domänen eingeteilt (siehe Abbildung 1-9).<sup>53, 54</sup> Zwischen dem basischen *N*-Terminus und dem sauren *C*-Terminus liegt ein saurer und prolinreicher Bereich. Im *C*-Terminus befinden sich die sogenannten *repeat*-Domänen. Je nach Isoform sind dies drei bzw. 4 *repeats*, deren Kern das Phosphorylierungsmotiv KXGS (X steht für Ile oder Cystein) ist. Diese binden an Tubulin, während der Rest des Proteins keine bekannten Strukturmerkmale aufweist und als *randomcoil* vorliegt.<sup>55, 56</sup> Auch andere MAPs besitzen hohe Homologien in repetitiven Bereichen, die für die Bindung der Mikrotubuli verantwortlich sind. Die Mikrotubuli und somit auch die sie umgebenden Axone können Längen in makroskopischen Dimensionen von bis zu einem Meter erreichen, die zum Beispiel bis tief in das Rückenmark hineinreichen. Auf diesen schienenartigen Transportwegen werden Vesikel mit Enzymen, Neurotransmittern und Nährstoffen von Motormolekülen unter ATP-Verbrauch zur Synapse transportiert; auch ganze Mitochondrien werden so befördert.<sup>48, 57-63</sup> Zudem müssen Stoffwechselendprodukte, die sich am Axonende anreichern, wieder zurück ins Soma transportiert werden, um dort wieder in die entsprechenden Stoffwechselkreisläufe einzugehen.

Die relative Stabilität der Mikrotubuli ist nur gegeben, wenn eine ausreichende Menge an Tau-Proteinen und anderen MAPs auf ihrer Oberfläche assoziiert sind.<sup>64</sup> Der Grad dieser Belegung wird in erster Linie durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung gesteuert. Tau aktiviert Tubulinheterodimere und bewirkt die Bildung von ringförmigen Strukturen, aus denen letztendlich die Mikrotubuli hervorgehen.<sup>36, 38</sup>

## Einleitung

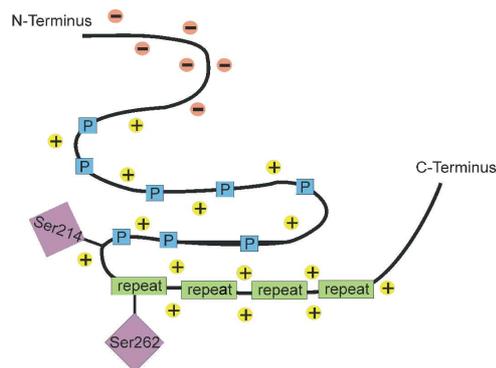


Abbildung 1-9: Schematische Darstellung der Struktur des Tau-Proteins mit den dazugehörigen Gegenionen. Im positiv geladenen C-terminalen Bereich befinden sich die repeat-Regionen, die dazu dienen, mit Tubulinpolymeren zu interagieren und diese zu stabilisieren. Welche Struktur der prolinreiche Mittelteil und der negativ geladenen N-Terminus einnehmen ist noch ungeklärt.

Eine bis dato nicht vollständig erfasste Kaskade aus sich gegenseitig aktivierenden und desaktivierenden Kinasen und Phosphatasen sorgt dafür, dass die 30 bis 40 Phosphorylierungsstellen von Tau im richtigen Phosphorylierungsgrad vorliegen.<sup>36, 64</sup>

Im Falle der Alzheimer-Krankheit liegt eine Fehlregulation der Gleichgewichte innerhalb der Phosphorylierungskaskade vor, was dazu führt, dass Tau hyperphosphoryliert wird.

Die Initialphosphorylierung findet innerhalb der mikrotubulibindenden repeat-Regionen statt und bewirkt eine drastische Verringerung der Bindungsaffinität zwischen Tau und Mikrotubulus. Infolgedessen sind Stabilität und Neubildung der Mikrotubuli nicht mehr gewährleistet und die Versorgung der Synapse bricht zusammen.

Hyperphosphoryliertes Tau hat eine starke Tendenz dazu, über die repeat-Regionen miteinander zu oligomerisieren und sogenannte PHFs (*paired helical filaments*) zu bilden, welche sich wiederum zur größeren Struktur der NFTs (*neurofibrillary tangles*) zusammenlagern, die im Mikroskop sichtbar sind.

Die gepaarten helikalen Filamente haben einen Durchmesser von etwa 15 nm. Alle 75 nm dreht sich die Helix einmal um sich selbst und sämtliche Tau-Isoformen sind an der Struktur beteiligt. Die repeat-Regionen bilden den Kern der PHFs, der im Gegensatz zum Rest proteasestabil ist und intermolekulare  $\beta$ -Faltblattstrukturen aufweist, welche anscheinend essenziell für die Bildung der Filamente sind.<sup>65</sup>

Die Tatsache, dass kurze repeats-Regionen beinhaltende Peptide schneller aggregieren als längere, unterstreicht die Wichtigkeit dieser Regionen für den angenommenen Mechanismus der NFT-Bildung.

## Einleitung

Beginnend mit einer vermutlich für den Gesamtmechanismus geschwindigkeitsbestimmenden Dimerisierung über eine Disulfidbildung an Cys<sup>322</sup> erfolgt eine sehr langsame Aggregation.<sup>66</sup> Die Phosphorylierung von Ser<sup>214</sup>, welches sich außerhalb der *repeats* befindet, verschlechtert die Tubulinbindung zwar deutlich, verlangsamt aber interessanterweise auch die NFT-Bildung während die Gegenwart von Polyanionen wie RNA, Polyglutamat oder Heparin wiederum die Bildung der Tau-Aggregate beschleunigen (siehe Abbildung 1-10). Dies belegt den äußerst komplexen Mechanismus der Aggregation, der noch nicht vollständig verstanden ist.

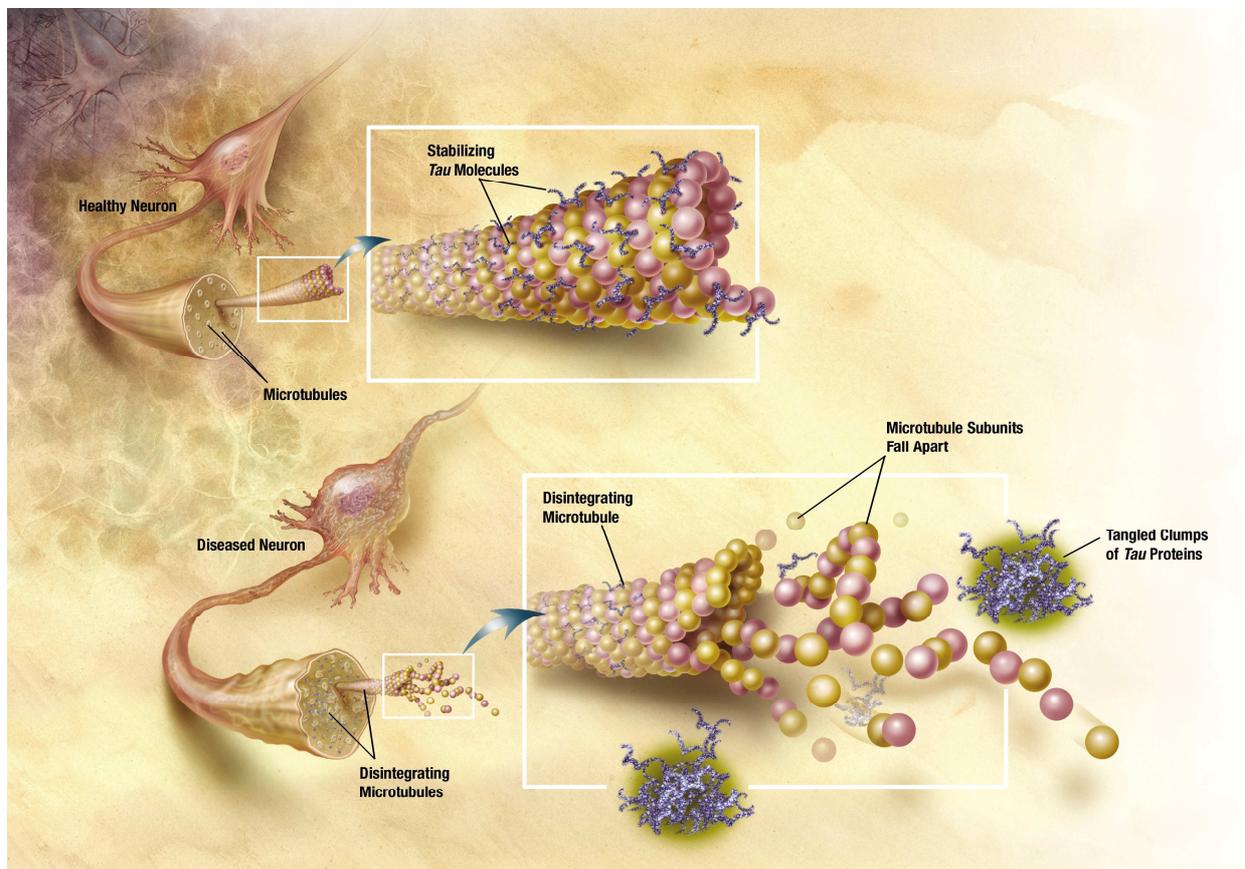


Abbildung 1-10: Darstellung eines gesunden Neurons (oben) mit intakten Mikrotubuli im Gegensatz zu einem erkrankten Neuron (unten). Die Hyperphosphorylierung der Tauproteine durch MARK führt zu einem Verlust der Bindungsaffinität zu den Mikrotubuli, welche ohne die stabilisierende Wirkung von Tau disassemblieren und somit ihre Funktion verlieren. Die nun nicht mehr funktionellen Tau-Proteine beginnen, sich zu NFTs zusammenzulagern.<sup>26</sup>

Die *repeat*-Regionen beinhalten das besonders wichtige Phosphorylierungsmotiv KXGS, welches von MARK erkannt wird. X steht im Falle von Tau für Isoleucin oder Cystein. Insbesondere Ser<sup>262</sup> in der ersten *repeat*-Region wird von MARK phosphoryliert während die

## Einleitung

Affinität zu den anderen repetitiven Bereichen geringer ist.<sup>40, 41, 47</sup> Die Übertragung des Phosphatrestes führt zu einer drastischen Verschlechterung der Bindungsaffinität und somit zur Ablösung des Tau-Proteins vom Tubulin.<sup>67</sup> Dies hat eine destabilisierende Wirkung auf die Mikrotubuli, deren Struktur ohne Tau nicht aufrecht erhalten werden kann. Dieser Vorgang konnte in Zellen beobachtet werden, die nach entsprechender Induktion MARK überexprimieren und dadurch einen hohen Phosphorylierungsgrad von Tau erzeugen.<sup>68</sup>

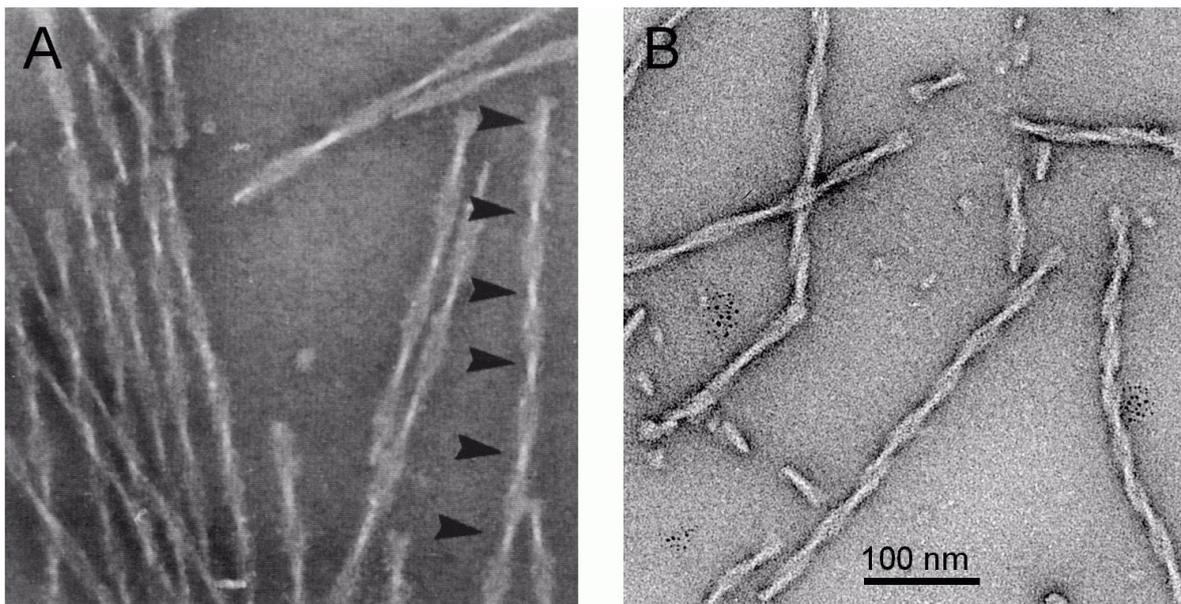


Abbildung 1-11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von A) nativen PHFs, die post mortem aus dem Gehirn eines Alzheimer-Patienten gewonnen wurden, und B) artifiziellen PHFs aus htau23, der kleinsten Isoform der humanen Tau-Proteine. Auf beiden Aufnahmen eindeutig zu erkennen sind die regelmäßigen Verjüngungen, die auf die helikale Struktur der Filamente zurückzuführen sind.<sup>69</sup>

Nach der ersten Phosphorylierung und dem Ablösen vom Tubulin, übertragen auch andere Kinasen, unter anderem GSK3 und CDK5, weitere Phosphatgruppen auf Tau. Die hochphosphorylierten Proteine werden anschließend von Proteasen in kleinere Fragmente gespalten, beginnen zu oligomerisieren und bilden letzten Endes neurofibrilläre Bündel. Das Fehlen der Tau-Proteine im natürlichen Regulierungsmechanismus führt zu einer Disassemblierung der Mikrotubuli, da die Zahl der stabilisierenden Proteine zu gering ist. Der Transportweg zur Synapse am Axonende ist nicht mehr funktional, das Neuron verkümmert und stirbt.<sup>40, 41, 44, 70</sup> Im Verlauf der Alzheimer-Erkrankung schrumpfen und verkümmern immer größere Bereiche des Gehirns durch das großflächige Absterben von Neuronen, was eine stetig zunehmende Einschränkung der kognitiven Funktionen nach sich zieht.

## Einleitung

Es wird davon ausgegangen, dass MARK das erste Glied in dieser Kette der unterschiedlichen Tau-Phosphorylierungen ist.<sup>40, 41, 68</sup> Daher stellt diese Kinase ein interessantes pharmazeutisches Ziel dar. Eine gezielte Regulation von MARK könnte den Zerfall der Mikrotubuli einschränken und neue Möglichkeiten eröffnen, Morbus Alzheimer zu behandeln.

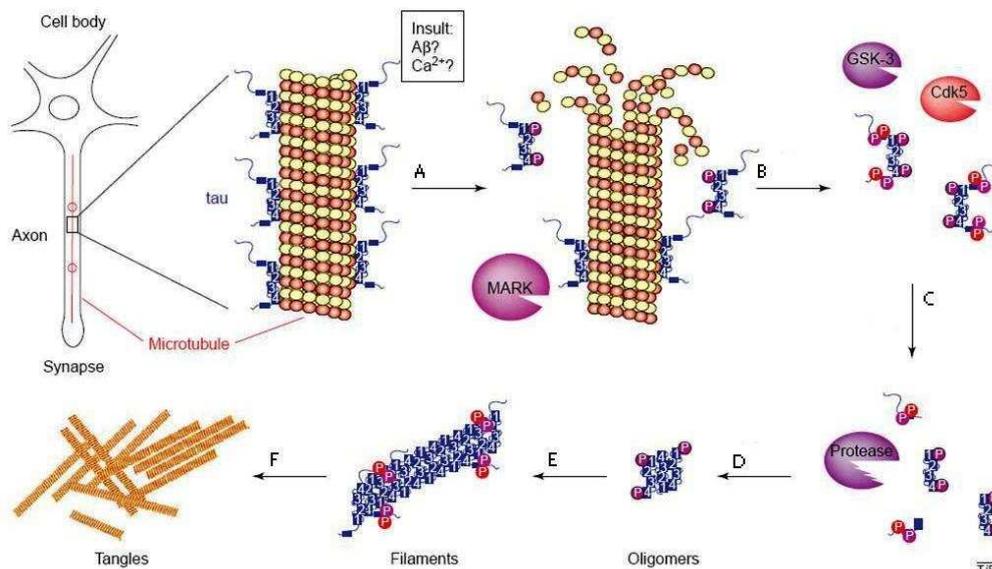


Abbildung 1-12: Mechanismus der NFT-Bildung. Anfangs ist Tau gleichmäßig auf dem Mikrotubulus verteilt und sorgt für die Stabilität der Struktur. Erfolgt eine Phosphorylierung durch MARK in den repeat-Regionen (A), löst sich das Protein von den Mikrotubuli (B). Diese verlieren dadurch ihre Stabilität und disassemblieren. Andere Kinasen wie GSK3 und CDK5 führen weitere Phosphatgruppen ein (C), und anschließend zersetzen Proteasen Tau in kleinere Bruchstücke, die über Oligomere (D) und Filamente (E) zu NFTs aggregieren.

Außerdem wären entsprechende Erkenntnisse von immenser Bedeutung für die Behandlung anderer Thauopathien. Die sind weitere Krankheiten wie zum Beispiel Morbus Pick, kortikobasale Degeneration, Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus des Chromosoms 17 und andere, in denen die Akkumulation von Tau zu NFTs eine entscheidende Rolle spielt.<sup>71-76</sup>

## 1.7 Ursachen, Diagnose und Therapieansätze

Die exakten molekularen Ursachen von Morbus Alzheimer sind noch immer ungeklärt. Einige der Symptome überschneiden sich mit denen des natürlichen Alterungsprozesses, was die Erforschung der Krankheit und exakte Diagnosen erschwert.<sup>13, 16</sup>

Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass Hypoperfusion im Gehirn zu erhöhter Aktivität von Mitochondrien führt. Dies wiederum erzeugt oxidativen Stress, der zu vermehrter Expression von APP führt.<sup>16, 77-81</sup> Wie genau Amyloid- $\beta$ -Proteine ihrerseits den Stoffwechsel innerhalb der Zelle beeinflussen und welche Auswirkungen sie auf die Phosphorylierungskaskade der Tau-Proteine haben, ist nicht hinreichend geklärt.

Hinweise auf einen möglichen Wirkmechanismus geben *in silico*-Modelle, die zeigen, wie Amyloid- $\beta$ -Oligomere Ionenkanäle in den Zellmembranen bilden können. Dies wäre eine Erklärung für beobachtete Veränderungen der Calciumionenkonzentration im Zytoplasma, welche die Aktivität der Tau-Phosphorylierung indirekt durch hyperaktive Calpaine beeinflusst.<sup>33, 34, 82</sup> Ebenso wurden Hinweise gefunden, dass es Zusammenhänge zwischen amyloiden Plaques, der c-Jun-N-terminalen Kinase und dem Insulinstoffwechsel gibt.<sup>79</sup> Auch Verbindungen zum Komplement-System konnten nachgewiesen werden.<sup>83</sup> Vermutlich wirken mehrere amyloide Strukturen nach unterschiedlichen Mechanismen auf die Vorgänge im Inneren der Zelle ein. Eine bekannte Folge ist die Hyperphosphorylierung von Tau und der daraus resultierende Zusammenbruch der Mikrotubuli.

Die Diagnose von Alzheimer gestaltet sich schwierig, da sie nur *post mortem* wirklich sicher ist. Insbesondere in frühen Phasen, in denen Medikamente besonders erfolgreich eingesetzt werden könnten, liefern auch moderne Verfahren wie Magnetresonanz- oder Computertomographie keine verlässlichen Daten. Verschiedene Psychotests wie z. B. der *mental-state-examination*-Test geben Hinweise auf eine mögliche Demenz, liefern aber keinen sicheren Befund.

Bisher war die Suche nach eindeutigen Biomarkern nicht erfolgreich. Zwar lässt die Analyse von verschiedenen Tau- und Amyloid- $\beta$ -Spezies in der cerebrospinalen Flüssigkeit Rückschlüsse auf mögliche Erkrankungen zu, aber die Tests liefern aufgrund hoher Varianzen keine gesicherte Diagnose.<sup>7-12, 84-89</sup> Die Sensitivität und Spezifität der gewonnenen Daten ist nicht ausreichend, um zuverlässige Schlussfolgerungen zu ziehen.

Eine Heilung von Morbus Alzheimer ist zurzeit nicht in Sicht, jedoch lassen sich auf verschiedenen Wegen die Symptome der Krankheit verzögern. In der Mitte der 70er Jahre

## Einleitung

erkannte man, dass Neuronen, die Acetylcholin produzieren, besonders anfällig für die Mechanismen der Alzheimer-Erkrankung sind.<sup>90</sup> Acetylcholin gehört neben  $\gamma$ -Aminobuttersäure und Glycin zu den wichtigsten Neurotransmittern.

Die Gabe von Acetylcholinesterasehemmern sorgt für einen verlangsamten Abbau des Neurotransmitters, was den geistigen Verfall der Patienten verzögert. Tacrin war das erste offiziell zugelassene Alzheimer-Medikament, wurde aber wegen starker Hepatotoxizität schnell von seinen Nachfolgern Donezepil, Galantamin und Rivastigmin vom Markt verdrängt, wobei letzteres ebenfalls die Butyrylcholinesterase inhibiert.<sup>90-97</sup>

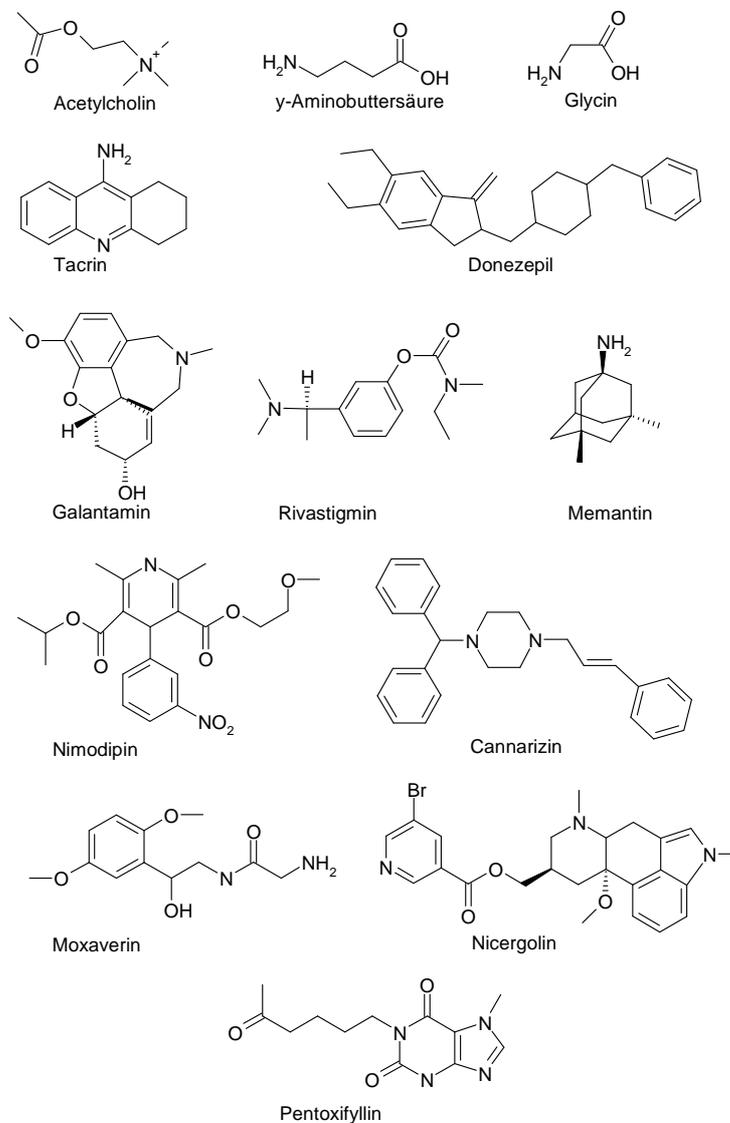


Abbildung 1-13: Strukturformeln der wichtigsten Neurotransmitter (obere Reihe) und diverser Medikamente, die in der Alzheimer-Behandlung genutzt werden.

## Einleitung

Auch die Inhibition von *N*-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren durch den Wirkstoff Memantin hat positive Wirkung auf den Krankheitsverlauf, da die nicht-kompetitive Verringerung der Rezeptoraktivität die Wirkung der pathogenen Glutamatkonzentration in den Zellen abschwächt.<sup>90, 97, 98</sup>

Die Medikamente Nimodipin und Cannarizin wirken als Calciumantagonisten. Sie inhibieren Calciumkanäle und verringern dadurch den Einstrom von Calciumionen in die Zelle. So heben sie einen Effekt der Amyloid- $\beta$ -Oligomere teilweise wieder auf. Weitere Ansatzpunkte sind durchblutungsfördernde Substanzen wie Nicergolin und Moxaverin oder antiinflammatorische Medikamente wie Pentoxifyllin, die sich ebenfalls positiv auf die Verfassung der Patienten auswirken.<sup>99-103</sup> Immunisierungsversuche mit Amyloid- $\beta$ -Proteinfragmenten konnten zwar die Zahl der Plaques verringern, wurden aber aufgrund akuter Nebenwirkungen aufgegeben.<sup>104-107</sup> Obwohl der Effekt umstritten war, wird momentan an Varianten dieser Vaccinierung gearbeitet.<sup>32, 108, 109</sup>

Diverse Inhibitoren, die die  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Sekretase inhibieren bzw. die Aktivität der  $\alpha$ -Sekretase steigern, befinden sich in klinischen Testphasen. Die effiziente Unterdrückung der Plaquebildung, ob durch Antikörper oder Sekretase-Inhibitoren, würde nach aktuellem Stand des Wissens den Krankheitsverlauf deutlich verzögern.<sup>90</sup>

Eine effiziente Behandlungsmethode, die auch in späten Phasen der Demenz noch deutliche Verbesserung der geistigen Konstitutionen bewirken kann, würde die Gesundheitssysteme auf der ganzen Welt enorm entlasten. Dies ist besonders in zukünftigen Jahrzehnten von immenser Bedeutung, da die längere Lebenserwartung der Menschen und die damit zunehmende Zahl der Demenzkranken eine immer stärker werdende finanzielle Belastung für die Gesellschaft darstellen.

## 2 Methoden

### 2.1 Peptidsynthese

Im Jahr 1963 veröffentlichte Robert Bruce Merrifield eine bahnbrechende Arbeit, für die er 1984 mit dem Nobelpreis für Chemie geehrt wurde.<sup>110</sup> Bis zu diesem Zeitpunkt war die chemische Synthese von Peptiden eine aufwendige, komplizierte und teure Arbeit. Die Immobilisierung der ersten Aminosäure auf einem Polystyrolträger (Harz) ermöglicht es, schwierige und verlustreiche Aufreinigungsschritte zu umgehen. Dadurch können nicht mehr benötigte Reagenzien einfach vom Harz gewaschen werden. Dies ermöglichte die Entwicklung der automatisierten Peptidsynthese, die mittlerweile eine Standardmethode darstellt.<sup>111</sup> Daneben werden heutzutage Peptide enzymatisch mit Hilfe von Peptidasen oder analog zu Proteinen gentechnologisch in Expressionssystemen hergestellt.<sup>112, 113</sup> Allerdings erfolgt der Aufbau der Sequenz in der Festphasensynthese entgegen der natürlichen Syntheserichtung vom C- zum N-Terminus.

Die Festphasensynthese nach Merrifield besteht aus wenigen sich wiederholenden Schritten, in denen zuerst eine Aminosäure kovalent über ihre freie Carboxylgruppe am Harz verankert wird, während die Aminogruppe eine geeignete Schutzgruppe trägt. Um die Amidbindung ausbilden zu können, bedarf es einer Aktivierung der Carboxylgruppe zum Aktivester. Hierzu werden Reagenzien wie HATU, TBTU oder PyBOB verwendet, die eine Positivierung des Carboxyl-C-Atoms bewirken und dadurch einen nukleophilen Angriff der Aminogruppe ermöglichen (siehe Abbildung 2-1).<sup>114, 115</sup>

Ein anschließender sogenannter *capping*-Schritt blockiert freie Aminogruppen durch Acetylierung, um die Bildung von Deletionspeptiden zu unterbinden, da die einzelnen Kupplungsschritte nicht quantitativ ablaufen. Danach wird die N-terminale Schutzgruppe abgespalten. In der Regel handelt es sich dabei um die Fluorenylmethyloxycarbonyl- (Fmoc) oder die Butyloxycarbonylgruppe (Boc, siehe Abbildung 2-1). Die entschützte Aminogruppe dient nun ihrerseits als Anknüpfungspunkt für die nächste Aminosäure.

Nachdem so sukzessive die gewünschte Sequenz aufgebaut wurde, lässt sich das Peptid mittels TFA vom Harz abspalten. Triisopropylsilan (TIPS) dient hierbei als *scavenger*, der als Hydridionendonator bei der Reaktion entstehende Carbokationen abfängt, bevor sie mit dem Peptid reagieren können.<sup>116</sup>

Je nach Wahl des *linkers* erhält man am N-Terminus entweder eine freie Säurefunktion oder das entsprechende Amid. Die anschließende Reinigung des Rohprodukts mittels HPLC trennt Abbruchpeptide und andere Reaktionsprodukte ab und man erhält das saubere Peptid.

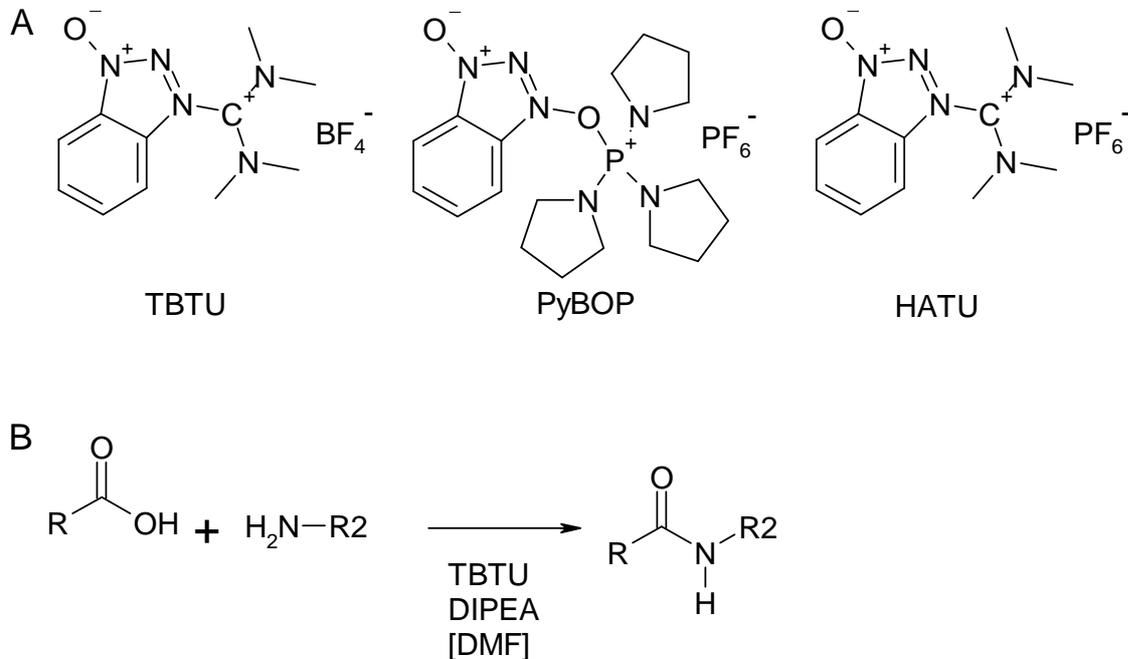


Abbildung 2-1: A) Darstellung verschiedener Aktivierungsreagenzien. B) Schema der Reaktion zur Kopplung von Carboxyl- und Aminogruppe. Der exakte Ablauf der Carboxylaktivierung mit der anschließenden Ausbildung der Amidbindung ist nicht vollständig aufgeklärt.

Von besonderer Wichtigkeit sind in diesem Zusammenhang die Schutzgruppen der funktionellen Aminosäureseitenketten. Sie müssen orthogonal zu den Entschützungsbedingungen der Aminogruppe der Amidbindung gewählt werden, da es sonst zu einer Vielzahl an unerwünschten Nebenreaktionen kommt.

Die Verwendung der Fmoc-Schutzgruppe ermöglicht es, nach jedem Reaktionszyklus eine Kupplungsausbeute zu bestimmen.<sup>117</sup> Unter milden basischen Bedingungen wird mit 20 % Piperidin in DMF Methylfluoren abgespalten, welches sich photometrisch vermessen lässt. Unter diesen Bedingungen sind die orthogonalen Trt-, tBu- und Boc-Gruppen stabil und ermöglichen so die gezielte Verlängerung der Kette.

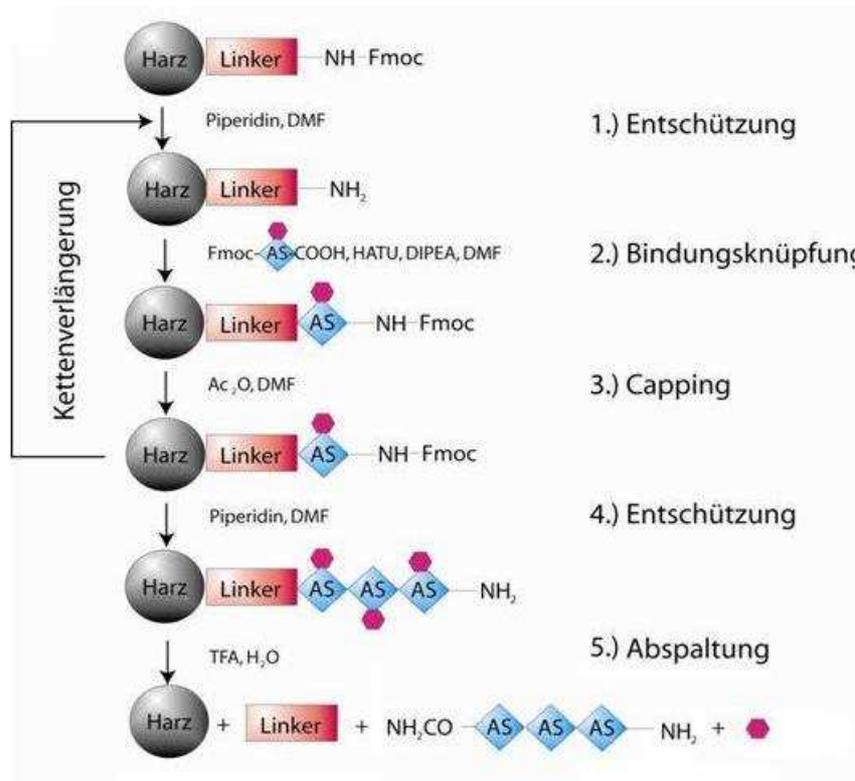


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung des Prinzips der Festphasenpeptidsynthese. Zu Beginn wird die Aminoschutzgruppe vom Harz entfernt (Schritt 1). Im Anschluss daran werden die Schritte 2,3 und 4 für jede Aminosäure der Sequenz wiederholt. Zuerst erfolgt die Knüpfung der neuen Amidbindung mit einer aktivierten Carboxylfunktion (Schritt 2); danach werden nicht umgesetzte Aminofunktionen acetyliert (Schritt 3). Nach dem Abspalten der Fmoc-Gruppe kann ein neuer Zyklus beginnen. Ist das Peptid vollständig, wird es am Ende der Synthese mit TFA abgespalten (Schritt 5) und kann aufgereinigt werden.

Die Einführung einer Phosphatgruppe durch eine Kinase ist ein in allen bekannten Organismen vorkommender Mechanismus. Dadurch wird eine voluminöse negative Ladung eingeführt, die Einfluss auf elektrostatische Eigenschaften und somit auch auf die Konformation eines Peptides bzw. Proteins nimmt.<sup>118, 119</sup> Die Phosphorylierung stellt einen ubiquitären molekularen Schalter dar, über den Signale weitergereicht werden können, die Wachstum, Zellzyklus, Differenzierung, Apoptose und vieles mehr beeinflussen.<sup>120</sup> Die Synthese von Phosphopeptiden stellt eine wichtige Informationsquelle für die Untersuchung der von Kinasen ausgelösten Steuerungsmechanismen dar. Zur Synthese von Phosphopeptiden stehen 2 verschiedene Möglichkeiten zur Wahl.

Während des Aufbaus der Sequenz am Harz ist es im Rahmen der Fmoc-Strategie möglich, die OH-Gruppen von Aminosäuren, die phosphoryliert werden sollen, ungeschützt zu lassen. Nachdem das Peptid am Harz vervollständigt wurde, kann die PO<sub>4</sub>-Gruppe durch

Phosphitylierung mittels *Bis*(Benzyloxy)(di-*iso*-propylamino)phosphin und anschließender Oxidation durch *tert*-Butylhydroperoxid vor der Abspaltung eingeführt werden.<sup>121</sup> Daneben besteht auch die Möglichkeit, die Phosphatgruppe durch die Verwendung von Ammonium-*tert*-Butyl-*H*-phosphonat im Verlauf der Synthese zu implementieren.<sup>122</sup> Aufgrund der verringerten Nukleophilie der aromatischen OH-Gruppe des Tyrosins gestaltet sich die Phosphorylierung deutlich schwerer als die von Threonin und Serin. Zudem werden die Ausbeuten durch Nebenreaktionen wie z. B. Piperidin-katalysierte  $\beta$ -Eliminierung während der Fmoc-Abspaltung oder Pyrophosphatbildung verringert.

Des Weiteren können phosphorylierte Synthesebausteine zum Aufbau von Phosphopeptiden verwendet werden. Anfangs wurden dibenzylierte Aminosäuren verwendet, welche jedoch durch ein hohes Maß an Nebenreaktionen nur ungenügende Ausbeuten lieferten. Monobenzylierte Bausteine haben sich in dieser Hinsicht als deutlich effizienter erwiesen. Fmoc-Ser(PO<sub>3</sub>HBzl)OH, Fmoc-Tyr(PO<sub>3</sub>HBzl)OH bzw. Fmoc-Thr(PO<sub>3</sub>HBzl)OH werden analog zu den Standardaminosäuren eingesetzt und sind kommerziell erhältlich.<sup>118, 122</sup> Aufgrund des stark erhöhten Raumanspruchs sind die Kupplungsausbeuten dennoch deutlich geringer.

## 2.2 Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)

In der Wirkstoffentwicklung ist es von besonderer Wichtigkeit bimolekulare Interaktionen beobachten zu können. Eine wichtige Methode, deren Grundlagen 1959 von Turbadar beschrieben und die von Otto, Kretschmann und Raether weiterentwickelt wurde, ist das Phänomen der Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance* – SPR).<sup>123-125</sup>

Dieses Phänomen ermöglicht die Beobachtung von Bindungsereignissen in Echtzeit, ohne dass ein *labeling* erforderlich ist.<sup>125, 126</sup> Dadurch und durch die Möglichkeit, nahezu jedes Puffersystem verwenden zu können, sind Messungen unter annähernd physiologischen Bedingungen möglich. Lediglich die Immobilisierung eines der beiden Bindungspartner muss als mögliche Einschränkung in Kauf genommen werden. Dafür sind die benötigten Mengen der zum Teil schwer zugänglichen biologischen Moleküle äußerst gering. Ferner bietet das System die Möglichkeit, neben verhältnismäßig kleinen Molekülen wie Proteinen auch Viren, Bakterien oder gar ganze Zellen zum Messen einzusetzen.<sup>127, 128</sup> Seit Anfang der 90er Jahre sind entsprechende Geräte kommerziell erhältlich und mittlerweile haben sich SPR-Messungen zu einer Standardmethode in der Pharmaforschung entwickelt.<sup>126</sup>

Grundlage der Methode ist die Totalreflexion von monochromatischem, linear polarisiertem Licht an einer reflektierenden Schicht, wodurch im dahinterliegenden optisch dünneren Bereich eine evaneszierende Welle ausgelöst wird.<sup>123</sup> Ein dünner Film eines leitenden nicht magnetischen Materials (z. B. Gold) auf dieser Grenzfläche ermöglicht eine verstärkende Resonanz zwischen den Oberflächenplasmonen des Metalls und dem evaneszierenden Feld. Bei einem bestimmten Reflexionswinkel, der vom Brechungsindex jenseits der Reflexionsebene abhängig ist, erzeugt diese Resonanz eine Intensitätsverringerng des reflektierten Lichtes.<sup>129</sup> Tritt dort ein Bindungsereignis auf, verändert sich in Abhängigkeit von der Intensität des Ereignisses und den molaren Massen der beteiligten Bindungspartner das Ausmaß der Veränderung des Brechungsindex. Diese im Rahmen des Bindungsereignisses entstehende Wechselwirkung zwischen evaneszierendem Feld, Oberflächenplasmonen und reflektierten Photonen erzeugt einen optisch messbaren Effekt. Dieser ist annähernd proportional zur Massenzunahme auf der Oberfläche des Sensorchips. Die immense Empfindlichkeit von SPR-Messungen ermöglicht es, Massenänderungen von wenigen Pikogramm ( $10^{-12}$  g) auf der Chipoberfläche zu detektieren. Variiert der Brechungsindex nahe der Metalloberfläche um  $1 \cdot 10^{-3}$ , wird eine Verschiebung im Resonanzwinkel von  $0.1^\circ$  bewirkt. Moderne Geräte sind in der Lage, Winkelveränderungen von  $0.0001^\circ$  zu verfolgen. Als Maß für die Intensität des Bindungseffekts wird die Einheit RU (*resonance units*) verwendet. Ein RU entspricht etwa einer gebundenen Masse von  $1 \text{ pg/mm}^2$  und einer Winkelveränderung von  $0.0001^\circ$ . Durch die hohe Empfindlichkeit ist es möglich, auch niedermolekulare Verbindungen ( $< 1 \text{ KD}$ ) mit millimolaren Bindungskonstanten zu vermessen.

Die Messung selbst findet auf der Sensorchipoberfläche in einer kleinen Flusszelle statt, auf der eine Dextranschicht mit entsprechender Funktionalisierung den Ankerpunkt für die Immobilisierung darstellt. Der Ausgangspunkt dieser Dextranschicht ist ein dünner Goldfilm, der die Grenze zwischen beiden an der Reflexion beteiligten Medien darstellt.

Je nach Wahl des Sensorchips befinden sich verschiedene funktionelle Gruppen auf dem Dextran, die eine kovalente Fixierung eines der beiden Bindungspartner ermöglichen. Über ein Mikrofluidsystem wird das mobile Molekül in Lösung durch die Flusszelle gespült und kann dort mit seinem Bindungspartner interagieren. Generell spielt es keine Rolle, welches der an der Bindung beteiligten Moleküle man immobilisiert.<sup>130</sup> Allerdings schränken Verfügbarkeit und die Möglichkeit zur Ausbildung einer kovalenten Bindung die Wahl in der Regel ein.

## Methoden

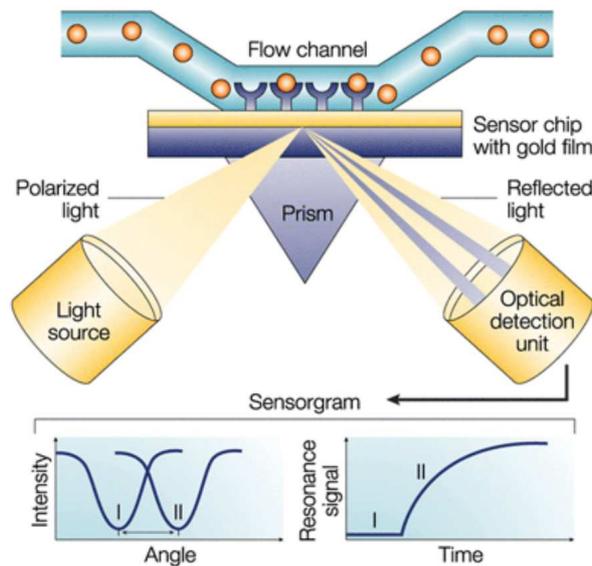


Abbildung 2-4: Darstellung des SPR-Experiments. Bindungsereignisse an den auf der Goldoberfläche immobilisierten Molekülen haben stärkeren Einfluss auf die Dichte dieser Schicht als zufällige Interaktionen in der Vergleichszelle. Die Dichteveränderungen erzeugen messbar unterschiedliche Veränderungen des Reflexionswinkels des polarisierten Lichts. Aus dem zeitlichen Verlauf der Differenz beider Messzellen ergibt sich die Bindungskurve.

Verschiedene Arten von Sensorchips unterscheiden sich in der Länge der Dextranmatrix und Art und Dichte der am Dextran verankerten funktionellen Gruppen. Daneben existieren weitere Strategien wie die Fixierung biotinylierter Proteine mittels Streptavidin oder die Ausbildung von Nickelchelatkomplexen mit *his-tags*.<sup>129, 131</sup>

Um spezifische von unspezifischen Wechselwirkungen unterscheiden zu können, wird in der Praxis der Analyt über zwei verschiedene Messzellen geleitet. Die Dextranmatrix einer der beiden Zellen trägt den immobilisierten Liganden, die andere Zelle dient als Referenz. Dadurch werden nichtspezifische Wechselwirkungen und Änderungen im Brechungsindex, die beim Wechsel von Lauf- auf Injektionspuffer auftreten können (*bulk-Effekte*) ausgeschlossen.

In Abbildung 2-6 ist der idealisierte Verlauf eines Sensogramms dargestellt. Nach der Injektion beginnt die Assoziationsphase, in der stattfindende Bindungsereignisse die Dichte auf der Chipoberfläche stärker erhöhen als die unspezifischen Interaktionen, die in der Referenzzelle stattfinden. Die Kurve steigt an bis Assoziation und Dissoziation ein identisches Niveau erreicht haben und ein dynamisches Gleichgewicht entstanden ist. Daraus resultiert die Bindungskurve der Assoziation, die zeigt, wie in zunehmendem Maß Bindungsstellen auf dem Chip besetzt werden, bis eine Sättigung erreicht wird.

Im Anschluss daran beginnt die Dissoziation, in der der Puffer beginnt, den Analyten aus der Messkammer zu spülen. Bei höheren Bindungsaffinitäten verläuft dies sehr langsam, daher wird in der Regel die Dissoziation mit einer Regenerationslösung beschleunigt. Dies geschieht mit Detergenzien wie SDS oder Veränderungen des pH-Wertes, wodurch die elektronischen Bedingungen in der Messkammer kurzfristig stark verändert werden. Die vollständige Regeneration der Chipoberfläche ist essenziell für die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass die Bedingungen keine permanenten Veränderungen oder gar die Zerstörung der Struktur des immobilisierten Liganden induzieren. Dies lässt sich leicht durch die Vermessung von Referenzsubstanzen vor und nach einer Messreihe überprüfen.

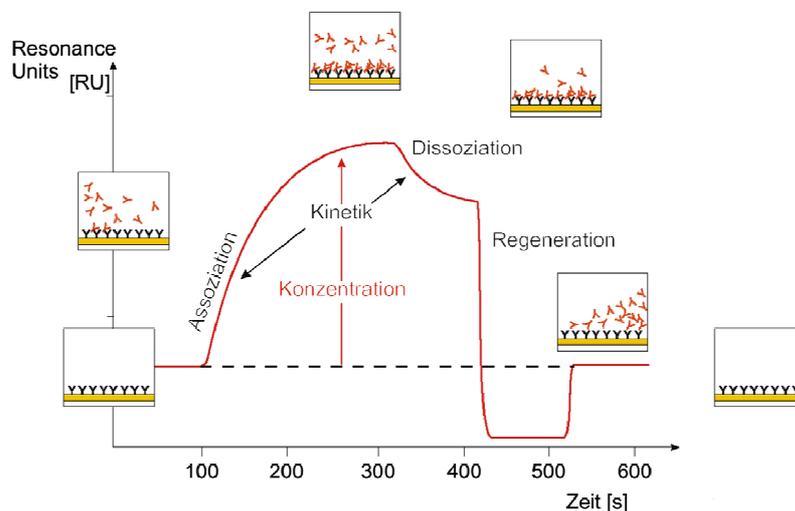


Abbildung 2-6: Idealisierte Darstellung eines SPR-Sensogramms. In der Assoziationsphase bindet der Analyt bis zur Sättigung an den immobilisierten Bindungspartner. Nach der Injektion beginnt der Analyt von der Oberfläche wegzudiffundieren und die RU-Antwort verringert sich. Der Regenerationspuls verändert die ionischen Gegebenheiten so stark, dass der Analyt vollständig aus der Dextranoberfläche gewaschen wird. Aus dem maximalen RU-Wert und den Kurvenverläufen von Assoziation und Dissoziation lassen sich kinetische und thermodynamische Daten der Bindung ableiten.

Aus der Annahme, dass 1 RU einem Picogramm Protein entspricht, lässt sich die Menge des immobilisierten Liganden berechnen. Der Wert  $RU_{max}$  stellt die maximal zu erwartende RU-Antwort dar und wird durch die Menge des immobilisierten Liganden, seine Masse und die Masse des Analyten definiert.

Geht man davon aus, dass die Wechselwirkung dem Mechanismus durch das *one site binding*-Modells adäquat beschrieben wird, lässt sich aus der Korrelation der Sättigungswerte bei

unterschiedlichen Konzentrationen die thermodynamische Dissoziationskonstante  $K_D$  ableiten.<sup>129, 132</sup> Durch Umformen ergibt sich aus der nachfolgenden Gleichung der  $K_D$ -Wert.

$$RU_{\max} = \frac{RU * MW_{\text{Analyt}}}{MW_{\text{Ligand}}}$$

*Gleichung 1: Die maximal zu erwartende RU-Antwort ( $RU_{\max}$ ) lässt sich aus der Menge der immobilisierten RU-Einheiten und den Mol-Gewichten von Analyt ( $MW_{\text{Analyt}}$ ) und Ligand ( $MW_{\text{Ligand}}$ ) berechnen.*

$$RU = \frac{RU_{\max} * [L]}{K_D + [L]}$$

*Gleichung 2: Die RU-Antwort ist von der Ligandenkonzentration ( $L$ ), der thermodynamischen Dissoziationskonstante der Reaktion ( $K_D$ ) und der Menge des immobilisierten Bindungspartners abhängig, welche den  $RU_{\max}$ -Wert bestimmt.*

Eine Antwort des Systems, die den Wert von  $RU_{\max}$  deutlich überschreitet, weist auf einen komplexeren Bindungsmechanismus mit mehreren *binding sites* oder auf *rebinding* Effekte hin; das mehrfache Binden eines Analytmoleküls innerhalb eines Messzyklusses. Sind die Austauschprozesse nicht zu schnell, lassen sich aus den Kurvenverläufen von Assoziation und Dissoziation unter Verwendung der Langmuir-Funktion die kinetischen Parameter  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  bestimmen, deren Quotient der thermodynamischen Gleichgewichtskonstante  $K_D$  entspricht.<sup>133</sup> Die Geschwindigkeit dieser Prozesse wird durch  $k_{\text{on}}$ ,  $k_{\text{off}}$  die Konzentrationen der beteiligten Substanzen, die Temperatur und die Flußgeschwindigkeit beeinflusst. Daher müssen die Randbedingungen eines SPR-Experiments sorgfältig gewählt werden.

### **2.3 Molecular modelling**

Die Beschreibung von einzelnen Molekülen oder Molekülverbänden durch mathematische Gleichungen ermöglicht eine Darstellung von Strukturen, Kräfteverhältnissen und Dynamiken *in silico*, also rein virtuell. Durch moderne Computertechnologie lassen sich so immer komplexere Berechnungen mit immer größer werdendem Rechenaufwand in akzeptablen Zeitspannen realisieren.

Man unterscheidet mesoskopische Simulationen, in denen größere Verbände von Atomen bzw. Molekülen unter vereinfachenden Annahmen in einer Vielzahl von Gruppen (*beads*) zusammengefasst werden, von molekülmechanischen Simulationen. Letztere rechnen mit

einzelnen Molekülen und betrachten inter- und intramolekulare Wechselwirkungen mittels Kraftfeldern, die sich aus physikalischen Gleichungen zur Beschreibung elektromagnetischer Felder zusammensetzen. Den größten Rechenaufwand erfordern quantenmechanische Simulationen, da die der Rechnung zugrundeliegenden Wellenfunktionen durch sehr komplexe Gleichungen beschrieben werden. Diese Berechnungen liefern Einblicke in die Wechselwirkungen von Elektronen innerhalb eines Moleküls und die daraus resultierenden Strukturen.

Röntgenkristallographische Daten oder NMR-Untersuchungen erlauben es, ein Modell eines Proteins zu erstellen und dessen Struktur und Dynamik zu untersuchen.<sup>134, 135</sup> Durch das als *docking* bekannte Verfahren wird die Beschreibung einer energetisch optimalen Position zweier Moleküle zueinander ermöglicht. Je nach Kraftfeld und Dielektrizitätskonstante werden elektrostatische Wechselwirkungen, van der Waals-Kräfte und Torsionsenergien auf unterschiedliche Weise in die Gesamtenergie einberechnet.<sup>136</sup> Mit einem geeigneten Modell lassen sich z. B. aufwändige *in vitro*-Studien durch vorheriges *modelling* und Ausschluss ungeeigneter Kandidaten abkürzen.<sup>135, 137-139</sup> Da *in silico*-Modelle genau wie andere Modelle auch Ungenauigkeiten aufweisen, ist eine kritische Prüfung der erhaltenen Daten unabdingbar.

Die Röntgenkristallstruktur eines zu untersuchenden Proteins gibt im Idealfall einen direkten Einblick in Struktur und Funktionalität. Das Programm SYBYL ermöglicht die dreidimensionale Darstellung von Molekülen und eine Vielzahl an Bearbeitungs- und Berechnungsmöglichkeiten.

Die in SYBYL enthaltene Routine *FlexiDock* basiert auf einem genetischen Algorithmus und berechnet Bindungsenergien und mögliche Konformationen von potentiellen Inhibitoren, die zuvor in der Bindungskavität platziert wurden. Der an die Evolutionstheorie angelehnte Algorithmus versieht einige wenige drehbare Bindungen mit Zufallskonformationen, vergleicht resultierende Energien und kombiniert besonders erfolgversprechende Geometrien zu neuen potentiellen Kandidaten. Auf diese Weise werden so lange neue Generationen von optimierten Strukturen erzeugt, bis kein Gewinn an Bindungsenergie mehr erfolgt.<sup>136</sup>

Sowohl die Zahl der frei drehbaren Bindungen des Ligand-Moleküls als die Form der Kavität spielen eine wichtige Rolle bei der Verlässlichkeit der Daten. Die Wechselwirkungen von großen Peptiden oder komplexen Kohlenhydratstrukturen mit der Oberfläche von Proteinen lassen sich auf diese Weise nur ungenau beschreiben, da die Zahl der Variablen sehr groß

wird. Ein kleiner Inhibitor, der die Bindungstasche eines Proteins ausfüllt ist dagegen hervorragend geeignet, um eine aussagekräftige *docking*-Studie zu erstellen.

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit genutzten Kristallstrukturen stammen aus dem Archiv der *rcsb protein data base* ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)).

### 2.4 Kinase-Assays

Um den inhibitorischen Effekt der synthetisierten peptidischen Substanzen *in vitro* zu überprüfen, wurden zwei verschiedene Assays verwendet. Das erste Verfahren beruht auf der Übertragung eines radioaktiven Phosphatrestes von  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]ATP auf das Peptid TR1 ( $^{255}\text{NVKSKIGSTENLK}^{268}$ , analog der Sequenz des ersten *repeats* des Tau-Proteins). MARK wird mit den zu vermessenden Substanzen vorinkubiert und anschließend werden TR1 und ATP (mit  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]ATP dotiert) hinzugegeben. Nach einem Zeitintervall von 30 Minuten werden die einzelnen Reaktionsansätze auf eine Zellulosemembran pipettiert und gründlich mit verdünnter Phosphorsäure gewaschen. Dabei bleiben die phosphorylierten Peptide auf der Membran haften, während das radioaktive  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]ATP in Lösung verbleibt und beim wiederholten Spülen ausgewaschen wird. Da ein Teil des umgesetzten TR1 durch die Dotierung des ATPs mit einem instabilen  $^{32}\text{P}$ -Kern markiert ist, stellt die auf der Membran verbliebene Radioaktivität ein Maß für den Umsatz der Kinase dar.

Neben den zu überprüfenden Substanzen wird die Reaktion außerdem ohne Inhibitor und in Gegenwart von einem bekannten Inhibitor durchgeführt. Dadurch erhält man unter den gewählten Bedingungen einen Wert für den nativen und den inhibierten Umsatz der Kinase. Je potenter ein Inhibitor ist, desto geringer wird die entsprechende Radioaktivität ausfallen, da weniger  $^{32}\text{P}$ -Kerne auf Peptide übertragen werden.

Um die Spezifität der potentiellen Inhibitoren zu überprüfen, wurde eine andere Methode angewandt. Da die eng mit MARK verwandte Kinase GSK3 zwar auch Tau phosphoryliert, aber an anderen Positionen, wurde für die Überprüfung der Spezifität das deutlich größere Konstrukt hTau40 verwendet. Das Molekül ist 441 Aminosäuren lang und 40 kDa schwer. Die Produktgemische wurden durch Gelelektrophorese getrennt, da Konstrukte dieser Größe beim Ansäuern ausgefällt werden, und damit keine quantitative Haftung auf der Phosphozellulose gewährleistet ist. Die Radioaktivität der entsprechenden Banden im Gel spiegelt das Maß des Reaktionsumsatzes wieder.

## Methoden

Im zweiten Assay wird Fluoreszenz zur Charakterisierung der Kinaseaktivität herangezogen. Als Substrat kommt ein spezielles rekombinant produziertes Substrat zum Einsatz, welches aus vier verschiedenen Untereinheiten besteht.<sup>140-142</sup> Die Substratsequenz ist an einem Ende von einem Fluorophor (YFP, *yellow fluorescent protein*) flankiert, während sich auf der gegenüberliegenden Seite eine phosphoaminosäurebindende Domäne (14-3-3 $\tau$ ) befindet, die mit einem weiteren Fluorophor (CFP, *cyan fluorescent protein*) verbunden ist (siehe Abbildung 2-7). Wird ein Phosphat auf die Zielsequenz innerhalb des Konstruktes übertragen, kommt es zu einer Konformationsänderung, da die 14-3-3 $\tau$ -Domäne die phosphorylierte Aminosäure bindet.

Allerdings basiert die MARK-Zielsequenz in diesem Fall auf einem 18 Aminosäuren langen Ausschnitt von Cdc25C, da hier im Gegensatz zu den Tau-*repeats* ein 14-3-3 $\tau$ -Bindungsmotiv vorhanden ist.

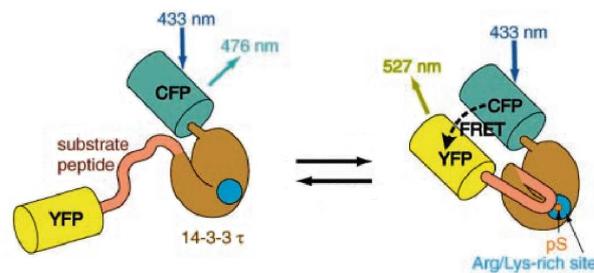


Abbildung 2-7: Darstellung der Struktur des Substratkonstruktes. Die Phosphorylierung bewirkt, dass sich das Substratpeptid in die Bindungskavität der 14-3-3 $\tau$ -Domäne hineinfaltet und dadurch beide Fluorophore in räumliche Nähe zueinander gelangen. Ist diese Voraussetzung erfüllt, kann die eingestrahelte Energie durch einen FRET vom CFP auf YFP übertragen werden. Letzteres emittiert nun eine andere Wellenlänge und ermöglicht so die Differenzierung zwischen umgesetzten und nicht umgesetzten Substrat.

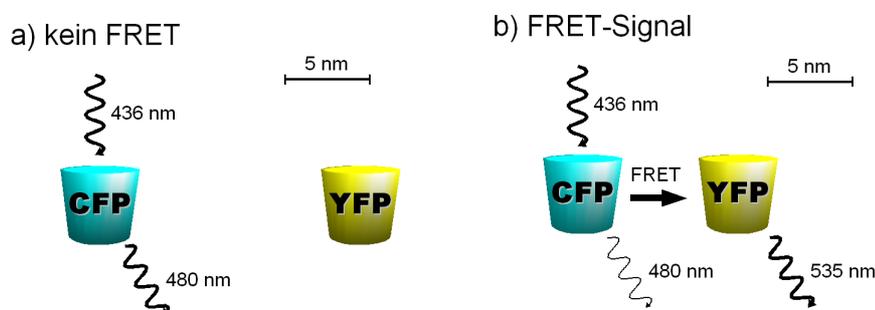


Abbildung 2-8: a) Das CFP emittiert die eingestrahelte Energie bei einer leicht veränderten Wellenlänge, YFP ist räumlich zu weit entfernt, um einen FRET zu erzeugen. b) Eine Konformationsänderung hat beide Proteine in unmittelbare Nähe gebracht, so dass der Hauptteil der eingestrahelten Energie durch einen FRET auf YFP übertragen wird und dort bei einer anderen Wellenlänge emittiert wird.

## Methoden

Nach erfolgter Reaktion sind beide Chromophore in unmittelbarer Nähe zueinander positioniert und es findet eine Übertragung der Energie durch Wechselwirkung der magnetischen Momente der beiden Chromophoren statt. Durch diesen Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET), der photometrisch verfolgt werden kann, wird Energie vom angeregten Donor-Fluorophor strahlungsfrei auf den Akzeptor-Fluorophor übertragen, welcher wiederum bei einer anderen Wellenlänge emittiert. Der Quotient der Intensitäten der emittierten Wellenlängen, die von Edukt und Produkt der Reaktion ausgestrahlt werden, ermöglicht die Beobachtung der Kinaseaktivität in Echtzeit, was sogar in einer lebenden Zelle messbar ist.<sup>143</sup>

### 3 Problemstellung

Durch das zunehmende Durchschnittsalter in der modernen Gesellschaft nimmt die Relevanz altersbedingter Erkrankungen, insbesondere die von Demenzen, stetig zu. Auf lange Sicht könnte der finanzielle Druck die Gesundheitssysteme moderner Staaten zum Kollabieren bringen, wenn sich die Behandlungsmöglichkeiten nicht verbessern.

Bei fast 70 % aller Demenzen handelt es sich um Alzheimer-Erkrankungen, deren Symptome auf den unterbrochenen axonalen Transport und das daraus resultierende Absterben von Neuronen zurückzuführen sind. Die *microtubule affinity-regulating kinase* spielt bei diesen Vorgängen eine zentrale Rolle. Ein Inhibitor bzw. Modulator, der diese Kinase spezifisch zu regulieren vermag, könnte den Krankheitsverlauf um mehrere Jahre verzögern. Berechnungen haben ergeben, dass ein fünfjähriger Aufschub der Krankheitssymptome innerhalb von 50 Jahren zu einer Halbierung der Patienten führt.<sup>144, 145</sup>

Alle bekannten Kinase-Inhibitoren binden innerhalb der ATP-Tasche und beeinflussen daher immer auch andere Kinasen. Im Rahmen dieser Dissertation soll ein alternatives Konzept zum Design eines MARK-spezifischen Inhibitors erarbeitet und umgesetzt werden. Das Ziel besteht darin, die wichtigsten Merkmale beider Substrate der Kinase (Peptid und ATP) in einem Molekül zu vereinen und so Affinität und Spezifität beider Substanzen zu nutzen.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit soll durch Oberflächenplasmonenresonanz verschiedener auf bekannten Zielsequenzen von MARK beruhender Peptide eine optimal bindende Aminosäuresequenz ermittelt werden.

Im anschließenden Abschnitt werden unter Zuhilfenahme des Programms SYBYL und Kristallstrukturen von MARK Vorschläge für die Struktur des Enzyms in einem aktiven Zustand erarbeitet. Durch *docking*-Experimente mit der ermittelten Zielsequenz und dem Nukleotid ATP gilt es, eine plausible Topologie der Bindungskavität, einschließlich der Positionen der gebundenen Substrate, zu erstellen. Diese Geometrie soll genutzt werden, um Abstände und Winkel zwischen Adenin und der zu phosphorylierenden Aminosäure zu ermitteln.

Basierend auf diesem Wissen sollen im dritten Abschnitt Synthesepäne für Aminosäureanaloga entworfen werden, welche Aminosäure, Adenin und einen die ermittelte Geometrie überbrückenden *linker* beinhalten. Die modifizierten Aminosäuren werden nach der Fmoc-Strategie in Peptide eingebaut und diese Konstrukte im letzten Abschnitt auf ihre inhibitorischen Eigenschaften untersucht.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Übersicht der synthetisierten Peptide

Die *microtubule affinity-regulating kinase* (MARK) erfüllt in Neuronen und anderen Zellen vielfältige Aufgaben und phosphoryliert diverse Zielstrukturen. Um herauszufinden, welche Aminosäuresequenz die optimale Basis für den geplanten Inhibitor bzw. Modulator darstellt, wurden auf unterschiedlichen *targets* von MARK beruhende Peptide synthetisiert. Ein MARK-Substrat ist das Protein KSR1 (*kinase suppressor of RAS1*), welches das RAS1 Protein inhibiert. RAS1 ist an mehreren Stoffwechselfaden beteiligt und wird mit Zellwachstum und -differenzierung in Verbindung gebracht. Des Weiteren werden Cdc25C (*cell division cycle phosphatase*), eine Tyrosinphosphatase, die den Phasenübergang von G2 nach M im Rahmen der Mitose reguliert, und PTPH1 von MARK phosphoryliert.<sup>146, 147</sup> Letztere ist eine cytosolische Tyrosin-Phosphatase, welche Eigenschaften eines Tumorsuppressors besitzt.<sup>146, 148</sup> Ansonsten ist nur wenig über die Funktionen dieses Proteins bekannt. Die entsprechenden Sequenzen sind im Anhang aufgeführt.

Tabelle 4.1-1: Liste der Peptide und Phosphopeptide, die in SPR-Experimenten auf ihre Affinität zu MARK untersucht wurden.

Substanz	Sequenz	Herkunft
<b>1</b>	<sup>387</sup> LLRTESV <sup>393</sup>	KSR1
<b>2</b>	<sup>211</sup> LYRSPSM <sup>217</sup>	Cdc25C
<b>3</b>	<sup>354</sup> MRRSLSV <sup>360</sup>	PTPH1
<b>4</b>	<sup>257</sup> KSKIGST <sup>263</sup>	Tau, <i>repeat 1</i>
<b>5</b>	<sup>288</sup> KSKCGST <sup>294</sup>	Tau, <i>repeat 2</i>
<b>6</b>	<sup>257</sup> KSKIG-S(PO <sub>4</sub> )-T <sup>263</sup>	Tau, <i>repeat 1</i>
<b>7</b>	<sup>288</sup> KSKCG-S(PO <sub>4</sub> )-T <sup>294</sup>	Tau, <i>repeat 2</i>
<b>8</b>	<sup>254</sup> KNVSKIGST <sup>263</sup>	Tau, <i>repeat 1</i>
<b>9</b>	<sup>285</sup> SNVQSKCGSK <sup>294</sup>	Tau, <i>repeat 2</i>
<b>10</b>	<sup>317</sup> SKVTSKCGST <sup>326</sup>	Tau, <i>repeat 3</i>
<b>11</b>	<sup>348</sup> DRVQSKIGSL <sup>357</sup>	Tau, <i>repeat 4</i>

Basierend auf den Sequenzen von KSR1, Cdc25C, PTPH1 und Tau wurden die Peptide **1** bis **11** synthetisiert. Im Anschluss an die Synthese und Reinigung wurden die Substanzen an einem Biacore T100 auf ihre Bindungsaffinität zu MARK hin untersucht, um die am besten für das geplante Inhibitor-Design geeignete Sequenz zu ermitteln.

## 4.2 Peptid-Synthese und -Untersuchung

### 4.2.1 Synthese der Peptide und Phosphopeptide

Die Peptide **1** bis **11** wurden in einem Parallelsyntheseroboter ACT MOS  $\Omega$  469 der Firma Advanced Chem Tech nach der Fmoc-Strategie synthetisiert. Als Lösungsmittel für die Kupplungszyklen diente *N,N*-Dimethylformamid. Jede Aminosäure wurde in drei unterschiedlich langen Zyklen zu je 30, 60 und 90 Minuten an das Harz gekuppelt. Die Aminosäuren wurden in vierfachem Überschuss eingesetzt, vom Aktivator TBTU und der Base DIPEA wurden je 5 Äquivalente verwendet.

Im Anschluss an die Synthese wurden die Peptide im sauren Milieu (TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O; 95:5:2) vom Harz abgespalten und mittels *RP*-HPLC aufgereinigt. Die Trennung erfolgte im präparativen Maßstab an einer *RP*-C<sub>18</sub>-Phase unter Verwendung eines Gradienten aus Wasser und Acetonitril. Um eine gleichmäßige Protonierung und damit Trennung nach Hydrophobizität zu gewährleisten, wurden die Laufmittel mit 0.1 % TFA angesäuert. Die Ausbeuten für die nicht modifizierten Peptide, die am Parallelsyntheseroboter aufgebaut wurden, lagen zwischen 25 und 60 %, bezogen auf die eingesetzte Menge Harz.

Die Kupplungen des phosphorylierten Serins und der darauffolgenden Aminosäure wurden in einer speziellen Glasfritte im Mikrowellenreaktor durchgeführt. Die Reaktionslösung wurde über 20 Minuten mit 50 Watt bestrahlt und die Leistung so reguliert, dass die Temperatur 60 °C nicht überstieg. Die Ausbeuten am Ende der Synthese lagen bei 2 %, was auf die sterisch anspruchsvollen Schutzgruppen des Phosphats und eine große Zahl an Nebenreaktionen zurückzuführen ist.

### 4.2.2 SPR-Studien der Peptide und Phosphopeptide

Die Oberflächenplasmonenresonanz stellt eine wichtige Methode dar, um die Bindungseigenschaften synthetisierter Verbindungen gegenüber MARK zu charakterisieren. Die Interaktionen zwischen den Bindungspartnern können in einem fließenden System in Echtzeit verfolgt werden. Aus den gewonnenen Daten lassen sich thermodynamische Bindungskonstanten und kinetische Daten ableiten. Um die synthetisierten Substanzen vermessen zu können, wurde zunächst die rekombinant exprimierte Kinase auf der Dextranmatrix in einer Flusszelle eines CM5-Chips (*GE Healthcare*) immobilisiert. Es

## Ergebnisse und Diskussion

handelte es sich bei dem Protein um die Mutante T208E, die eine aktivierende Phosphorylierung mimikriert und um einen Faktor von etwa 10 aktiver ist als das native unphosphorylierte Protein.

Zur Immobilisierung des Proteins wurde zunächst eine Aktivierung der Carboxylgruppen auf der Dextranmatrix mittels EDC und NHS durchgeführt. Anschließend erfolgte die Injektion der Proteinlösung in Acetatpuffer (pH 5.5). Insgesamt konnten 9206 RU auf der Oberfläche der Messkammer des Chips immobilisiert werden. Dies entspricht in etwa 9.2 ng bzw. 240 fmol Protein. Nicht umgesetzte Carboxylgruppen der Dextran-Matrix wurden in beiden Flußzellen mit einer Ethanolamin-Lösung blockiert, um unerwünschte Wechselwirkungen auszuschließen.

Nach Gleichung 1 (siehe Abschnitt 2.2) resultiert aus der Menge des immobilisierten Proteins bei einer Ligandenmasse von etwa 860 g/mol und unter der Annahme einer Bindung nach dem *one-site-binding*-Modell eine maximal zu erwartende RU-Antwort von 206 RU. Deutlich höhere Messwerte lassen auf *rebinding*-Effekte und unspezifische Wechselwirkungen zwischen Ligand, Protein und Matrix schließen.

Für sämtliche Messungen und Konzentrationsreihen wurde ein steril filtrierter PBS-Puffer (pH 8.0) verwendet. Es wurden Konzentrationen von 0, 62.5, 125, 250, 500 und 1000  $\mu\text{M}$  in aufsteigender Reihenfolge bei einer konstanten Temperatur von 25 °C vermessen. Zu Beginn jeder Messreihe wurde die Nulllinie über Pufferinjektionen bestimmt. Jede einzelne Messung erfolgte über einen Zeitraum von 660 Sekunden bei einer Flussrate von 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; gefolgt von einer Dissoziationszeit von 180 Sekunden. Die anschließende Regeneration erfolgte mit 0.1 M NaOH-Lösung über 25 Sekunden bei einer Flussrate von ebenfalls 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  mit einer darauffolgenden Stabilisierungsperiode von 20 Sekunden.

Am Anfang und am Ende eines mehrere Konzentrationsreihen umfassenden Messzyklus wurde jeweils ein kurzes Peptid als Referenz vermessen, um eine Aussage über die Proteinstabilität im Rahmen der Messung machen zu können. Sowohl bei diesen als auch bei späteren Messungen mit demselben Chip konnten identische  $K_D$ -Werte bestimmt werden. Allerdings wurde beobachtet, dass sich in einem mehrere Monate umfassenden Lagerzeitraum die Aktivität des immobilisierten Proteins auf dem Chip verringert. Nach etwa 200 Tagen Lagerung in PBS-Puffer bei 4 °C konnten noch 25 % der ursprünglichen Aktivität nachgewiesen werden. Die aus den Kurvenverläufen ermittelten  $K_D$ -Werte des Testpeptids stimmten jedoch überein.

## Ergebnisse und Diskussion

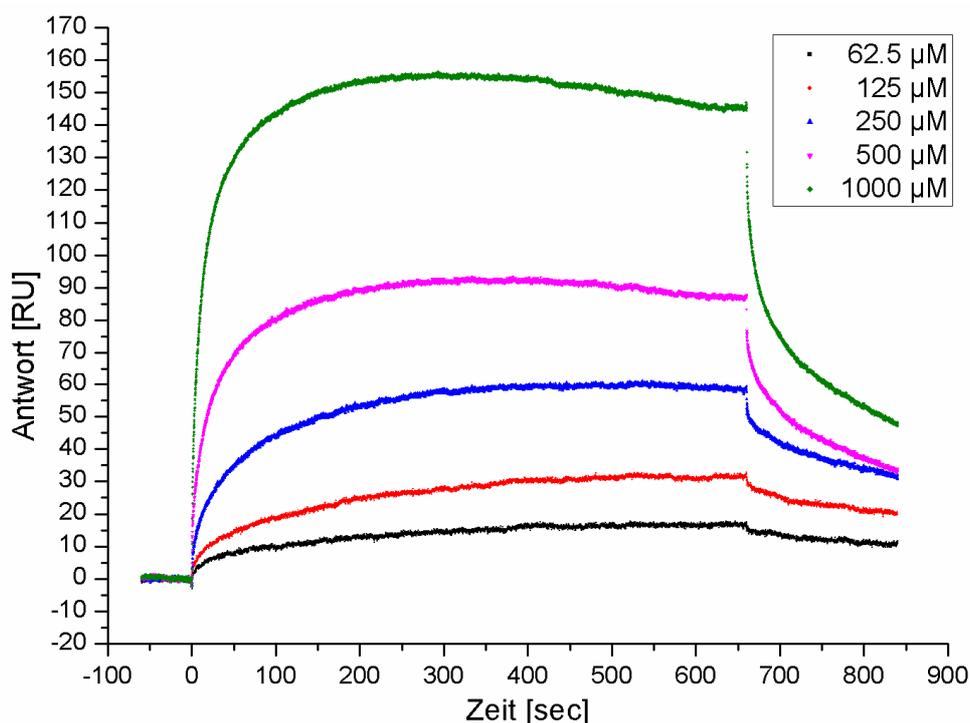


Abbildung 4.2-1: Sensogramm von **1** ( $^{387}\text{LLRTE}^{\text{SV}393}$ ), welches die Konzentrationsabhängigkeit der Interaktion mit dem immobilisierten Protein zeigt. Mit einem  $\text{RU}_{\text{max}}$  von 160 RU befinden sich die Daten im zu erwartenden Bereich von maximal 206 RU.

Die Biacore T-100-Software erzeugt störungsfreie Sensogramme, indem Pufferinjektionen automatisiert von den erhaltenen Messkurven subtrahiert werden. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software Origin 7.5 nach dem *one-site-binding*-Modell ausgewertet. Der Verlauf der Sensogramme ist in Abbildung 4.2-1 anhand der Daten von **1** (KSR1) dargestellt. Circa 200 Sekunden nach der Injektion befindet sich das System im Gleichgewichtszustand (*steady state*), wobei 80 % der Antwort bereits nach 55 Sekunden erreicht sind (siehe Abbildung 4.2-1). Die Auftragung der  $\text{RU}_{\text{max}}$ -Werte gegen die zugehörigen Konzentrationen der vermessenen Liganden liefert einen Ausschnitt einer Sättigungskurve, aus deren Verlauf nach dem *one-site-binding*-Modell die thermodynamische Dissoziationskonstante ( $K_D$ -Wert) der Interaktion berechnet werden kann. Die Ergebnisse der Gegenüberstellung (siehe Abbildung 4.2-2) der Peptide **1** bis **5** zeigen, dass sich die Affinitäten der einzelnen Substanzen nur geringfügig unterscheiden. Sämtliche Werte liegen im niedrigen millimolaren Bereich und weisen sehr geringe Fehler auf.

## Ergebnisse und Diskussion

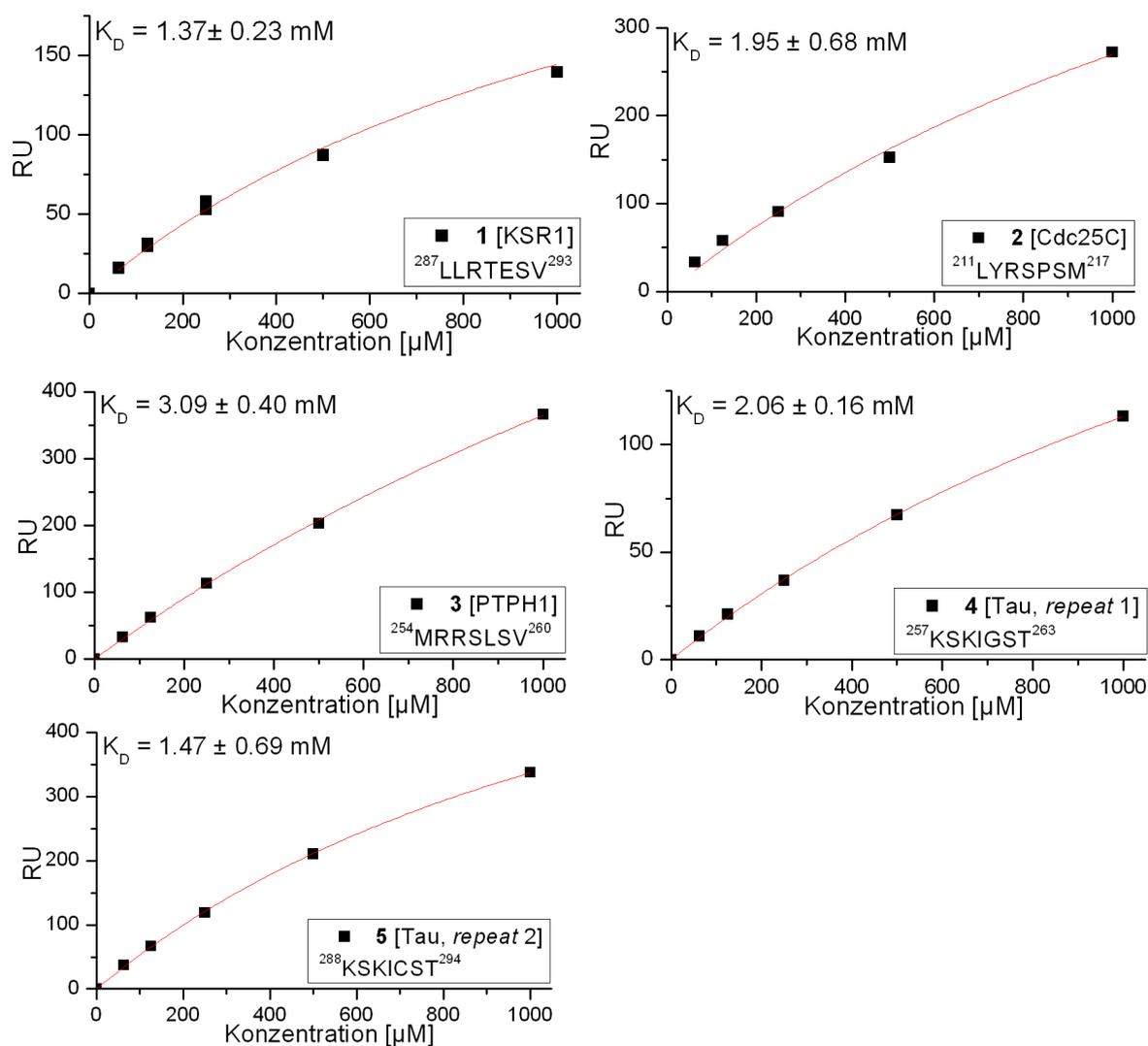


Abbildung 4.2-2: Auftragung der RU-Antworten gegen die Konzentration für die Peptide 1 bis 11. Mit  $K_D$ -Werten zwischen 1.5 und 3.1 mM liegen alle Werte sehr nahe beieinander. In 3 der 5 Fälle liegen die  $RU_{max}$ -Antworten außerhalb des postulierten Werts von 206 RU. Allerdings ist nicht zu erkennen, dass die Krümmung in eine unspezifische Gerade übergeht.

Die auf KSR1 und dem 2. Tau-repeat basierenden Peptide 1 (KSR1) und 5 (Tau, repeat 2) zeigen mit einem  $K_D$ -Wert von 1.37 bzw. 1.47 mM die höchste Affinität. 2 (Cdc25C) und 4 (Tau, repeat 1) liegen mit einem Wert von etwa 2 mM in derselben Größenordnung. Interessanterweise wird allgemein davon ausgegangen, dass die Affinität zu repeat 1 und 4 höher ist als die zu den inneren Wiederholungen, was sich im Falle der hier vermessenen Peptide nicht bestätigt hat.<sup>44, 47</sup> Mit einem  $K_D$ -Wert von 3 mM weist 3 (PTPH1) von den hier getesteten Peptiden die geringste Affinität zur immobilisierten Kinase auf.

## Ergebnisse und Diskussion

Neben der Analyse der konzentrationsabhängigen Entwicklung von  $RU_{\max}$  ist auch eine kinetische Auswertung der Daten möglich. Die *Biacore Evaluation Software* erlaubt ein *fitting* der Langmuir-Gleichung auf den RU-Verlauf der Messung einer einzelnen Konzentration (siehe Abbildung 4.2-3). Neben dem  $K_D$ -Wert lassen sich so auch Assoziations- ( $k_a$ ) und Dissoziationsraten ( $k_d$ ) ableiten. Allerdings ist der Fehler dieser Berechnungen aufgrund der schnellen *on-* und *off-rates* recht groß.

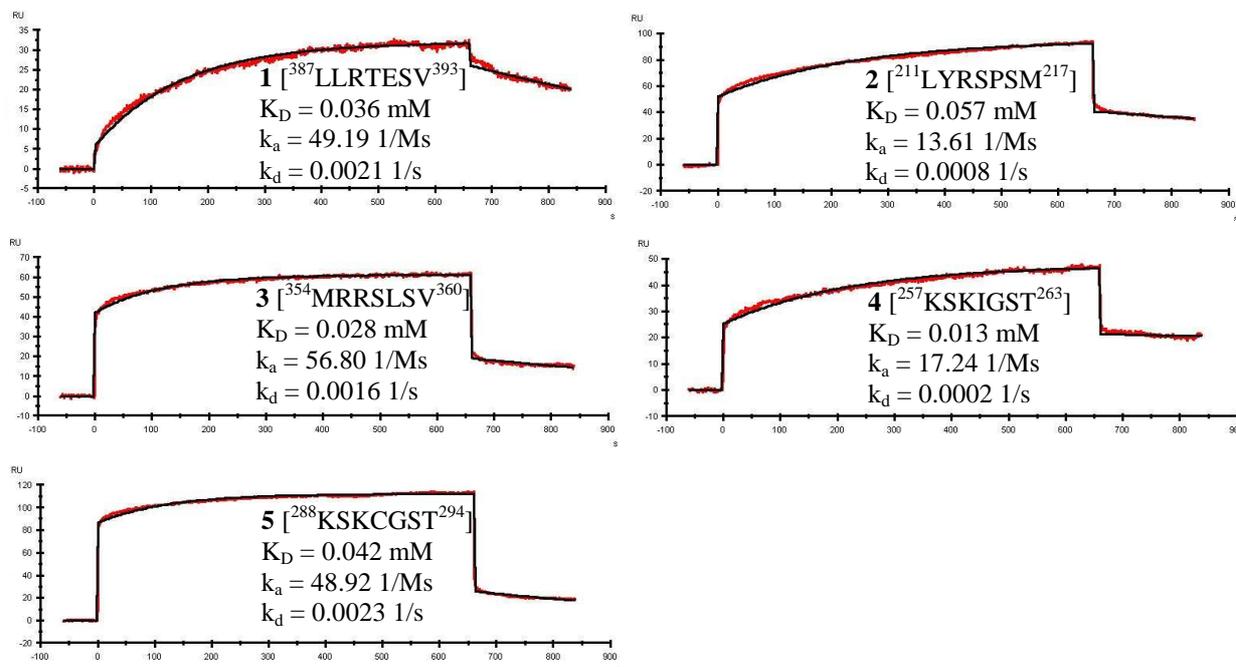


Abbildung 4.2-3: Auswertung einzelner Konzentrationen der Peptide 1 bis 5 durch einen *fit* nach der Langmuir-Gleichung. Aus dem Kurvenverlauf lassen sich  $K_D$ ,  $k_a$  und  $k_d$  extrapolieren. Die  $K_D$ -Werte liegen um Faktor 100 niedriger als die Werte aus dem Affinitäts-Plot. Gründe hierfür können der nicht optimale *fit* und die andere Herangehensweise an die Auswertung sein.

Hierfür wurden Messungen der Konzentration 125 mM der verschiedenen Messreihen gewählt, da hier der Langmuir-*fit* am besten war. Die so erhaltenen Werte liegen zwei Zehnerpotenzen unter denen, die nach der ersten Methodik ermittelt wurden.

Die Affinität für Peptide sollte erwartungsgemäß nicht sehr stark sein. Es waren Werte im niedrigen millimolaren bis hohen mikromolaren Bereich zu erwarten.<sup>149</sup> Die aus den Bindungskurven berechneten Werte zwischen 13 und 57  $\mu$ M liegen deutlich darunter. Während die Affinitätsmessung das KSR1-basierte Peptid 1 als den Bindungspartner mit der höchsten Affinität identifiziert hatte, lieferte die kinetische Auswertung abweichende Resultate. Hier wurde die höchste Affinität für 4 (Tau, *repeat 1*) festgestellt. Analog dazu

## Ergebnisse und Diskussion

zeigten auch die anderen Peptide je nach Auswertungsmethode eine abweichende Reihenfolge der Bindungsaffinitäten (siehe Abbildung 4.2-3).

Der niedrigste  $K_D$ -Wert von 13  $\mu\text{M}$  liefert das auf dem ersten Tau-repeat basierende Peptid (**4**). Während der zweite repeat (**5**) mit 43  $\mu\text{M}$  den zweithöchsten Wert im Rahmen dieser Auswertung liefert. Die Werte der anderen 3 Peptide liegen mit 36  $\mu\text{M}$  (**1**, KSR1), 57  $\mu\text{M}$  (**2**, Cdc25C) und 28  $\mu\text{M}$  (**3**, PTPH1) nahe beieinander.

Die abweichenden Ergebnisse aus beiden Auswertungsmethoden und die teils geringen Unterschiede in den ermittelten Affinitäten lassen keinen eindeutigen Schluss zu, welche der Sequenzen das optimale Bindungsmotiv beinhaltet. Die kinetische Auswertung liefert den angenommenen niedrigen Wert für den ersten repeat (**4**) und den erwarteten Unterschied zum zweiten Tau-repeat (**5**). Allerdings sind die auf Basis der Kinetik der Bindung bestimmten Werte mindestens eine Zehnerpotenz unterhalb des Bereichs angesiedelt, der aufgrund der vorangegangenen Auswertung der Konzentrationsreihen zu erwarten war. Ein wichtiger Faktor könnte hierbei der nicht optimale *fit* einer einzelnen Kurve gegenüber der Auswertung des Effekts von fünf unterschiedlichen Konzentrationen sein.

Wie in Kapitel 2.1 bereits erwähnt, ist Phosphorylierung ein wichtiger Mechanismus in der Regulierung von Proteinaktivitäten. Die Einführung einer voluminösen negativen Ladung kann konformationelle Veränderung in einer Proteinstruktur induzieren und dadurch aktivierende, deaktivierende oder regulierende Wirkungen haben. Da eine Kinase nach erfolgter Übertragung eines Phosphats die Produkte aus der Kavität entfernen muss, bevor ein neuer Reaktionszyklus beginnen kann, ist zu erwarten, dass die Affinität zu den Edukten größer ist, als zu den Produkten. Um nachzuweisen, dass die Phosphorylierung der Peptide die Bindung zur Kinase schwächt, wurden die zu **4** (Tau, repeat 1) und **5** (Tau, repeat 2) analogen phosphorylierten Sequenzen synthetisiert und auf ihre Bindungseigenschaften hin untersucht. Abbildung 4.2-4 zeigt die Auswertung der entsprechenden Sensogramme. Für **4** bewirkt die zusätzliche Phosphatgruppe einen Anstieg des  $K_D$ -Wertes von 2.1 auf 3.5 mM, im Falle von **5** konnte ein Anstieg von 1.5 auf 3.1 mM beobachtet werden.

Diese Daten unterstützen den angenommenen Mechanismus, nachdem die Übertragung der Phosphatgruppe von ATP auf das Substrat-Peptid durch ihr großes negativ geladenes Volumen die Affinität der Kinase zum gebundenen Produkt-Molekül stark beeinflusst. Demnach stört die sterisch anspruchsvolle negativ geladene Phosphatgruppe die Bindung der Peptidsequenz an die Kinase wodurch das Diffundieren der Produkte vom Protein weg und eine erneute Substratbindung erleichtert werden. Inwiefern die unterschiedlichen Affinitäten

von ATP und ADP zur Kinase diesen Vorgang beeinflussen, wurde im Rahmen dieser Experimente nicht überprüft. Eine Untersuchung der verschiedenen Röntgenkristallstrukturen liefern jedoch Indizien dafür, dass auch die Hydrolyse des Nukleotids eine Konformationsänderung im Protein induzieren kann (siehe Abschnitt 4.3.4). Da die *turnover-number* von MARK vergleichsweise gering ist ( $k_{\text{cat}} = 1 \text{ s}^{-1}$ ), müssen diese Unterschiede nicht so gravierend ausfallen wie bei Proteinen mit sehr hohen Umsatzzahlen.<sup>41</sup> Daher ist es nicht verwunderlich, dass sich diese Differenzen nicht in Zehnerpotenzen ausdrücken.

Es ist anzunehmen, dass verhältnismäßig geringe Affinitäts-Unterschiede zwischen Substrat und Produkt zusammen mit der proteininternen Mechanik den Mechanismus der Kinase bestimmen.

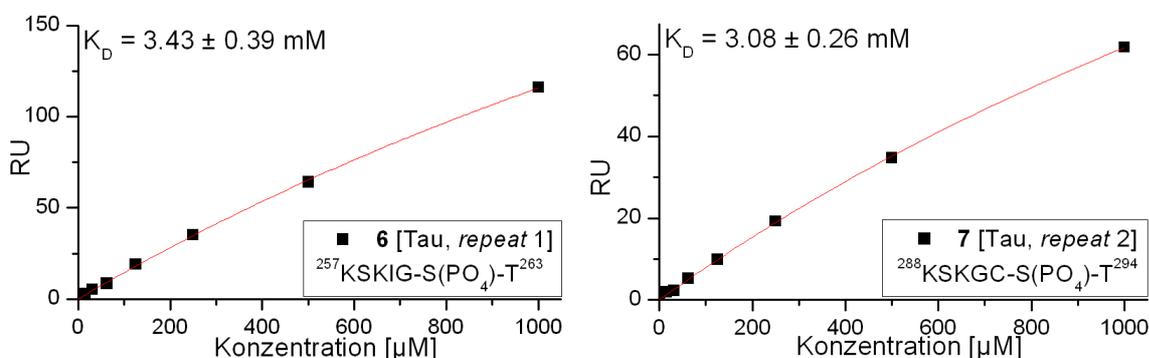


Abbildung 4.2-4: Die Bindungskurven der phosphorylierten Peptide weisen auf eine Erhöhung des  $K_D$ -Wertes durch die zusätzliche Phosphat-Gruppe hin. Dies führt zu einer erhöhten Dissoziation zwischen Kinase und Produkt und vereinfacht eine erneute Substratbindung.

Die kinetische Auswertung der phosphorylierten Peptide zeigt ein analoges Bild zu den Auswertungen der vorangegangenen Substanzen. Die Dissoziationskonstante steigt für **6** (Tau, *repeat 1*) wie bei dem nicht phosphorylierten Analogon um 2 Größenordnungen, bei **7** (Tau, *repeat 2*) ist es eine halbe Zehnerpotenz. Die Reihenfolge der *repeats* unterscheidet sich in beiden Auswertungsvarianten, aber der Effekt der Phosphorylierung auf die Bindungsaffinität ist deutlich zu erkennen.

Um die Unterschiede innerhalb der vier Tau-*repeats* besser bewerten zu können, wurden 4 Peptide synthetisiert, deren Sequenzen auf den unterschiedlichen Wiederholungen des SKIGX-Motivs beruhen. In der Literatur werden der erste und der vierte *repeat* als primäre Phosphorylierungsziele von MARK beschrieben, wobei die erste Wiederholungssequenz stärker phosphoryliert wird als die vierte.<sup>41, 68</sup>

## Ergebnisse und Diskussion

Der Ausschnitt, den die Peptide **1** bis **5** darstellen, wurde *N*-terminal um 3 Aminosäuren der Proteinsequenz verlängert. Während die thermodynamische Auswertung Daten lieferte, die analog zu den vorangegangenen Messungen Bindungskonstanten im mittleren bis hohen mikromolaren Bereich ergaben, war eine kinetische Auswertung nicht möglich. Auch bei niedrigen Konzentrationen waren die *fits* aufgrund der Kurvenform mit einem sehr großen Fehler behaftet.

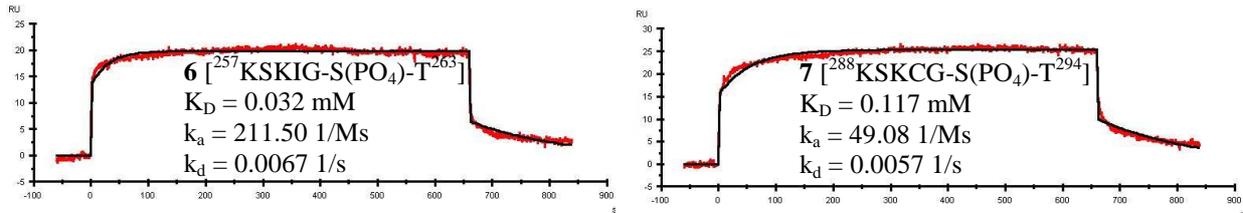


Abbildung 4.2-5: Kinetische Auswertung der Messkurven der Peptide **6** und **7** bei einer Konzentration von 125  $\mu\text{M}$ . Die Unterschiede der Ergebnisse sind zu denen der weiter oben besprochenen Peptide vergleichbar. Deutlich ist zu erkennen, dass die Phosphorylierung einen negativen Effekt auf die Bindungsaffinität hat.

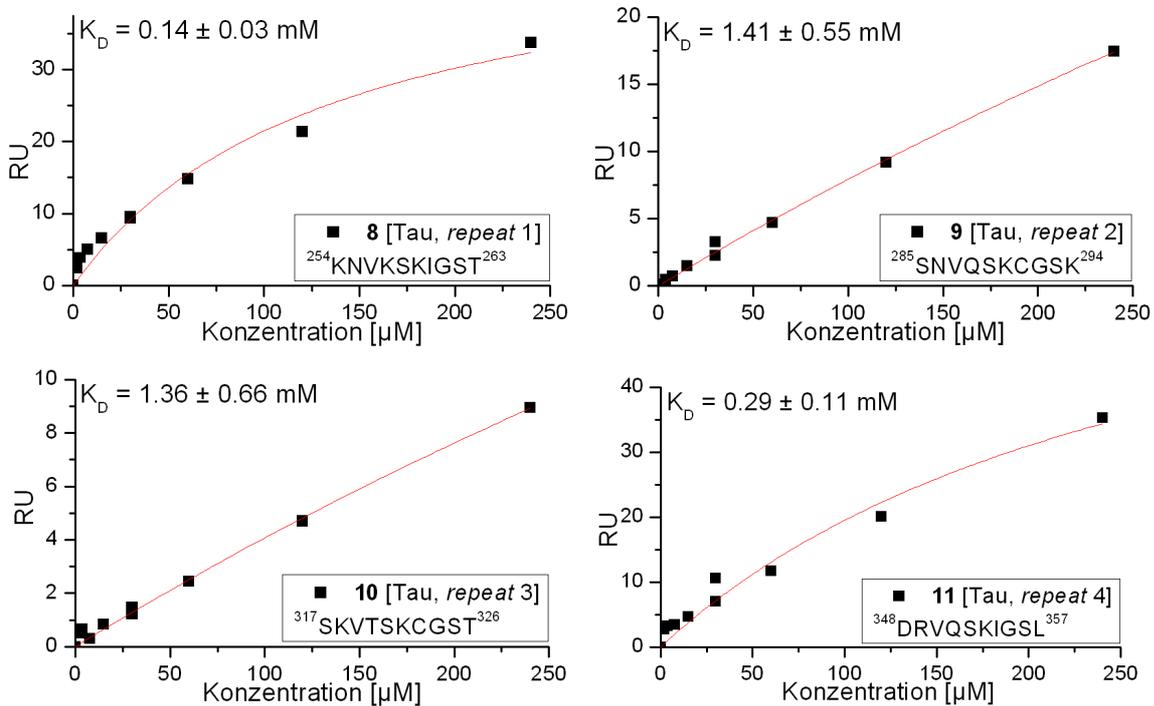


Abbildung 4.2-6: Darstellung der Bindungskurven der Peptide **8** bis **11**, die im Gegensatz zu **1** bis **5** aus 10 statt 7 Aminosäuren bestehen. Der erste und der vierte repeat sprechen sehr stark auf die *N*-terminale Verlängerung um 3 Aminosäuren an. Der  $K_D$ -Wert fällt um Faktor 10 ab. Die Bindungskonstanten der beiden mittleren repeats sind identisch mit den kürzeren Peptiden (**4**, **5**, siehe Abbildung 4.2-3).

Eindeutig geht aus den Daten hervor, dass der erste und der vierte *repeat* deutlich stärker binden als ihre inneren Pendanten (siehe Abbildung 4.2-6). Im Falle des ersten SKIGX-Motivs fällt der  $K_D$ -Wert durch die drei zusätzlichen Aminosäuren um circa Faktor 10 auf 140  $\mu\text{M}$  ab. Im Falle der vierten Wiederholung ist der Wert mit 290  $\mu\text{M}$  immer noch deutlich geringer als die Werte der mittleren *repeats*. Letztere profitieren überhaupt nicht von den zusätzlichen Aminosäuren, die Affinität von **5** (Tau, *repeat* 2) und dem verlängerten Analogon **9** (Tau, *repeat* 2) ändert sich praktisch nicht.

Daraus folgt, dass die Verlängerung des Peptids **4** (Tau, *repeat* 1, KSKIGST) auf **8** (Tau, *repeat* 1, KNVKSIGST) einen deutlichen Effekt durch zusätzliche Kontakte zum Protein aufweist. Die Änderung von **5** (Tau, *repeat* 2, KSKCGSK) auf **9** (Tau, *repeat* 1, SNVQSKCGSK) führt dagegen jedoch zu keiner messbaren Veränderung. Im Falle von **8** muss es dem Peptid möglich sein, eine zusätzliche Wechselwirkung zwischen Protein und dem *N*-terminalen Lysin bzw. dem *C*-terminalen Threonin zu erzeugen, die das Serin bzw. Lysin im Falle von **9** nicht auszubilden vermag.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Affinität zur Kinase sowohl vom Bindungsmotiv als auch von dem verwendeten Sequenzbereich abhängig ist. Das in der Literatur häufig herangezogene KXGS-Motiv stellt den Kern des Bindungsepitops dar, allerdings dürfte ein zwei- bis dreimal so großer Sequenzausschnitt das vollständige Bindungsmotiv besser beschreiben. Vermutlich spielen neben der Sequenz auch diverse Cofaktoren wie z. B. Phosphorylierungsmuster von MARK und die Lokalisation eine wichtige Rolle in der Steuerung dieser vielseitigen Kinase.

Wichtiger Bestandteil des Mechanismus der Phosphorylierung ist die geringere Affinität der Produkte gegenüber den Substraten. Dies konnte im Rahmen der Überprüfung der Bindungseigenschaften der phosphorylierten Peptide im Vergleich zu den analogen nicht phosphorylierten Substanzen nachgewiesen werden. Zusätzlich sind vermutlich auch im folgenden Kapitel näher besprochene strukturelle Veränderungen im Protein essenzieller Bestandteil der Vorgänge der wiederholten Substratbindung und -umsetzung.

Im Rahmen dieser Versuche konnte aufgrund der relativen Ähnlichkeiten in den beobachteten Affinitäten keine eindeutige Entscheidung getroffen werden, welche Aminosäuresequenz den besten Ausgangspunkt für eine Inhibitorsynthese darstellt. Die Verlängerung der Peptidsequenzen des ersten Tau-*repeats* führt definitiv zu einer Verbesserung der Bindungseigenschaften. Dies ist nur logisch, wenn man die Kinase näher betrachtet. Wie in Abschnitt 4.3 beschrieben, decken etwa 13 Aminosäuren mit einer mittig gelegenen

## Ergebnisse und Diskussion

Phosphorylierungsstelle die komplette Front der Kinase ab und sollten alle relevanten Kontakte der Zielsequenz beinhalten. Inwiefern zusätzliche aus der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur des nativen Substrats hervorgehende Interaktionen im Hinblick auf weit von der Kavität entfernte Positionen der Proteinoberfläche eine Rolle spielen, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden.

Für die folgenden *molecular modelling*-Arbeiten wurden neben ATP auf der Sequenz des ersten *repeats* beruhende Peptide als Ausgangssubstrat verwendet. In ihrer verlängerten Variante hat diese Sequenz gute Bindungseigenschaften gezeigt und bestätigt die in der Literatur vorherrschende Meinung, dass der erste *repeat* ein primäres *target* von MARK darstellt.<sup>41, 68, 150</sup>

### 4.3 *molecular modelling*

Röntgenkristallstrukturen von Proteinen, die aus Online-Datenbanken stammen, lösen nicht Atomkerne auf sondern die Elektronen, die mit der Röntgen- bzw. Synchrotronstrahlung wechselwirken. Daher handelt es sich bei den Strukturen genau genommen um Elektronendichteverteilungen innerhalb der Elementarzelle des Kristalls.

Die Auflösungen liegen nur selten unterhalb von 2 Å, daher werden Protonen nicht aufgelöst und andere Details wie die Ausrichtung von NH<sub>2</sub>-Gruppen und Carbonylfunktion von Asparagin und Glutamin sind nicht unterscheidbar. Deshalb sind ihre Positionen bzw. Ausrichtungen häufig unklar und müssen *in silico* modelliert werden. Außerdem kann das Fehlen der nativen wässrigen Umgebung im Kristall Einfluss auf die Struktur haben.

Die beiden zum Zeitpunkt der *modelling*-Arbeiten verfügbaren und am besten aufgelösten Kristallstrukturen von MARK (1Y8G und 2HAK, Auflösung 2.5 Å bzw. 2.6 Å) sind bis auf einige Aminosäuren in der Peripherie des Proteins deckungsgleich. Aufgrund seiner uneinheitlichen Positionierung im Kristall von 1Y8G ist der Großteil der regulatorischen Schleife, die den Zugang zum aktiven Zentrum steuert, hier nicht aufgelöst. Die Elementarzellen beider Varianten bestehen aus Dimeren. Der regulatorische *loop* macht den Hauptteil der Dimerisierungsdomäne in beiden Strukturen aus und ist dadurch in die *binding site* zurückgefaltet, was in der Struktur 2HAK gut zu erkennen ist. Folglich liegt MARK in einer inaktiven Konformation vor, die nicht dazu in der Lage ist, Substrate zu binden.

Es ist daher anzunehmen, dass die in 1Y8G nicht aufgelösten Aminosäuren Lys<sup>190</sup> bis Pro<sup>214</sup> den Hauptteil des im Rahmen der Protein-Regulation beweglichen Bereichs darstellen. Die neueren ebenfalls von Mandelkov *et al.* veröffentlichten Strukturen 3FE3 (veröffentlicht 12/2008, Auflösung 1.9 Å) und 2WZJ (veröffentlicht 12/2009, Auflösung 2.8 Å) weisen eine zu 2HAK analoge Positionierung der regulatorischen Schleife auf, sie geben ebenfalls eine inaktive Struktur wider.

Die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Arbeiten mit der Struktur 1Y8G und 2HAK gehen davon aus, dass die nicht zu dem Bereich Lys<sup>190</sup> bis Pro<sup>214</sup> gehörigen Aminosäuren ein korrektes Bild der funktionalen Kinase wiedergeben.

### 4.3.1 Strukturoptimierungen

Zu Beginn musste die Kristallstruktur von MARK überarbeitet und optimiert werden, bevor weitere Arbeiten mit ihr möglich waren. Nach der Kontrolle der Atomtypen und dem Ergänzen der Protonen wurde die Struktur energetisch optimiert. Für die Berechnung der atomaren Partialladungen wurde das Modell von Gasteiger und Marsili verwendet. Mit dem Tripos-Kraftfeld und dem Modell Amber für die abstandsabhängige Wirkung der Ladungen wurde die Struktur energetisch minimiert.

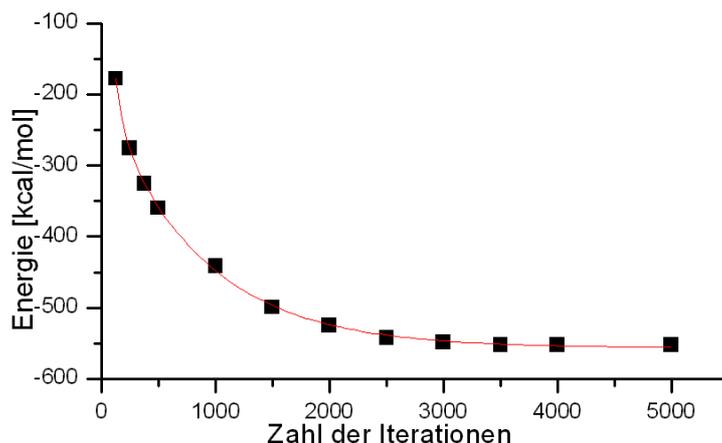


Abbildung 4.3-1: Darstellung der energetischen Entwicklung der Kristallstruktur während der Optimierung. Zu Beginn beträgt der Wert 48646 kcal/mol. Im Bereich jenseits von 3000 Iterationen finden keine relevanten Änderungen mehr statt.

Als Grundlage für die weiteren Arbeiten wurde die optimierte Struktur nach 3000 Iterationen gewählt. Aufgrund der Tatsache, dass keine relevanten Änderungen der Gesamtenergie mehr auftreten, sind weitere Iterationen nicht nötig (siehe Abbildung 4.3-1). Zusätzliche Optimierungsschritte können Rückfaltungsprozesse von Aminosäureseitenketten zur Folge haben und die resultierende Struktur verfälschen.

Während der Optimierung wurden Abstände zwischen verschiedenen Positionen innerhalb der Bindungstasche vermessen. Dadurch konnte die Stabilität des aktiven Zentrums während der Optimierung überwacht werden. Beobachtet wurden die Abstände zwischen den Aminosäurepaaren Ile<sup>112</sup>/Asp<sup>175</sup>, Asn<sup>180</sup>/Cys<sup>166</sup>, Ile<sup>191</sup>/His<sup>173</sup> und Ala<sup>162</sup>/Ile<sup>103</sup> (siehe Abbildung 4.3-2). Die Distanzen zwischen den  $\alpha$ -C-Atomen von vier Paaren von Aminosäuren wurden im Verlauf der Optimierung beobachtet, ebenso die Entfernung zwischen den dazugehörigen endständigen Atomen der Seitenketten (siehe Abbildung 4.3-3).

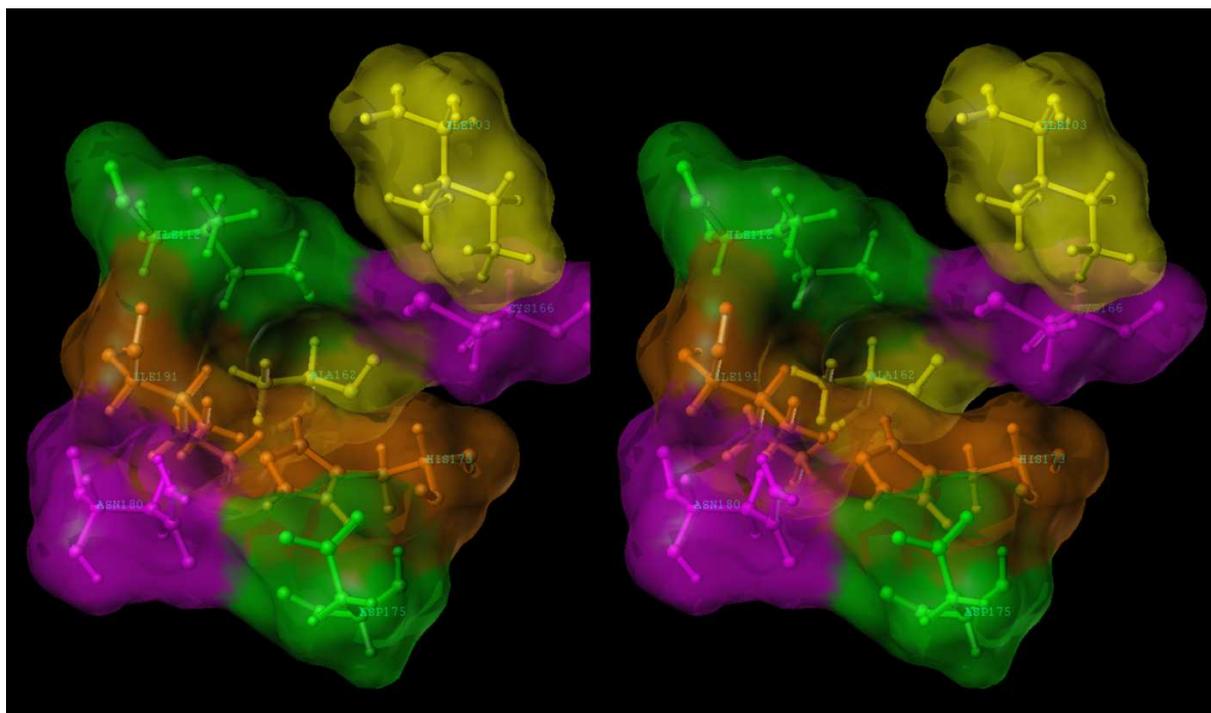


Abbildung 4.3-2: Darstellung der Positionen der Aminosäuren, deren Distanzveränderungen im Rahmen der Optimierung in Abbildung 4.3-3 abgebildet sind. Die gleichfarbigen Bereiche entsprechen jeweils den Aminosäuren, deren Abstände in die Grafik einfließen. Die Perspektive entspricht einem frontalen Blick in die Bindungskavität, die Substratbindung findet im Zentrum statt. Die Paarung baut sich folgendermassen auf: grün: Ile112/Asp175; magenta: Asn180/Cys166; orange: Ile191/His173; gelb: Ala162/Ile103.

Die Verbindungslinien der Aminosäurepaare treffen sich in der Mitte der Kavität und spannen ein sternförmiges Muster. Die Beobachtung der radial angeordneten Abstände im Inneren der Struktur zeigten, dass nur sehr geringe Veränderungen stattfinden und daher die geometrische und elektronische Form der Bindungstasche im Verlauf der Optimierung praktisch konstant bleibt. Während der ersten 1500 Iterationen schwanken die Distanzen um bis zu 1 Å und verändern sich danach praktisch nicht mehr.

Weder die vermessenen *backbone*-Positionen noch die endständigen Atome der Seitenketten unterliegen nennenswerten Ortswechselln. Die resultierende Struktur war nun fehlerbereinigt, energetisch optimiert und die Kavität zeigte strukturelle Invarianz gegenüber der Bearbeitung auf.

## Ergebnisse und Diskussion

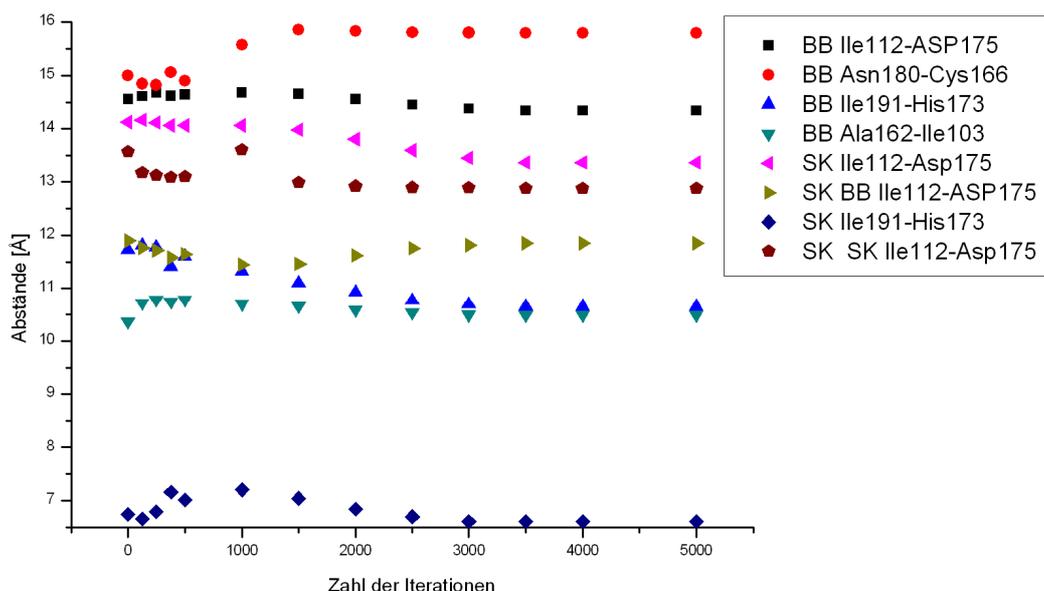


Abbildung 4.3-3: Darstellung der Entwicklung verschiedener Abstände während des Optimierungsvorgangs. Vermessen wurden Entfernungen der  $\alpha$ -C-Atome und der Enden der Seitenketten zwischen den Aminosäurepaaren Ile112/Asp175, Asn180/Cys166, Ile191/His173 und Ala162/Ile103.

### 4.3.2 Definition der ATP-Bindungskavität

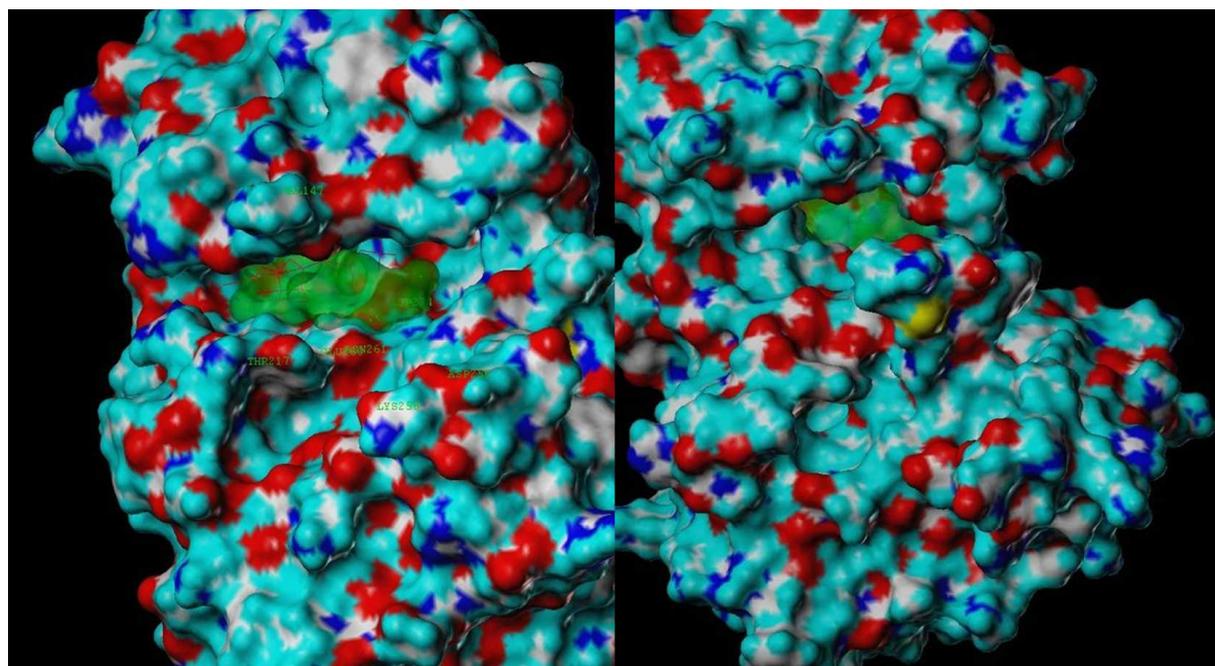
Die SYBYL-Routine *siteID find pockets* ermöglicht die Identifikation von potenziellen Bindungstaschen. Das hier benutzte sogenannte *solvation*-Verfahren verwendet eine Monolage kugelförmiger Solvensmoleküle, die die Oberfläche des Proteins bedeckt. In den Kavitäten des Proteins befinden sich viele der Moleküle in unmittelbarer Nahе zueinander. Bei der Suche nach dem aktiven Zentrum lassen sich verschiedene Werte wie die Anzahl der Solvensspharen innerhalb der Kavität, die Konkavität derselben, die Zahl benachbarter Schweratome und andere variieren. Tabelle 4.3-1 listet die im Rahmen dieser Methode wählbaren Parameter auf, die zusammen die Form der zu suchenden Kavität beschreiben.

Von den eng mit MARK verwandten Kinasen AURORA, PKA und GSK3 existieren Röntgenkristallstrukturen mit einem kokristallisierten Inhibitor. Diese zeigen, an welcher Stelle im Protein das Nukleotid bindet. Die Parameter der Suchroutine wurden so optimiert, dass in allen drei Kinasen der Ort des gebundenen Liganden als einzige Bindungsregion identifiziert wurde. Die entsprechende Suche lieferte auch für MARK ein plausibles und eindeutiges Ergebnis, das rechts in Abbildung 4.3-4 zu sehen ist. Unter der Annahme, dass der Kristallisierungsvorgang die Struktur der Substrat-Bindungsregion nicht nennenswert beeinflusst hat, konnte auf die beschriebene Weise der Ort der Nukleotidbindung eindeutig

identifiziert werden. Dies stellte die Basis für die folgenden Arbeiten zur Beschreibung der Geometrie innerhalb der Bindungstasche dar, die wiederum die Grundlage für das Design der potentiellen Inhibitoren war.

*Tabelle 4.3-1: Parameter für die Identifizierung der ATP-Bindungstasche, die sowohl die eindeutige Position des gebundenen Moleküls in Kristallstrukturen analoger Kinasen korrekt vorhersagen als auch dazu führen, dass eine einzige Kavität in der MARK-Struktur als Nukleotid-Bindungstasche vorgeschlagen wird.*

Parameter	Wert
Minimale Konkavität	3 (0-10)
Minimale Größe der Tasche	8 Solvenssphären
Sphärengröße jedes Solvensmoleküls	8.0 Å
Minimale Zahl der benachbarten Schweratome	75
Distanz neben benachbarten Clusteratomen	3.0 Å
Van der Waals Skalierungsfaktor für Solvensmoleküle	0.8



*Abbildung 4.3-4: Links: Die Kinase AURORA mit der errechneten Bindungstasche (grüner Bereich), deren Position mit dem cokristallisierten ADP übereinstimmt. Auf der rechten Seite markiert der grüne Bereich die analog dazu berechnete ATP-Bindungsregion von MARK.*

### 4.3.3 Docking

Um die Beschreibung der Geometrie des Proteins zu vereinfachen, wird in den folgenden Abschnitten des Öfteren Bezug auf die in Abbildung 4.3-4 auf der rechten Seite ersichtliche Perspektive genommen. Der Blick geht frontal in das aktive Zentrum. Die beiden Sphären des Proteins, die sich im Verlauf der Phosphorylierung relativ zueinander bewegen, befinden sich in der oberen bzw. unteren Bildhälfte. In der inaktiven Form verdeckt die regulatorische Schleife den Zugang zur Kavität und klappt im Falle einer Aktivierung zur rechten Seite aus der Kinase heraus.

Ausgehend von der optimierten Struktur und der darin identifizierten Substratbindungstasche (siehe Abbildung 4.3-4 rechts, 4.3-5 und 4.3-6) musste anschließend die Ausrichtung und exakte Positionierung des Nukleotids bestimmt werden. Hierzu wurde die *docking*-Routine Flexidock verwendet, die wie in Abschnitt 2.4 erläutert, anhand eines genetischen Algorithmus die energetisch optimale Position zweier Moleküle zueinander berechnet. Die Base sollte tief in der Tasche liegen, da die Phosphate einen direkten Kontakt zur der zu phosphorylierenden Sequenz haben müssen. Ansonsten wäre das Triphosphat nicht dazu in der Lage, das  $\gamma$ -Phosphat auf das Substrat zu übertragen. Des Weiteren befindet sich ein Magnesiumion im vorderen Bereich der Bindungstasche, welches an Glu100 koordiniert ist und die hohe negative Ladung der Phosphate kompensiert. Daher wurde das ATP-Molekül so in der Bindungstasche positioniert, dass die Base tief in der Tasche mit dem Protein interagieren kann, während die Phosphate im vorderen Bereich mit dem zweiten Substrat interagieren können. Jede Ausrichtung des ATPs wurde mit minimal verschobenen Substratpositionen wiederholt. Hierfür wurde das Nukleotid mehrfach um etwa 1 Å in alle Raumrichtungen verschoben.

Eine Sichtung der Ergebnisse auf Plausibilität war nötig, da in einigen Fällen unlogische Geometrien auftraten. Dies äußert sich in Kollisionen einzelner Atome der beteiligten Moleküle, immenser Energien oder darin, dass das Substrat weitab vom Protein positioniert wurde. Von 40 Ansätzen lieferten 70 % der Berechnungen strukturell sinnvolle Resultate mit gut gegeneinander abgestuften Werten für die Bindungsenergie. Aus der Differenz zwischen der Energie des Gesamtkomplexes und den Energien der einzelnen Komponenten berechnet sich die theoretische Bindungsenergie des ATPs (siehe Gleichung 4.3-1). Hierbei markiert der negativste Wert die energetisch günstigste Geometrie, welche im Rahmen des Modells am wahrscheinlichsten der Realität entspricht (siehe Tabelle 4.3-2).

## Ergebnisse und Diskussion

$$\text{Bindungsenergie} = E_{\text{gesamt}} - (E_{\text{Protein}} + E_{\text{Ligand}})$$

*Gleichung 4.3-1: Die Differenz zwischen der Gesamtenergie des Komplexes aus Protein und Ligand einerseits und der entsprechenden Einzelenergien der beteiligten Moleküle andererseits ergibt die Bindungsenergie des Liganden im Rahmen des Modells.*

Durch das *docking* konnten Position und Ausrichtung des Nukleotids in dem von der Kinase umschlossenen Raum identifiziert werden. Der senkrechte Blick von vorne in die Bindungstasche wird in Abbildung 4.3-5 gezeigt, der seitliche Schnitt durch das Protein auf Höhe des gebundenen Nukleotids ist in Abbildung 4.3-6 dargestellt. Die Base befindet sich tief in der Kavität und in engem Kontakt zum Protein. Am anderen Ende des Moleküls werden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphat durch das Magnesiumion koordiniert. Die Ribose passt von ihren Bindungswinkeln her perfekt und kann durch Wasserstoffbrücken zur Bindungsenergie beitragen (siehe Tabelle 4.3-3 und 4.3-4).

*Tabelle 4.3-2: Rangliste der 10 niedrigsten Bindungsenergien unterschiedlicher docking-Berechnungen von ATP in der Substratbindungstasche von MARK. Der negativste Wert auf Rang 1 stellt die im Rahmen des Modells energetisch günstigste Konformation dar, die für weitere Arbeiten verwendet wurde.*

Rang	Bindungsenergie [kcal/mol]
1	-41.36
2	-37.26
3	-36.82
4	-34.72
5	-33.55
6	-32.20
7	-31.72
8	-31.45
9	-30.30
10	-29.71

Ingesamt finden sich für fast alle Protonen und Heteroatome des Nukleotids potenzielle Wasserstoffbrückenpartner. Nicht immer sind die Winkel für H-Brücken optimal ( $180^\circ$ ), und die Distanzen bewegen sich in eher längeren Bereichen zwischen 2.60 und 3.26 Å. Mit Abständen zwischen 1.15 und 2.70 Å sind die Bindungen der Sauerstoffe des Triphosphats an das Protein dagegen recht kurz. Dadurch könnte es der Kinase möglich sein, das  $\gamma$ -Phosphat sehr genau zu positionieren, damit die Orbitale bei der Übertragung auf das Substrat optimal ausgerichtet sind, um eine neue Bindung einzugehen. Des Weiteren ist zu erkennen, dass

unterhalb der Phosphate Raum vorhanden ist, um die nicht aufgelösten Aminosäuren der regulatorischen Schleife aufzunehmen, worauf in Abschnitt 4.4 näher eingegangen wird. Ob Distanzen oberhalb von 3 Å zu einer Wasserstoffbrücke gehören können oder nicht, kann im Rahmen dieses Modells nicht exakt beantwortet werden. Da kleine Bewegungen innerhalb des Enzyms diese Strecken beeinflussen können, ist es durchaus möglich, dass diese Strecken in der realen Kinase so variieren, dass eine bindende Geometrie zustande kommt. Die exakten Veränderungen innerhalb des Proteins bei der Substratbindung in Lösung können durch *docking*-Berechnungen nicht simuliert werden. Daneben ist unklar, inwiefern bzw. ob Wassermoleküle in der Tasche zusätzliche Bindungen zwischen Substrat und weiter entfernten Aminosäuren vermitteln.

*Tabelle 4.3-3: Liste der potenziellen Wasserstoffbrückenpartner und ihrer Abstände im Modell.*

	ATP	Abstand [Å]	Protein
Adenin	N7	2.65	δ2H His <sup>173</sup>
Phosphate	PαO	2.01	NH <sub>2</sub> Lys <sup>82</sup>
	PαO''	1.97	NH <sub>2</sub> Lys <sup>82</sup>
	PβO	1.34	NH <sub>2</sub> Lys <sup>82</sup>
	PγO	1.15	NH <sub>2</sub> Lys <sup>96</sup>
	PγO'	1.35	NH <sub>2</sub> Lys <sup>96</sup>

Die Oberfläche der Kinase wurde nach dem Standardprogramm von Connolly berechnet, die die einem Wassermolekül zugängliche Fläche des Proteins abbildet. Sauerstoffatome erscheinen hier als rote, Stickstoffatome als blaue, Kohlenstoffatome als weiße und Protonen als cyanfarbene Bereiche. Sich im oder am Protein befindliche Substrate sind in der *ball and stick*-Darstellung abgebildet.

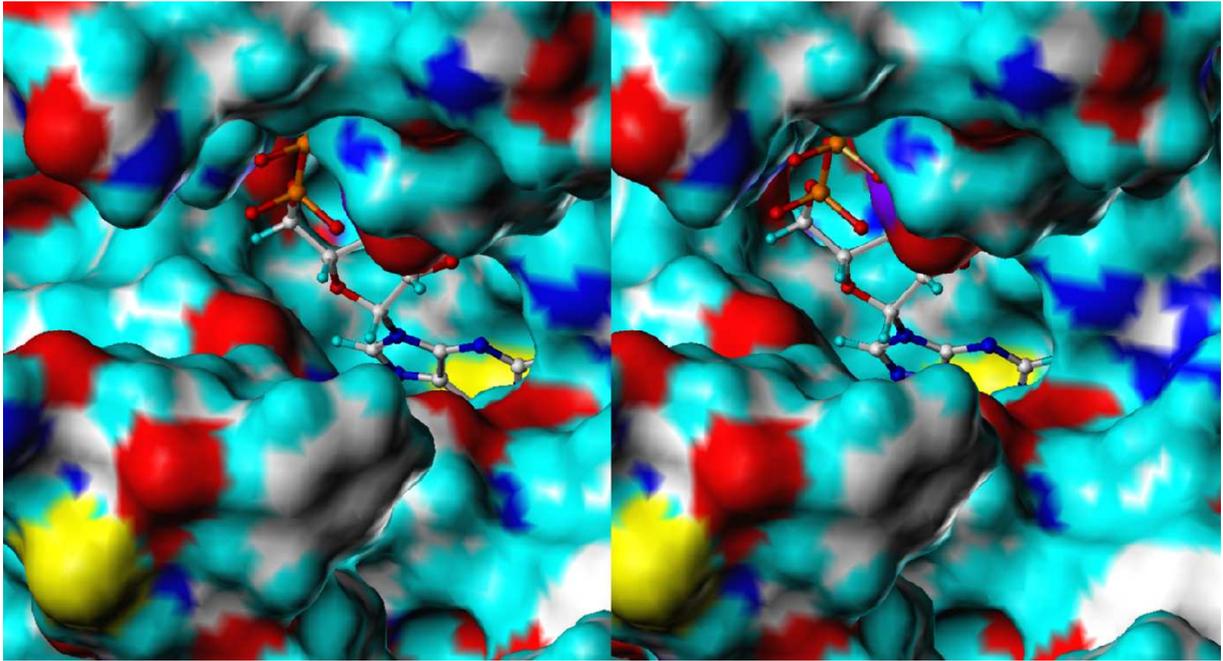


Abbildung 4.3-5: Frontale Ansicht des in die Bindungstasche von MARK gedockten ATPs. Die Ribose überbrückt dabei den Abstand zwischen der tief in der Tasche liegenden Base und die an Glu<sup>100</sup>, Lys<sup>82</sup>, Lys<sup>96</sup> und Leu<sup>97</sup> koordinierten Phosphate.

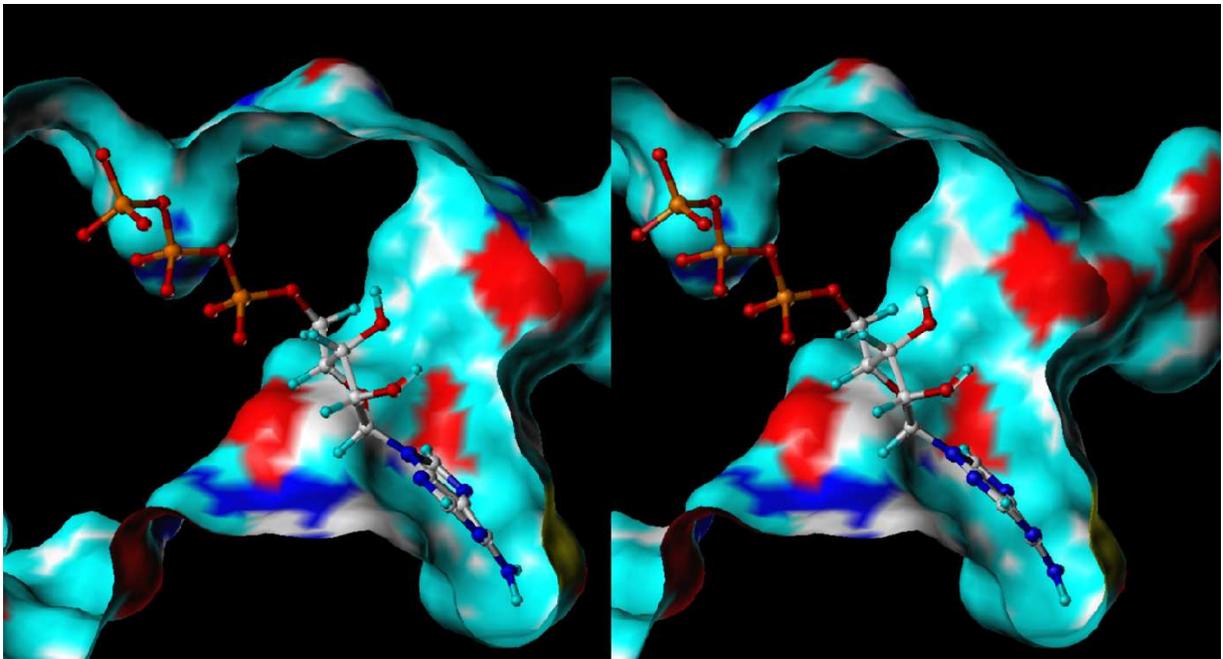


Abbildung 4.3-6: Dargestellt ist ein Querschnitt durch das Protein auf Höhe des gebundenen Substrats. Die Perspektive entspricht einem Blick auf die Struktur aus Abbildung 4.3-5 von der rechten Seite aus.

Allen Abbildungen ist gemein, dass sie dieselbe Ausrichtung aufweisen, wie sie am Anfang des Abschnitts 4.3-4 beschrieben wurde. Lediglich die Positionierung auf der horizontalen Ebene wurde für eine bessere Sichtbarkeit der relevanten Strukturen in einigen Abbildungen variiert. Alle Beschreibungen im Text in Bezug auf Positionen orientieren sich an dieser Ausrichtung.

Neben dem eigentlichen Substrat ATP wurden auch mehrere andere bekannte Kinaseinhibitoren in die Bindungstasche gedockt, um ihre Positionen und Ausrichtungen mit der von ATP vergleichen zu können. Hierbei handelte es sich um Hymenialdisine, Kenpaullon und S-(5'-Adenosyl)-L-Homocystein. Analog zum Vorgehen bei ATP wurden die Substanzen in unterschiedlichen Ausrichtungen und Positionen dem *docking* unterzogen.

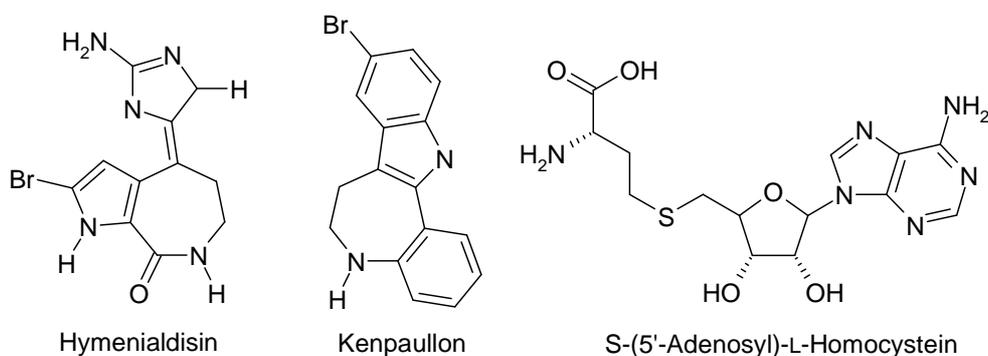


Abbildung 4.3-7: Strukturformeln bekannter Kinaseinhibitoren, die analog zu dem für ATP beschriebenen Verfahren einem *docking*-Experiment unterzogen wurden.

Im hinteren Teil der Bindungstasche stimmen die von den Molekülen eingenommenen Volumina größtenteils überein. Die Winkel in denen die Heterocyclen angeordnet sind, variieren leicht, und die Stickstoffe und Sauerstoffe der einzelnen Moleküle befinden sich an relativ ähnlichen Positionen. Daraus lässt sich ableiten, dass die einzelnen Substrate nach einem analogen Bindungsmuster in der Kinase gebunden werden.

Der offensichtlichste Unterschied betrifft das Nukleotid und das Adenosylhomocystein. Beide ragen aufgrund des Triphosphats bzw. der endständigen Aminosäure weiter aus der Tasche heraus als die anderen beiden Inhibitoren. Während die Phosphate wie oben beschrieben durch Wechselwirkungen über kurze Distanz fest an Glu<sup>100</sup>, Lys<sup>82</sup>, Lys<sup>96</sup> und Leu<sup>97</sup> koordinieren, ist das endständige Cystein abgewinkelt und bindet um einige Å versetzt an das Protein (aus der Perspektive von Abbildung 4.3-4 gesehen weiter unten rechts). Potenzielle Wasserstoffbrücken der endständigen Amino- und Carboxylgruppe zu Asp<sup>175</sup>, Ala<sup>208</sup> und Lys<sup>96</sup> tragen zur relativ hohen Bindungsenergie bei.

## Ergebnisse und Diskussion

Die grundsätzliche Struktur von *S*-(5'-Adenosyl)-L-Homocystein entspricht vom Aufbau her der des geplanten Inhibitors. Allerdings ist der *linker* zwischen Cystein und Adenin so kurz, dass ein entsprechendes Peptid keinen Platz mehr für die fehlenden Aminosäuren der regulatorischen Schleife lassen würde. Eine solche Struktur könnte nur unter großer Spannung die geeignete Form einnehmen, um sowohl den peptidischen als auch den nukleotidischen Teil der Bindungsregion nutzen zu können. Die relativ hohe Bindungsenergie des *S*-(5'-Adenosyl)-L-Homocysteins spricht dafür, dass Kohlenhydrateinheit und Aminosäure dazu in der Lage sind, einige bindende Wechselwirkungen zur Kinase aufzubauen. Allerdings ist diese Aussage spekulativ, da in diesem Modell der regulatorische *loop* nicht vorhanden ist. Es ist anzunehmen, dass dieser ebenfalls in diesem Bereich Kontakte zu anderen Aminosäuren am Rand der Kavität besitzt, die höchstwahrscheinlich mit dem Bindungsmodus des Cysteins interferieren würden.

*Tabelle 4.3-4: Übersicht der jeweils besten Bindungsenergien von vier in die Nukleotidtasche von MARK gedockten Substraten bzw. Inhibitoren.*

Inhibitor	Bindungsenergie [kcal/mol]
ATP	-41.36
Homocystein	-69.61
Hymenialdisin	-39.42
Kenpaullone	-27.20

Nachdem eine plausible Struktur für MARK mit gebundenem ATP erstellt wurde, musste zusätzlich das Peptid in dem Bereich der Tasche positioniert werden, der dem ATP vorgelagert ist. Für dieses zweite *docking* wurden sowohl das Peptid SKIGS als auch die C-terminal um 3 Aminosäuren verlängerte Sequenz SKIGSTEN aus der ersten *repeat*-Region von Tau gewählt, da aus den vorangegangenen SPR-Studien ein deutlicher Affinitätsunterschied zwischen beiden Peptiden festgestellt wurde. Hierfür wurde analog zur Prozedur des *dockings* von ATP verfahren.

In Abbildung 4.3-4 ist zu erkennen, dass eine Kluft quer über die Bindungstasche verläuft, die dazu prädestiniert ist, die Aminosäuren der zu phosphorylierenden Sequenz aufzunehmen. Der vorhandene Raum bietet ausreichend Platz und entsprechende elektronische Gegebenheiten zur Ausbildung von bindenden Wechselwirkungen, um eine circa 12 Aminosäuren lange Sequenz aufzunehmen.

Als Basis für die Positionierung des Peptides diente die Tatsache, dass eine gewisse räumliche Nähe zwischen dem zu phosphorylierenden Serin und dem  $\gamma$ -Phosphat des ATPs gegeben sein

## Ergebnisse und Diskussion

muss. Daher musste die Seitenkette von Ser<sup>262</sup> in die Kavität hineinragen, und für das Peptid kamen zwei grundsätzliche Ausrichtungen des *backbones* in Frage. Der Verlauf vom *N*-Terminus zum *C*-Terminus ist in der Kluft nicht festgelegt. Ausgehend von diesen grundsätzlichen Annahmen wurden *docking*-Studien aus unterschiedlichen Positionen und Ausrichtungen des zweiten Substrates berechnet. Die möglichen Variablen waren der Winkel, in dem die Aminosäureseitenkette von Ser<sup>262</sup> zum Phosphat steht, der Abstand der beiden Moleküle und ob die Zielsequenz vom *N*- zum *C*-Terminus (links nach rechts aus der Perspektive von Abbildung 4.3-4) oder umgekehrt verläuft. Um diesen Parametern gerecht zu werden, wurde das Peptid mit waagerechter Ausrichtung der Hydroxylgruppe von Ser<sup>262</sup> und um 30° nach oben und nach unten abgewinkelt vorpositioniert und ein *docking* durchgeführt. Jedes dieser Szenarien wurde ebenfalls mit einer Verschiebung von 3 Å nach links und nach rechts und mit einer um 180° veränderten Lage des Peptides berechnet.

*Tabelle 4.3-5: Liste der jeweils fünf niedrigsten Bindungsenergien unterschiedlicher docking-Berechnungen der Peptide <sup>258</sup>SKIGSTEN<sup>265</sup> und <sup>258</sup>SKIGS<sup>262</sup> in die ATP beinhaltende Substratbindungstasche von MARK.*

Rang	Bindungsenergie [kcal/mol]	Peptid
1	-33.27	<sup>258</sup> SKIGSTEN <sup>265</sup>
2	-32.21	“
3	-31.51	“
4	-31.14	“
5	-30.81	“
1'	-20.51	<sup>258</sup> SKIGS <sup>262</sup>
2'	-20.02	“
3'	-19.35	“
4'	-19.03	“
5'	-19.74	“

Die Peptide in den resultierenden Strukturen mit den niedrigsten Bindungsenergien wurden anschließend so umpositioniert, dass sich die OH-Gruppe am äusseren Ende der Seitenkette von Ser<sup>262</sup> in unmittelbarer Nähe zum  $\gamma$ -Phosphat des ATP's befand. Ein anschließendes *docking* sollte aufzeigen, in wiefern sich das Peptid wieder vom Nukleotid entfernt. Ebenso wurde mit einer Erhöhung des Substratabstandes um 2 Å verfahren. Im ersten Fall konnte beobachtet werden, dass sich das Peptid wieder annähernd in die ursprüngliche Position vor der Substratannäherung zurückbewegt hat. Die Vergrößerung der Entfernung hatte zur Folge, dass sich das Peptid nicht wieder näher an das Protein heranbewegt hat und es resultierten

keine guten Bindungsenergien. Ergebnisse, die Überlappungen gleichgeladener Atome oder Drehungen von Teilen des Peptides aus der Bindungstasche heraus aufwiesen, wurden verworfen. Tabelle 4.3-5 listet die jeweils besten 5 Bindungsenergien für  $^{258}\text{SKIGS}^{262}$  und  $^{258}\text{SKIGSTEN}^{265}$  an MARK auf.

Aus den Daten geht hervor, dass eine Verlängerung der Aminosäuresequenz von 5 auf 8 Aminosäuren im Rahmen des Modells zu einer Verbesserung der Bindungsenergie von 20.5 auf 33.3 kcal/mol führt. Grund dafür sind die im gleichen Maß gestiegenen Möglichkeiten zur Interaktion mit dem Protein. Daher ist die Bindung des Octapeptids energetisch um circa 13 kcal/mol günstiger als die des Pentapeptids.

Abgesehen von minimalen Verschiebungen im Bereich von 0.1 bis 0.3 Å sind die Positionen der Aminosäuren SKIGS beider Varianten nahezu identisch. Auffällig ist jedoch, dass die Hydroxylgruppe des Serins des kurzen Peptids circa 1 Å in Richtung Beobachter (siehe Perspektive in Abbildung 4.3-4) nach oben gebogen ist.

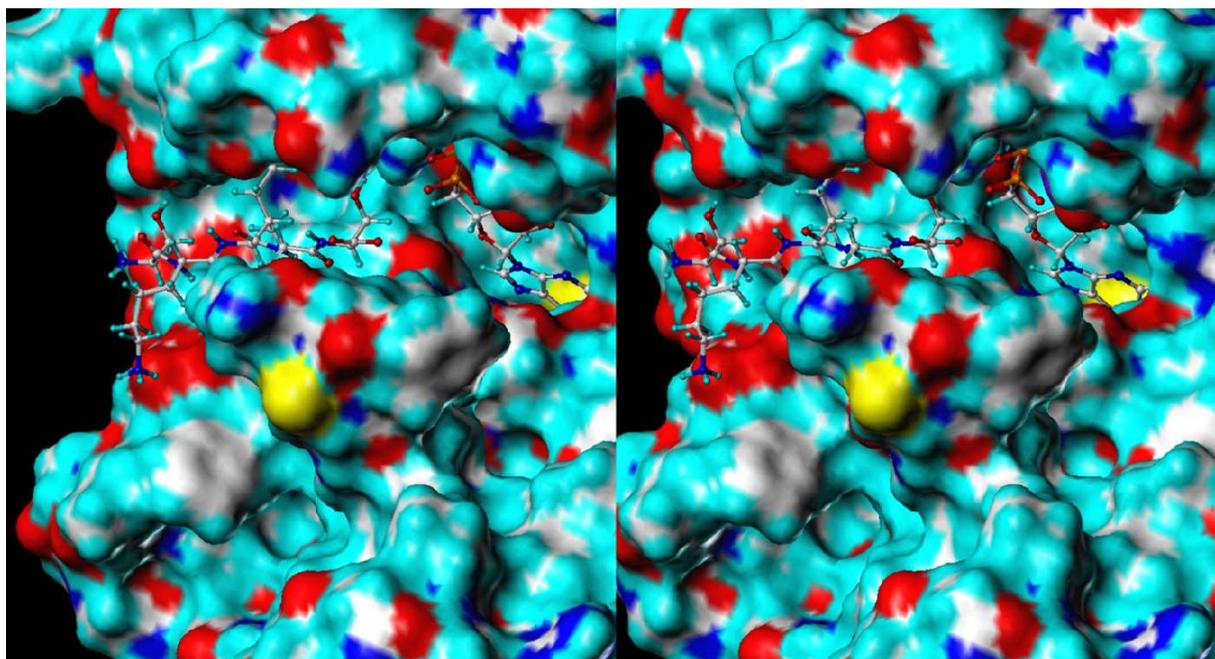


Abbildung 4.3-8: Darstellung von MARK mit gedocktem ATP und dem Peptid  $^{258}\text{SKIGS}^{262}$ . Im unteren rechten Bereich ist zu erkennen, dass Freiraum vorhanden ist, um die in diesem Modell nicht vorhandenen Aminosäuren des regulatorischen loops aufzunehmen.

## Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.3-6: Liste der potenziellen Wasserstoffbrücken zwischen MARK und dem durch docking-Experimente positionierten Peptid <sup>258</sup>SKIGS<sup>262</sup>.

Aminosäure	Atom	Abstand [Å]	Protein
Lys <sup>259</sup>	NζH	1.77	CγO Asp <sup>139</sup>
	NζH'	2.39	CγO Asp <sup>139</sup>

Tabelle 4.3-7: Liste der potenziellen Wasserstoffbrücken zwischen MARK und dem durch docking-Experimente positionierten Peptid <sup>258</sup>SKIGSTEN<sup>265</sup>.

Aminosäure	Atom	Abstand [Å]	Protein
Lys <sup>259</sup>	NζH	1.74	CγO Asp <sup>139</sup>
	NζH'	2.41	CγO Asp <sup>139</sup>
Thr <sup>263</sup>	CβO	1.89	NH Ala <sup>208</sup>
Glu <sup>265</sup>	CδO	2.68	NζH Lys <sup>96</sup>

Die Anzahl der potenziellen Wasserstoffbrücken ist relativ gering (siehe Tabelle 4.3-6 und 4.3-7). Allerdings fehlen in diesem Modell die Aminosäuren des regulatorischen *loop* der erst später an die hier vorliegende Struktur angepasst wurde.

Die Aminosäuren Gly<sup>261</sup> und Ser<sup>262</sup> verfügen in diesem Modell über keinen Kontakt zum Protein in einem Radius von 4.5 Å. Die drei zusätzlichen *N*-terminal positionierten Aminosäuren TEN beeinflussen den Bindungsmodus anscheinend so, dass Spannung im Peptid aufgebaut wirkt, die durch die zusätzlichen Kontakte der drei weiteren Aminosäuren überkompensiert wird. Analog zu einer gespannten Feder könnte diese Energie nach erfolgter Übertragung der Phosphatgruppe auf das Produkt helfen, dieses abzustößen.

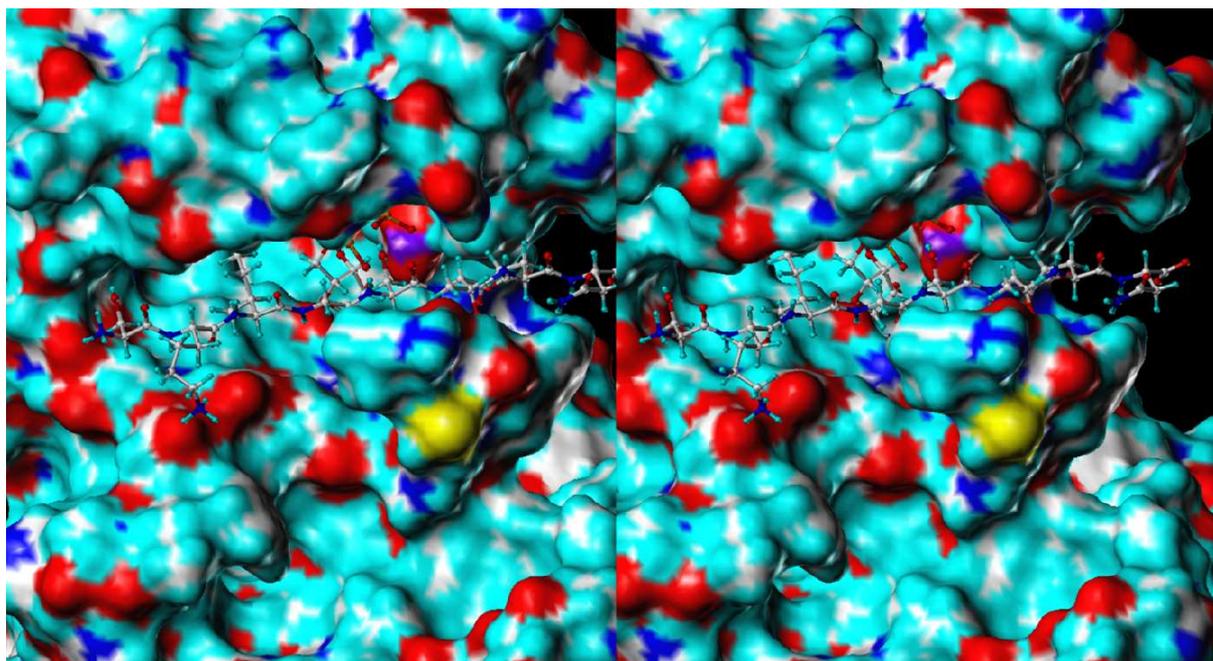


Abbildung 4.3-9: Zu Abbildung 4.3-8 analoge Darstellung mit einem um  $90^\circ$  nach links verschobenen Blickwinkel. MARK ist hier mit gedocktem ATP und dem Peptid SKIGSTEN abgebildet. Hinter den Aminosäuren, die auf der rechten Seite im Vordergrund stehen, befindet sich der Bereich, in dem die regulatorische Schleife verläuft.

#### 4.3.4 Modelle des regulatorischen *loops*

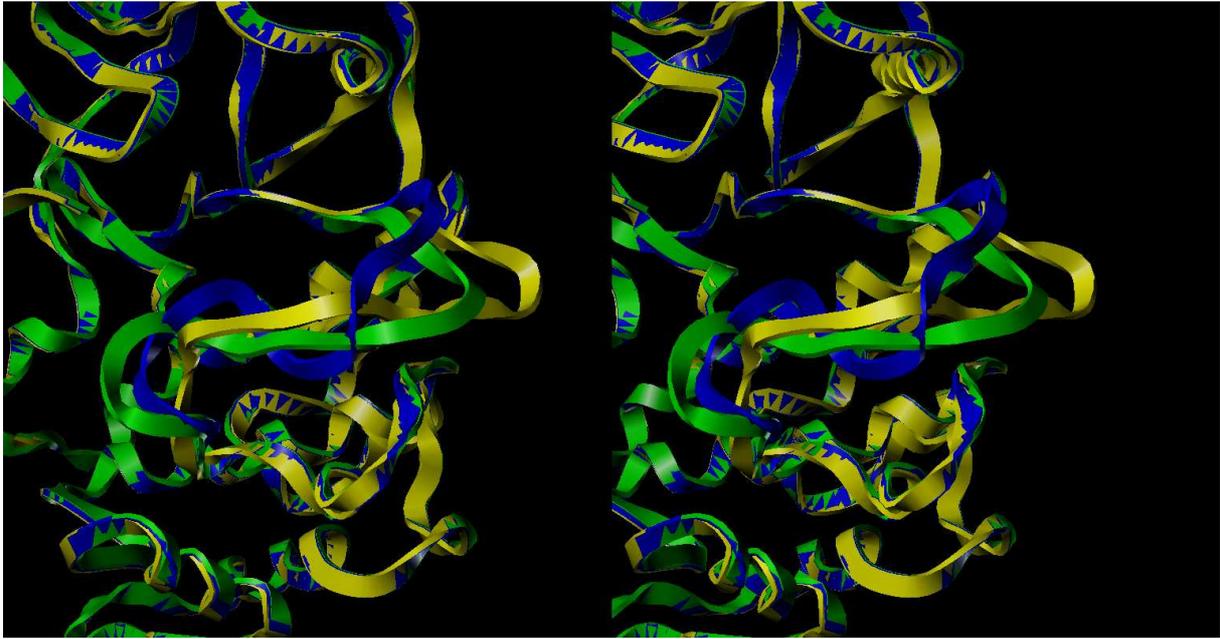
Die vorangegangenen Abschnitte haben gezeigt, wie die Substrate in der Bindungstasche im aktiven Zustand höchstwahrscheinlich positioniert sind. Allerdings wurden in diesem Modell die 25 Aminosäuren der regulatorischen Schleife nicht berücksichtigt, da ihre Positionierung nicht bekannt ist. Keine der bisher bekannten Kristallstrukturen zeigt eine aktive Form der Kinase, und die in einigen Fällen sehr uneinheitliche Struktur des *loops* verhindert sogar die Auflösung dieses Teilbereichs des Proteins. Im Rahmen des Kristallisationsvorgangs kommt es zur Dimerisierung der Kinase, wobei die regulatorische Schleife einen Großteil der Dimerisierungsdomäne ausmacht. Dieser variable Bereich faltet sich während dieses Vorgangs in die Kavität zurück, was zur inaktiven Struktur führt. Alle Versuche, Kristalle von MARK mit kokristallisierten Molekülen zu erzeugen, sind bisher fehlgeschlagen.

Die mit Hilfe der *docking*-Versuche erarbeitete Struktur zeigt eindeutig den Bereich, in welchem die Schleife verlaufen muss. Ausgehend vom Ort der letzten aufgelösten Aminosäure Lys<sup>190</sup> (am linken Rand der Kavität, betrachtet aus der Perspektive in Abbildung 4.3-4) hat es den Anschein, dass die Schleife unterhalb des Triphosphats und der Seitenkette von Ser<sup>262</sup> durch die Kavität verläuft und seitlich aus dem Protein austritt. Dort befindet

sich ein ausreichend breiter Spalt zwischen den Substraten und der Kinase (gut in Abbildung 4.3-9 auf der rechten Seite zu erkennen), der eine passende Größe aufweist. Bei einem anderen Verlauf würde der *loop* mit den Substraten kollidieren und die Phosphorylierung verhindern.

Ziel der folgenden *modelling*-Arbeiten war es, ein funktionales Modell der Kinase zu entwerfen, um Einblicke in die Geometrie der *binding site* zu erhalten. Hierfür wurde die Struktur aus dem *docking*, welche auf der Röntgenstruktur 1Y8G beruht, über die ähnlich aufgelöste aber vollständige und optimierte Struktur 2HAK gelegt. Anschließend erfolgte das Entfernen der nicht aufgelösten Aminosäuren der regulatorischen Schleife. Der Rest der beiden Strukturen erwies sich als deckungsgleich. Daraus folgt, dass die innere Struktur der Kavität bei der Dimerisierung erhalten bleibt. Nach der Übertragung der Substrate in die zweite Kristallstruktur wurden die einzelnen Aminosäuren manuell an dem offenen Aminoende des regulatorischen *loops* ergänzt. Die Winkel im Peptidrückgrat wurden so gewählt, dass die Kette in die korrekte Richtung weiter verlängert werden konnte. Eine wichtige Rolle spielte dabei auch die Ausrichtung der Seitenketten, die so positioniert sein mussten, dass keine Kollisionen mit anderen Atomen in der Nähe erfolgen konnten und eine weitere Verlängerung der Kette möglich war. Im Anschluss an die Positionierung wurden die Strukturen über 15 bis 30 Iterationen minimiert, wobei lediglich die jeweils neue Aminosäure als flexibel definiert war. So wurde sichergestellt, dass sich die neuen Aminosäuren optimal in die Geometrie aus den *docking*-Studien einpassen konnten. Die beschriebene Prozedur wurde für jede der 25 neu zu positionierenden Aminosäuren durchgeführt. Besonders schwierig erwies sich die Verknüpfung von Pro<sup>214</sup> mit dem Tyr<sup>215</sup>, welches die erste nicht manipulierte Position am Ende der regulatorischen Schleife darstellt. Für jedes der drei unterschiedlichen Modelle der Schleife wurden die Aminosäuren Asn<sup>204</sup> bis Pro<sup>214</sup> mehrfach umpositioniert, da das Optimieren nach dem Schließen der Kette in vielen Fällen die Proteinstruktur aufgrund inkompatibler Winkelkombinationen kollabieren ließ.

Abbildung 4.3-11 zeigt die *ribbon*-Struktur der resultierenden Modelle. Abgesehen von den Aminosäuren Lys<sup>190</sup> bis Pro<sup>214</sup> sind die Strukturen deckungsgleich. Im Anschluss an die aktivierende Phosphorylierung an Thr<sup>208</sup> faltet sich die Schleife seitlich aus der Kinase heraus und ermöglicht dadurch, dass Substrate in das katalytische Zentrum gelangen können. Der Mechanismus dieses Faltvorgangs sollte durch den Verlauf der modellierten Strukturen adäquat wiedergegeben werden.



*Abbildung 4.3-10: Darstellung der Struktur der drei Modelle des regulatorischen loops. Von Lys<sup>120</sup> im oberen linken Bereich zieht sich die Schleife in der Form eines spiegelverkehrten „S“ bis zu Pro<sup>214</sup> am Ende der Schleife. Das Öffnen der Kavität könnte durch den Übergang von Modell 2 (blau) über Modell 1 (grün) zu Modell 3 (gelb) beschrieben werden.*

Da die Peptidbindung aufgrund ihres Doppelbindungscharakters planar ist, können im Peptidrückgrat nur 2 Winkel variieren. Abbildung 4.3-11 charakterisiert die Winkel  $\psi$  und  $\phi$ , die beschreiben wie die Ebenen der beiden Peptidbindungen auf C $\alpha$  zueinander stehen. Der Winkel  $\omega$  ist eine Kontrolle, ob zu starke Scherkräfte die Planarität der Peptidbindung beeinträchtigen. Er sollte immer einen Wert von etwa 180° aufweisen. Einen analogen Kontrollzweck erfüllt der Winkel  $\chi$ , der angibt, in welchem Winkel das erste Atom der Seitenkette zur Ebene aus C $\alpha$  und den beiden mit den benachbarten Aminosäuren verknüpften N- bzw. C-Atomen steht. Sein Wert sollte in einem Bereich zwischen 29 und 39° liegen.

Die Tabellen 4.3-8 bis 4.3-10 fassen die Winkel  $\psi$ ,  $\phi$ ,  $\omega$  und  $\chi$  der 25 Aminosäuren und die Gesamtenergien der Kinase mit gedockten Substraten zusammen. Die unterste Energie gibt die vollständige Struktur wieder, jede Zeile weiter oben entspricht einer um eine Aminosäure größeren Lücke in der Sequenz, die im Laufe der Modellierung geschlossen wurde. In den Modellen treten nur sehr wenige geringe Abweichungen von den erlaubten Winkelparametern auf. Das bedeutet, dass die artifiziell in die Struktur implementierten Aminosäuren Konformationen aufweisen, wie sie auch in natürlichen Proteinen zu finden sind.

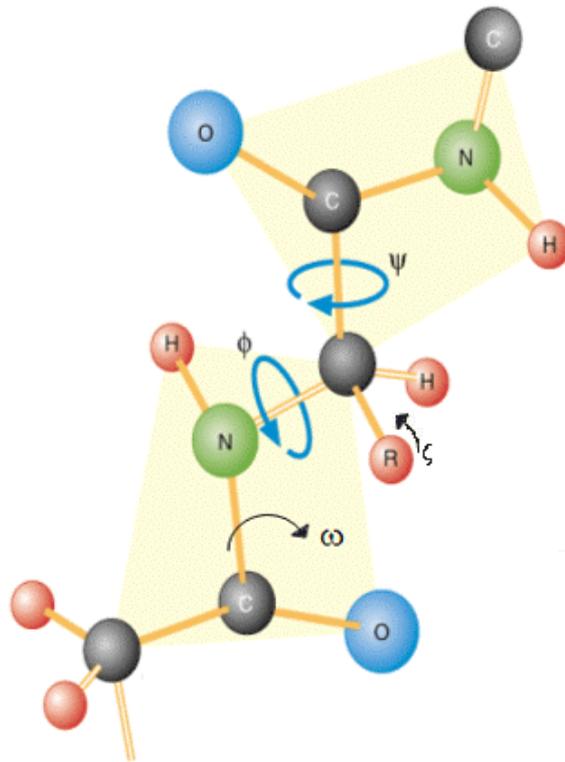


Abbildung 4.3-11: Schematische Erklärung der in den folgenden Tabellen aufgelisteten Winkel.  $\psi$  und  $\phi$  geben die Torsion zwischen zwei benachbarten Amidbindungen wieder.  $\omega$  und  $\chi$  beschreiben die größtenteils konstanten Winkel innerhalb der Amidebene bzw. zwischen  $C\beta$  und der durch  $C\alpha$  und die benachbarten C- und N-terminalen Enden der Aminosäure aufgespannten Ebene.

## Ergebnisse und Diskussion

*Tabelle 4.3-8: Übersicht der Bindungswinkel des Peptidrückgrates und Gesamtenergie des MARK-Modells I (grün in Abbildung 4.3-10).*

Modell 1	Energie [kcal/mol]	$\psi$ [°]	$\phi$ [°]	$\omega$ [°]	$\chi$ [°]
ILE <sup>189</sup>	-277,83	142.28	-64.04	-174.03	33.25
LYS <sup>190</sup>	-283,98	179.08	-163.68	162.50	36.21
ILE <sup>191</sup>	-276,65	4,66	50.14	-179.41	26.86
ALA <sup>192</sup>	-273,35	-114.41	19.78	172.79	27.89
ASP <sup>193</sup>	-276,97	153.64	143.46	-179.24	28.27
PHE <sup>194</sup>	-280,86	131.39	73.87	177.86	27.98
GLY <sup>195</sup>	-282,62	98.72	-109.03	179.65	-
PHE <sup>196</sup>	-286,60	100.54	-132.99	178.82	34.70
SER <sup>197</sup>	-293,18	49.97	-161.40	175.34	33.73
ASN <sup>198</sup>	-296,68	-45.78	-113.04	-171.40	34.00
GLU <sup>199</sup>	-294,25	92.49	-43.39	166.71	31,80
PHE <sup>200</sup>	-290,99	-15.82	-83.62	-171.29	35.08
THR <sup>201</sup>	-290,64	-53.98	-140.90	-170.71	34.70
VAL <sup>202</sup>	-290,92	129.50	-131.74	-164.98	36.55
GLY <sup>203</sup>	-288,16	-168.90	-133.95	-164.37	-
ASN <sup>204</sup>	-274,64	153.79	172.98	-171.14	34.66
LYS <sup>205</sup>	-244,04	72.20	-146.52	168.42	31.81
LEU <sup>206</sup>	-234,34	-124.03	91.08	-173.89	36,01
ASP <sup>207</sup>	-226,56	179.32	-142.85	-165.71	36.33
THR <sup>208</sup>	-222,55	78.78	-93.90	170.22	34.03
PHE <sup>209</sup>	-216,10	-65.49	-139.59	-178.15	30.68
CYS <sup>210</sup>	-219,51	33.35	-120.28	174.75	32.22
GLY <sup>211</sup>	-220,23	-70.39	73.12	-172.37	-
SER <sup>212</sup>	-223,50	141.00	-129.03	-170.63	35.33
PRO <sup>213</sup>	-214,71	161.63	-72.40	167.45	40.85
PRO <sup>214</sup>	-220,90	-32.870	-68.37	171.63	39.13

## Ergebnisse und Diskussion

*Tabelle 4.3-9: Übersicht der Bindungswinkel des Peptidrückgrates und Gesamtenergie des MARK-Modells II (blau in Abbildung 4.3-10).*

Modell 2	Energie [kcal/mol]	$\psi$ [°]	$\phi$ [°]	$\omega$ [°]	$\chi$ [°]
ILE <sup>189</sup>	-277,309	142.06	-63.96	-173.70	33.14
LYS <sup>190</sup>	-283,788	178.46	-163.69	163.13	36.20
ILE <sup>191</sup>	-277,908	1,10	51.04	-179.20	26.73
ALA <sup>192</sup>	-277,344	-116.82	22.64	174.55	28.40
ASP <sup>193</sup>	-281,86	158.73	146.02	179.05	28.12
PHE <sup>194</sup>	-284,821	127.75	73.81	177.65	27.37
GLY <sup>195</sup>	-287,003	93.04	-100.48	-179.52	-
PHE <sup>196</sup>	-292,114	101.39	-138.84	175.03	33.94
SER <sup>197</sup>	-294,268	-156.83	-168.18	156.97	32.13
ASN <sup>198</sup>	-293,28	-150.83	75.54	-172.37	32.89
GLU <sup>199</sup>	-292,34	124.66	-52.40	177.06	34.96
PHE <sup>200</sup>	-291,894	151.56	-34.29	-176.58	36.63
THR <sup>201</sup>	-285,589	-157.70	-155.93	178.76	34.62
VAL <sup>202</sup>	-280,395	158.51	-39.82	175.03	34.86
GLY <sup>203</sup>	-280,524	-165.64	-64.56	169.18	-
ASN <sup>204</sup>	-276,02	167.07	-20.67	-173.17	40.93
LYS <sup>205</sup>	-270,167	170.34	65.77	166.57	32.59
LEU <sup>206</sup>	-258,577	19.46	-148.47	161.27	30.40
ASP <sup>207</sup>	-246,912	24.88	162.69	178.30	27.85
THR <sup>208</sup>	-236,538	-140.24	132.61	167.52	22,70
PHE <sup>209</sup>	-231,181	-11.62	83.59	177.14	21,12
CYS <sup>210</sup>	-228,496	57.94	132.18	-170.76	30.68
GLY <sup>211</sup>	-225,852	61.39	3.00	-179.36	-
SER <sup>212</sup>	-225,023	98.08	129.69	-174.06	33.23
PRO <sup>213</sup>	-221,585	166.97	-68.47	171.04	39.07
PRO <sup>214</sup>	-231,623	-32.32	-68.19	171.50	39.28

## Ergebnisse und Diskussion

*Tabelle 4.3-10: Übersicht der Bindungswinkel des Peptidrückgrates und Gesamtenergie des MARK-Modells III (gelb in Abbildung 4.3-10).*

Modell 3	Energie [kcal/mol]	$\psi$ [°]	$\phi$ [°]	$\omega$ [°]	$\chi$ [°]
ILE <sup>189</sup>	-210,233	142.29	-62.97	-174.85	32.49
LYS <sup>190</sup>	-215,836	179.16	-162.85	162.36	36.22
ILE <sup>191</sup>	-208,589	5,84	49.82	-179.67	27,09
ALA <sup>192</sup>	-203,807	-113.87	18.92	172.52	27.82
ASP <sup>193</sup>	-204,598	149.79	141.45	-175.94	29,12
PHE <sup>194</sup>	-205,863	137.87	83.54	174.04	26.88
GLY <sup>195</sup>	-207,074	91.85	-95.57	-176.00	-
PHE <sup>196</sup>	-210,831	86.91	-142.01	166.62	31.76
SER <sup>197</sup>	-216,109	-178.63	-160.31	163.69	33.14
ASN <sup>198</sup>	-218,608	-160.08	78.55	-172.28	33.09
GLU <sup>199</sup>	-217,156	116.39	-20.02	-179.94	34.23
PHE <sup>200</sup>	-215,91	144.46	-35.98	-173.72	36.53
THR <sup>201</sup>	-214,051	-174.81	-157.47	179.16	34.04
VAL <sup>202</sup>	-204,282	147.25	-27.00	-176.74	28.85
GLY <sup>203</sup>	-203,931	-142.18	-65.83	175.17	-
ASN <sup>204</sup>	-206,729	163.35	-40.53	177.04	42.18
LYS <sup>205</sup>	-204,276	128.94	65.61	-177.05	32.29
LEU <sup>206</sup>	-213,402	13.33	-128.75	153.28	31.69
ASP <sup>207</sup>	-210,637	70.77	162.11	171.85	26.60
THR <sup>208</sup>	-208,321	-167.45	69.11	-177.98	30.15
PHE <sup>209</sup>	-208,309	-46.23	116.03	171.26	27.96
CYS <sup>210</sup>	-207,112	66.73	172.53	179.85	31.27
GLY <sup>211</sup>	-205,617	45.50	16.45	-172.33	-
SER <sup>212</sup>	-208,175	68.70	122.76	-176.78	28.71
PRO <sup>213</sup>	-195,156	165.87	-44.05	-179.22	38.60
PRO <sup>214</sup>	-210,45	-21.48	-72.67	173.92	40.21

Um die Modelle 1 bis 3 in ihrer Qualität beurteilen zu können, wurden Vergleiche mit anderen Strukturen durchgeführt. Neben der Originalstruktur von MARK, deren Modifizierung im vorangegangenen Abschnitt erläutert wurde, wurden die eng verwandte Kinase AURORA (1MQ4) und eine im Januar 2010 veröffentlichte Struktur von MARK (3IEC) zum Vergleich herangezogen.<sup>151, 152</sup> AURORA ist eine in 3 Isoformen in einer Vielzahl von Spezies auftretende Kinase und reguliert unter anderem die Zytokinese und die Segregation von Chromosomen während der Zellteilung.<sup>151</sup>

Die jüngste Struktur von MARK zeigt erstmals, wie ein 14 Aminosäuren langes Peptid aus *Helicobacter pylori* (FPLKRHDKVDDLK, CagA), welches in eine Vielzahl von Regulationsmechanismen involviert ist, in der Nähe der Kavität bindet und wie der regulatorische *loop* im aktiven Zustand positioniert sein könnte.<sup>152-155</sup> Allerdings entspricht der Bindungsmodus des Peptids nicht der für das Substratpeptid in den *docking*-Experimenten erarbeiteten Geometrie.

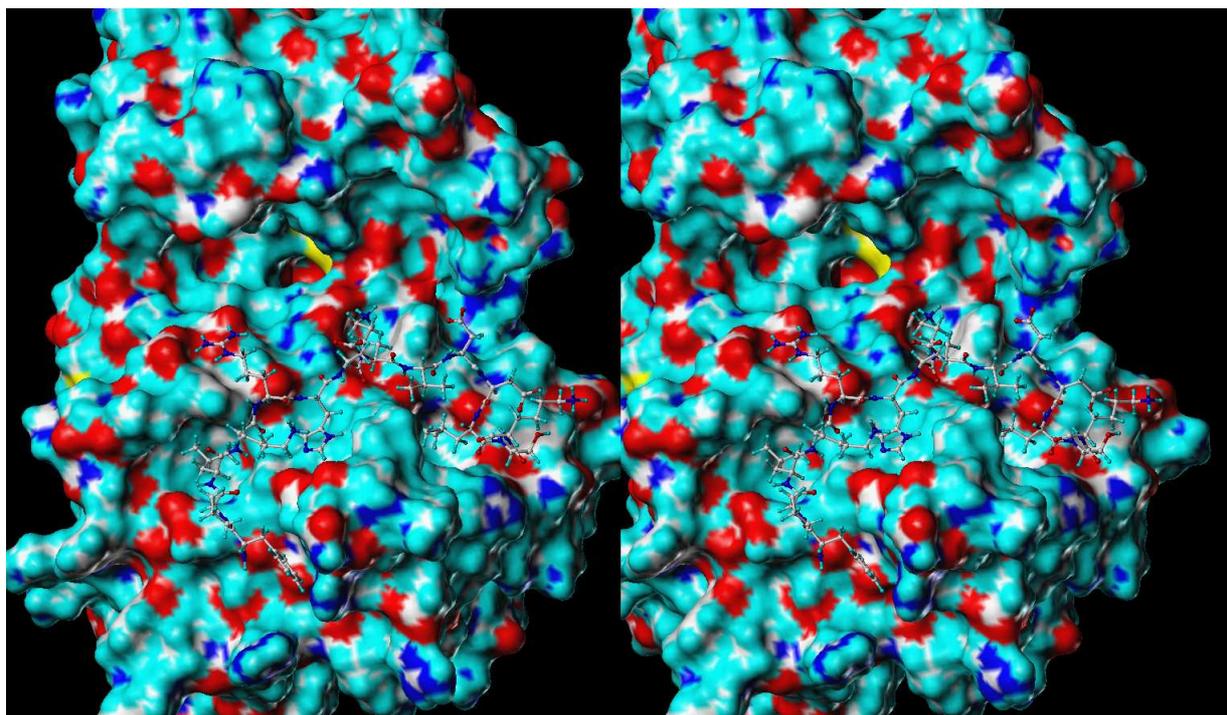


Abbildung 4.3-12: Darstellung von MARK mit gebundenem CagA. Die Perspektive entspricht der aus Abbildung 4.3-4. Das Peptid weist mittig einen Knick von etwa 90° auf und bindet dadurch abseits der Kavität an das Protein. Die Substratbindungstasche scheint dadurch stark verzerrt zu werden (im oberen linken Bereich zu erkennen) wodurch die Bindung des Nukleotids verhindert wird.

## Ergebnisse und Diskussion

Die Sequenz liegt seitlich auf der regulatorischen Schleife auf (rechts aus der Perspektive von Abbildung 4.3-4), die aus dem Protein herausgefaltet ist. Ein Knick von annähernd  $75^\circ$  bewirkt, dass das Peptid dem aktiven Zentrum der Kinase keine Aminosäuren präsentiert. Durch die Bindung von CagA wird die Kavität derart verzerrt, dass das Volumen der *ATP-binding site* nicht mehr für die Nukleotidbindung ausreicht. Eine Vielzahl von Kontakten in kleineren hydrophilen Kavitäten und diverse Wasserstoffbrücken erlauben es CagA, einen starken Einfluss auf die Kinasestruktur auszuüben. Des Weiteren ist unklar, inwiefern die anderen 106 Aminosäuren des inhibitorischen Peptids am Bindungsmodus beteiligt sind, da sie in der Kristallstruktur nicht einheitlich genug vorlagen um aufgelöst zu werden. Es ist nicht zu erwarten, dass das natürliche Substrat die gleiche Konformation annimmt, da die erfolgreiche Phosphorylierung eine den Substraten zugängliche Kavität erfordert. Vermutlich ist CagA dazu in der Lage, das Protein in einer inaktiven Form zu fixieren.

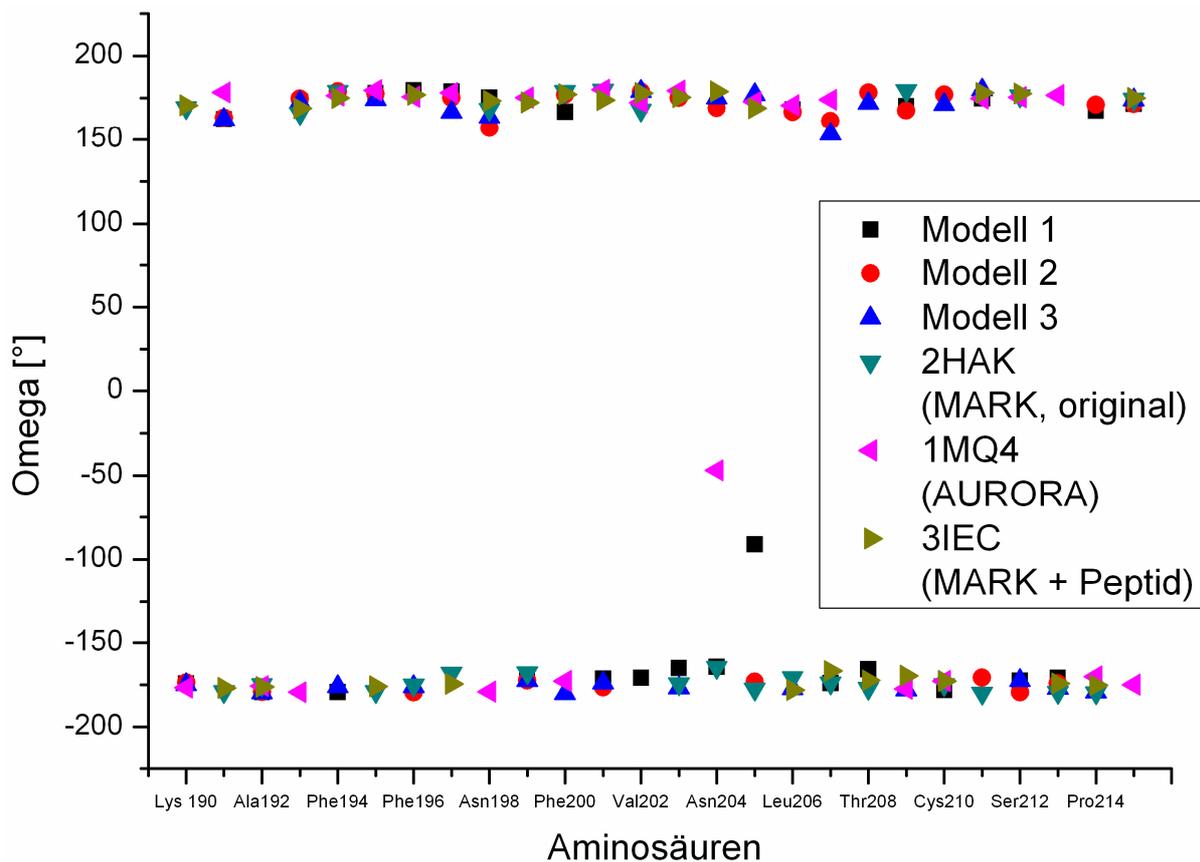


Abbildung 4.3-13: Darstellung aller  $\omega$ -Winkel der miteinander verglichenen Kinasen. Der Wert sollte nur geringfügig von plus bzw. minus  $180^\circ$  abweichen. Es handelt sich hierbei um die modifizierten Modelle und um die native inaktive Struktur, das analoge Protein AURORA und die jüngste ein Peptid beinhaltende Struktur von MARK. In Modell 1 und in der nativen Struktur von AURORA gibt es jeweils eine stark gespannte Amidebene im Bereich des aus dem Protein herausgefalteten regulatorischen loops. Ansonsten liegen alle Werte im erwarteten Bereich.

Abbildung 4.3-13 zeigt sämtliche  $\omega$ -Winkel der erarbeiteten Modelle und der zum Vergleich herangezogenen Strukturen von der nativen inaktiven MARK (2HAK), von AURORA (1MQ4) und von MARK mit kokristallisiertem CagA (3IEC). Abgesehen von zwei Einzelfällen in dem aus der Kinase herausgefalteten Bereich der Schleife entsprechen alle Winkel den erwarteten Parametern. Die Ausnahmen betreffen eines der Modelle und eine Originalstruktur. Der besonders wichtige Bereich im Inneren der Bindungstasche ist davon nicht betroffen.

Ein Vergleich der aminosäureinternen  $\chi$ -Winkel zeigt, dass sich einige Winkel der Modelle außerhalb der Soll-Werte bewegen (siehe Abbildung 4.3-14). Die modellierten Aminosäuren Ala<sup>192</sup> bis Gly<sup>195</sup> am Beginn des loops der linken Seite (siehe Perspektive aus Abbildung 4.3-4) der Bindungstasche, deren Geometrie für das Inhibitor-Design von besonderer Bedeutung ist, weisen einen um circa 5° zu niedrigen Winkel auf. Besonders auffällig ist die Abweichung von Modell 2 bei den Aminosäuren Phe<sup>209</sup> und Cys<sup>210</sup>. Sie zeigen eine deutliche Abweichung von den zulässigen Winkelparametern von 9°.

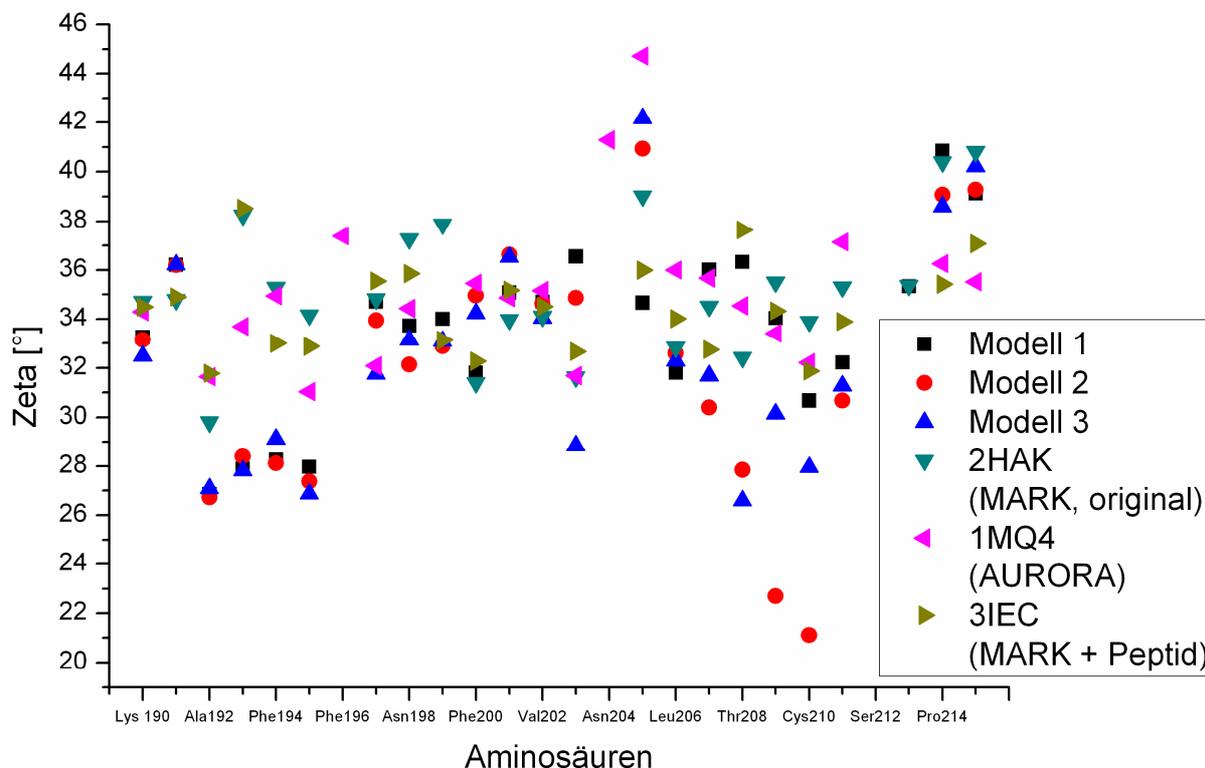


Abbildung 4.3-14: Darstellung aller  $\chi$ -Winkel analog zu Abbildung 4.3-13. Die für die Geometrie der Bindungstasche wichtigen Aminosäuren Ala<sup>192</sup> bis Gly<sup>195</sup> weisen eine Verdrillung gegenüber AURORA und den nativen MARK-Strukturen auf, die zu einer unnatürlichen Spannung in den einzelnen Aminosäuren führt.

## Ergebnisse und Diskussion

Diese Unterschiede deuten darauf hin, dass die Modelle in diesen Bereichen Defizite aufweisen. Für das Inhibitor-Design spielen die Aminosäuren in der Nähe der Kavität eine besonders wichtige Rolle. Hier scheinen sich aufgrund der wenigen Freiheitsgrade leichte Varianzen in der Ausrichtung des *backbones* als Spannung in den Winkeln der Seitenkette zu manifestieren.

Vergleicht man den Verlauf des *backbones* der regulatorischen Schleife von Modell 3 und die Abweichungen von den Sollwerten der einzelnen Winkel (siehe Abbildung 4.3-15), die die Aminosäureseitenketten an einigen Positionen betreffen, ist ein Phänomen, das im Falle von Lys<sup>205</sup> auch die nativen Kristallstrukturen von 2HAK und IMQ4 betrifft. Bei den Aminosäuren im Inneren der Kavität sind diese Spannungen auf geringe Unterschiede im Verlauf des *backbones* zurückzuführen.

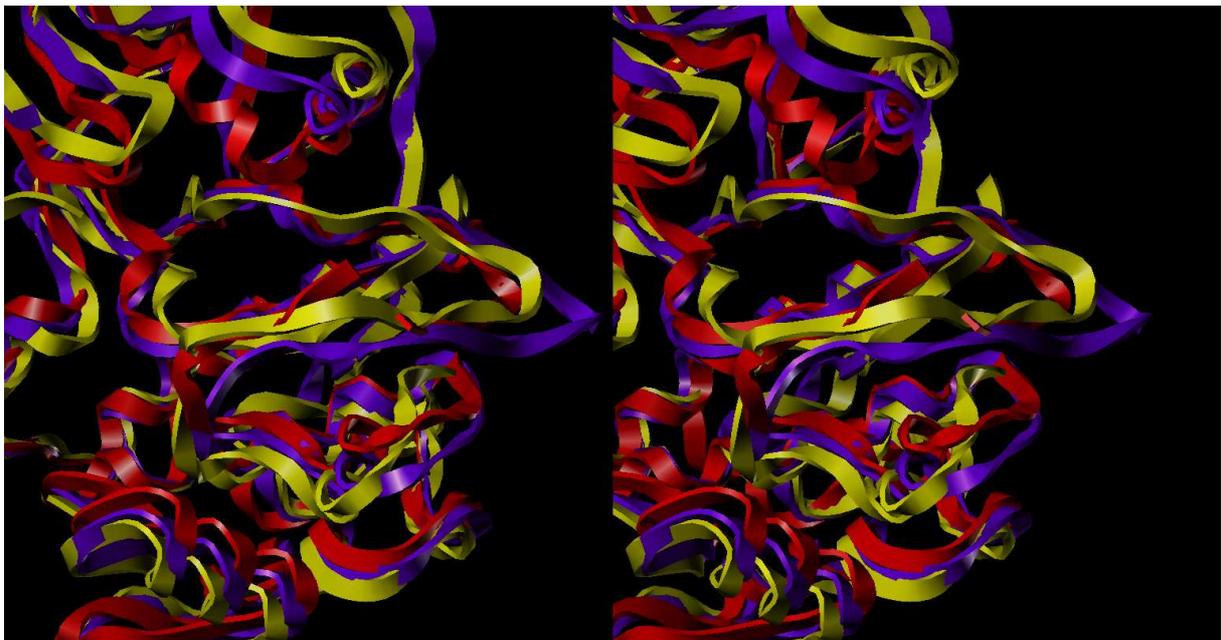


Abbildung 4.3-15: Vergleich von Modell 3 (gelb) mit der Kinase AURORA (rot, IMQ4) und dem Cokristallat aus MARK und CagA aus einem 120er Peptid (lila, 3IEC). Der Verlauf der loops von Modell 3 und AURORA ist bis auf ein paar Verdrillungen nahezu identisch während die Variante mit Peptid etwa 6 Å weiter aus dem Protein herausragt. Dies könnte die Verzerrung der Bindungskavität erklären.

AURORA zeigt sich, dass ihr grundsätzlicher Verlauf sehr ähnlich ist. Allerdings führt eine Verdrillung des *backbones*, die eine andere Ausrichtung der Aminosäureseitenketten zur Folge hat, was die lokale Struktur stark beeinflusst.

Eine eindeutige Interpretation wird zusätzlich durch die Tatsache erschwert, dass AURORA mit gebundenem ADP nicht zwangsläufig die Struktur im Moment der Phosphorylierung widerspiegelt. Es ist ebenfalls möglich, dass die Kinase nach erfolgter Produktbildung durch eine komplexe Bewegung die Substrate aus dem aktiven Zentrum entfernt. Ein wichtiger Hinweis auf diese Tatsache liefert die Positionierung der *ADP-binding site* in der Aurora-Struktur. Die Nucleotidtasche ist vollständig anders positioniert als in MARK, und die Struktur gleicht eher dem durch CagA inhibierten Protein (3IEC).

An der Position, an der das ADP-Molekül in der AURORA-Struktur lokalisiert ist, ist es in MARK nicht möglich, Substrate zu binden. Die dort gebildete kleine Kavität, ist nicht dazu in der Lage, ein Nukleotid aufzunehmen. Auch das bereits erwähnte Glutamat, welches über ein gebundenes Magnesiumion das Triphosphat stabilisiert ist über 18 Å von dieser Position entfernt.

Es besteht die Möglichkeit, dass diese Struktur durch Veränderung während der Dimerisierung von MARK entstanden und die native *binding site* dadurch verschlossen ist. Andererseits ist es auch möglich, dass durch den Kristallisierungsvorgang der relative Abstand der beiden Hemisphären von AURORA abnimmt und dadurch das gebundene ADP aus seiner nativen Bindungstasche verdrängt wird. Eine weitere denkbare Variante ist, dass beide Kinasen trotz ihrer hohen Homologie im Verlauf des Peptidrückgrates aufgrund der unterschiedlichen Ausrichtung ihrer Seitenketten eine unterschiedliche Topologie aufweisen, die unterschiedliche Orte der Substratbindung zur Folge hat. Ebenso könnte ATP nach der Dephosphorylierung zu ADP den Bindungsmodus ändern und durch eine Bewegung der regulatorischen Schleife aus der Bindungstasche heraus dirigiert werden.

Der von den nativen Strukturen abweichende Verlauf des *backbones* könnte ein Artefakt sein, welches aus der Art, wie das Modell entstanden ist, stammt. Die Optimierungen einzelner Aminosäuren in Gegenwart zweier vorhandener Substrate könnte dazu geführt haben, dass im Rahmen der Optimierung lokale Energieminima das Auffinden der optimalen Position verhindert haben.

Im Inneren der Bindungstasche sind alle drei Modelle deckungsgleich, obwohl die 25 Aminosäuren stets neu in das unvollständige Protein eingeführt und optimiert wurden. Daher sind die Ausrichtungen der ersten acht Aminosäuren im Rahmen der Methode als reproduzierbar zu bezeichnen. An der Stelle, an der die Geometrie der Bindungstasche von besonderer Bedeutung ist, direkt unterhalb der Phosphateinheiten des ATPs, sind die Seitenketten der modellierten Aminosäuren aufgrund der leichten Verdrillung des *backbones*

stärker in Richtung Substrat ausgerichtet als in den nativen Strukturen. Dies ist der Grund für die weiter oben erläuterten Abweichungen einiger  $\chi$ -Winkel von der Norm. Außerhalb der Tasche verlaufen die regulatorischen Schleifen aller nativen und artifiziellen Kinase-Varianten deutlich unterschiedlicher, da in diesem Bereich ein wesentlich höherer Grad an Flexibilität vorhanden ist.

Als weitere Vergleichsmöglichkeiten zwischen den betrachteten Kinasen wurden die Energien der sich im Aufbau befindlichen Proteine herangezogen. Abbildung 4.3-16 zeigt, wie sich dieser Parameter im Verlauf der Ergänzung des regulatorischen *loops* entwickelt. Analog zu den modellierten MARK-Versionen wurden die entsprechenden Aminosäuren aus den Vergleichsstrukturen entfernt und die dazugehörigen Energien berechnet. Die Startwerte wurden auf null normiert, um den Verlauf besser vergleichen zu können. Besonders auffällig ist, dass sich hier die artifiziellen von den nativen Varianten deutlich unterscheiden.

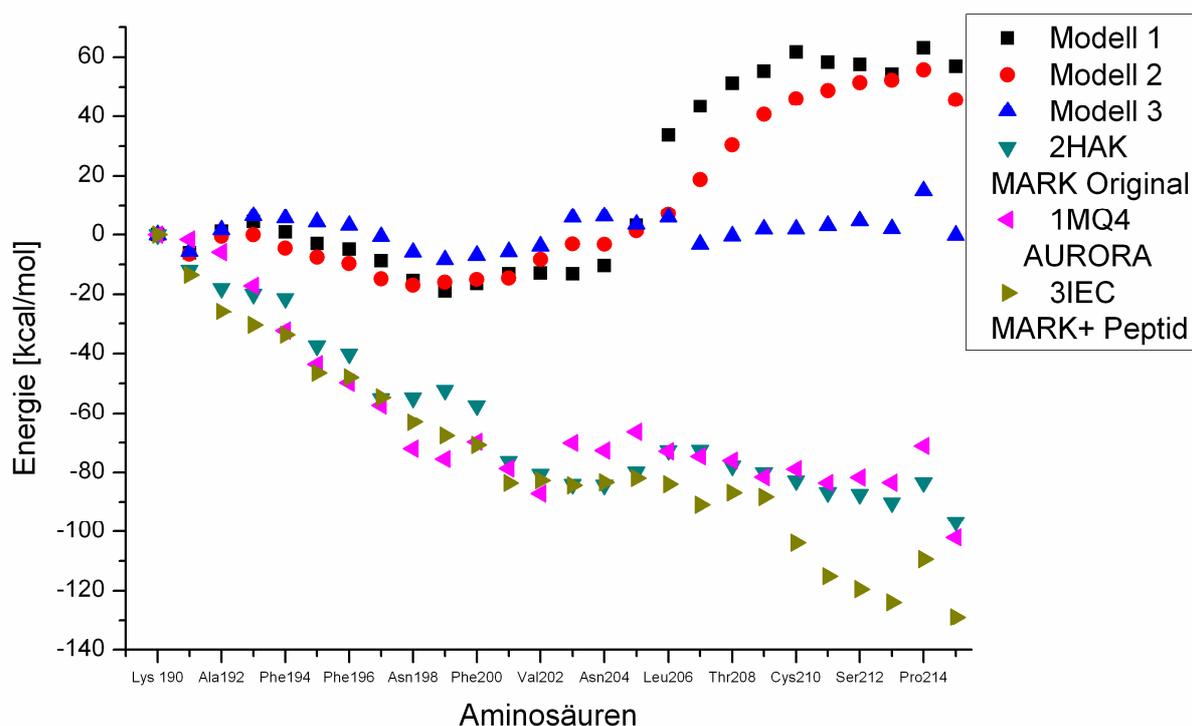


Abbildung 4.3-16: Darstellung der Energien der modellierten Strukturen im Vergleich mit den unmodifizierten Vergleichsproteinen. Der Startwert aller Varianten wurde auf null normiert. Nach jeder der 25 Aminosäuren, beginnend mit Lys<sup>190</sup>, wurde anschließend die Energie berechnet. Für AURORA wurden die geometrisch passenden Aminosäuren gewählt. Deutlich zu erkennen ist der Unterschied zwischen artifizieller und nativer Struktur.

Während zusätzliche Aminosäuren im realen Kristall zu einer stetigen Verbesserung der Gesamtenergie führen, verhalten sich die modellierten Varianten anders, die Energien bleiben mit geringen Schwankungen auf demselben Niveau. Insbesondere die letzten zehn

## Ergebnisse und Diskussion

Aminosäuren in Modell 1 und Modell 2 (Gly<sup>203</sup> bis Pro<sup>214</sup>) im peripheren Bereich des *loops* führen zu seinem starken Anstieg der Gesamtenergie. Dieser Bereich befindet sich nicht mehr in der Nähe der Kavität sondern verläuft praktisch außen am Protein entlang. In dieser Umgebung gibt es nur wenige Aminosäuren des Proteins, deren Wechselwirkungen in die Optimierung der Struktur miteinbezogen werden können. Daher haben die modellierten Aminosäuren der regulatorischen Schleife hier deutlich mehr Freiheitsgrade und es gibt eine wesentlich größere Zahl an lokalen Minima. Für den Verlauf des *backbones* und den der Seitenketten gibt es daher nahezu unendliche Möglichkeiten.

In keinem der drei Modelle ist es gelungen, den energetischen Verlauf der nativen Kristalle nachzubilden. In dem Bereich, der die Aminosäuren innerhalb der Bindungstasche betrifft und somit die Geometrie der *binding site* beschreibt, verhalten sich alle 3 Modelle nahezu identisch. Der energetische Verlauf während des Einfügens der ersten Aminosäuren (Lys<sup>190</sup> – Asn<sup>198</sup>) entspricht von der absteigenden Tendenz her prinzipiell dem der nativen Kristallstrukturen, allerdings mit einem geringeren Energiegewinn pro Aminosäure. Da nicht bekannt ist, inwiefern die nativen Strukturen eine funktionelle Kinase darstellen, lässt sich hier keine eindeutige Aussage über die „Richtigkeit“ der modellierten Varianten machen.

Die Modelle geben eine funktionale Struktur wieder, die es den Substraten ermöglicht, miteinander zu interagieren. Die regulatorische Schleife nimmt in allen drei Varianten eine Konformation ein, die vom Verlauf her der postulierten Struktur (siehe Abbildung 1.7) für die aktive Kinase entspricht.

Eine weitere Möglichkeit, die erstellten Variationen von MARK genauer zu untersuchen, ist die Erstellung eines Ramachandran-Diagramms. Es skizziert die Verteilung der Diederwinkel  $\psi$  und  $\phi$  und korreliert sie miteinander. Sie sind für bestimmte Strukturen charakteristisch und geben Hinweise auf das Vorhandensein von Sekundärstrukturen, da  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt spezifische Geometrien und damit bestimmte Winkel im Peptidrückgrat aufweisen. Eine Helix ist durch  $\psi$ -Winkel zwischen  $-60$  und  $+20^\circ$  in Kombination mit  $\phi$ -Winkeln zwischen  $-140$  und  $-40^\circ$  gekennzeichnet. Ein Faltblatt dagegen ist durch die Kombination von  $\psi$ -Werten im Bereich zwischen  $90$  und  $180^\circ$  gepaart mit  $\phi$ -Werten zwischen  $-45$  und  $-170^\circ$  gekennzeichnet. Aufgrund der fehlenden Seitenkette hat Glycin wesentlich mehr Spielraum beim Einnehmen einer Konformation. Diagramme dieser Art sind ein wichtiges Werkzeug, um die Qualität von Proteinstrukturen zu überprüfen.

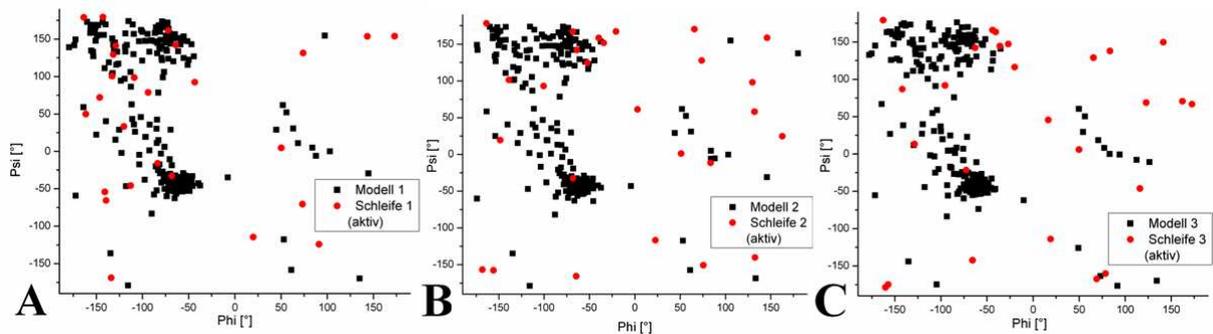


Abbildung 4.3-17: Ramachandran-Diagramm der drei MARK-Varianten mit modifizierter regulatorischer Schleife. Die roten Punkte stellen die manuell eingefügten Aminosäuren dar. A zeigt Modell 1, B Modell 2 und C Modell 3. Relativ viele Aminosäuren zeigen keine charakteristischen Winkelkombinationen für bekannte Sekundärstrukturen. Insbesondere in den Modellen 2 und 3 weisen annähernd 50 % der modellierten Aminosäuren ungewöhnliche Winkelkombinationen auf.

Der Vergleich der entsprechenden Diagramme der modifizierten 1HAK-Varianten (Abb. 4.3-15) mit denen der Vergleichsstrukturen (Abb. 4.3-16) zeigten deutliche Unterschiede in der Verteilung der  $\psi$ - und  $\phi$ -Winkel. Während in den nativen Kristallstrukturen die meisten Aminosäuren des regulatorischen *loops* (rote Punkte, die restlichen Aminosäuren sind als schwarze Quadrate angegeben) typische Winkel für  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt aufweisen und nur wenige Winkel im positiven  $\phi$ -Bereich zu finden sind, ist die Verteilung in den modellierten MARK-Versionen deutlich anders. Die Streuung in der rechten Hälfte des Diagramms, in der eher ungewöhnliche Winkelkombinationen auftreten, ist um Faktor 2 bis 4 größer als in der inaktiv gefalteten Basisstruktur. MARK in der Variante 3IEC, welches ein kokristallisiertes Peptid enthält, weist im Bereich der regulatorischen Schleife Winkelkombinationen auf, die hauptsächlich den Charakteristika von  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt entsprechen. Allerdings wechseln diese Merkmale so häufig, dass es nicht zur Ausbildung der entsprechenden Sekundärstruktur kommt. Die artifiziellen Varianten zeigen hier eine weitaus weniger geordnete Struktur. Betrachtet man die Aminosäuren der regulatorischen Schleifen genauer, so fällt auf, dass die nativen Strukturen sehr viele Aminosäuren in den Bereichen für  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter aufweisen, während die Winkel der modellierten Varianten relativ breit streuen (Abb. 4.3-16 und 4.3-17). Dies gilt insbesondere für den peripheren Teil der Schleife, in dem die einzelnen Aminosäuren nur wenig Kontaktfläche mit dem Protein aufweisen. Dieses Verhalten resultiert aus derselben Tatsache wie der weiter oben beschriebene Verlauf der Energien der unterschiedlichen Kinase-Varianten. In diesem Bereich finden die Optimierungsroutinen aufgrund der vielen Freiheitsgrade in der Regel

lokale Minima, da die geringe Anzahl an Kontakten zum Protein eine nahezu unendliche Menge an Konformationen ermöglicht.

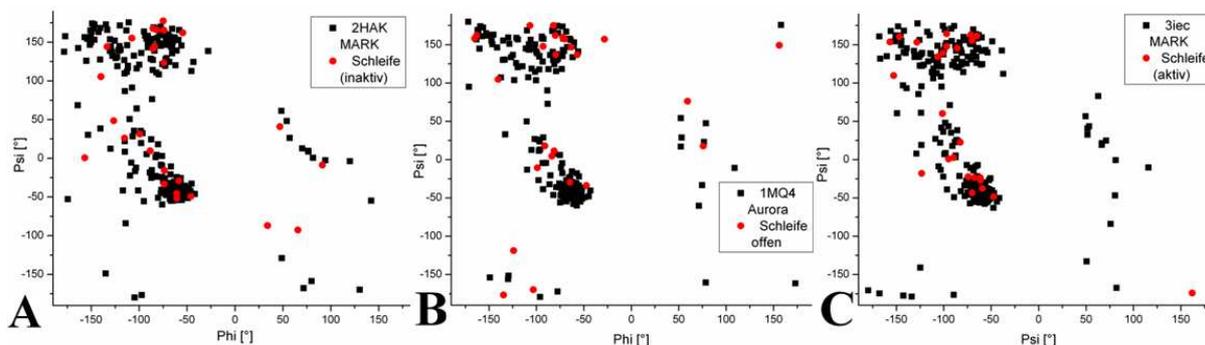


Abbildung 4.3-18: Ramachandran-Diagramm der 3 Vergleichs-Kinasen. Die roten Punkte stellen die Aminosäuren dar, die zum regulatorischen loop gehören. A zeigt die inaktive Originalstruktur von MARK, B AURORA und in C ist das Diagramm für die MARK-Variante mit gebundenem Peptid. Es ist deutlich zu erkennen, dass hier wesentlich mehr Aminosäuren Winkelkombinationen aufweisen, die sich bekannten Sekundärstrukturen zuordnen lassen, als es bei den modellierten Strukturen der Fall ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Modelle, die auf Basis einer inaktiven Kristallstruktur entwickelt worden sind, in vielerlei Hinsicht mit den Vergleichs-Kinasen übereinstimmen. Die aufgrund des kokristallisierten Peptides besonders interessante Röntgenkristallstruktur von MARK (3IEC) ist erst 24 Monate nach Beendigung der *modelling*-Arbeiten veröffentlicht worden und konnte daher nur zu Vergleichszwecken herangezogen werden. Der grundsätzliche Verlauf der regulatorischen Schleife in den Modellen deckt sich mit dem, der auch in einigen Strukturen von zu MARK homologen Kinasen nachgewiesen wurde. Allerdings unterscheiden sich einige der charakteristischen Winkel innerhalb der Schleife zum Teil deutlich von ihren nativen Analoga. Auch weist der energetische Verlauf über den *loop* darauf hin, dass die Modellierung Unzulänglichkeiten aufweist, die sich allerdings in erster Linie in der äußeren Peripherie des Proteins manifestieren und weniger im Inneren der Bindungstasche.

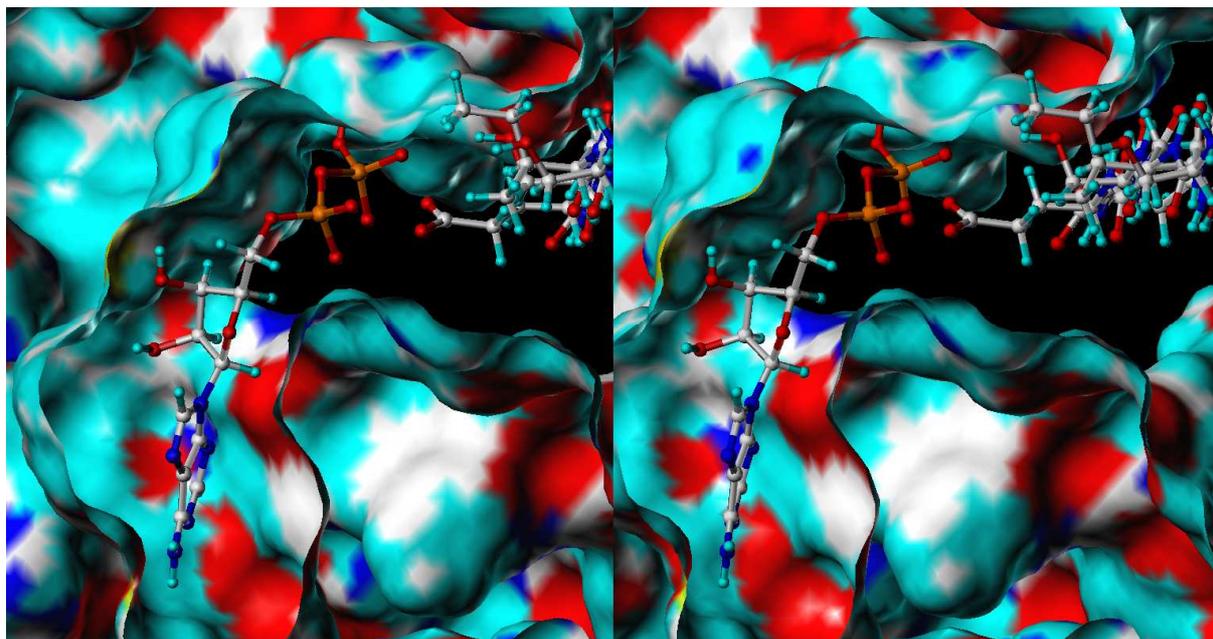
Die Ähnlichkeiten der Protein-Topologie zwischen der MARK-Struktur 3IEC und AURORA sind groß. Dies könnte zum einen bedeuten, dass die Unterschiede zu den modellierten *loops* Ungenauigkeiten im Rahmen der angewandten Methodik widerspiegeln. Andererseits ist es möglich, dass die Modelle dem Übergangszustand, der im Rahmen der Phosphorylierung durchlaufen wird, mehr ähneln, als es die Vergleichsproteine tun. Dies könnte darin begründet sein, dass die betrachtete AURORA-Struktur mit gebundenem ADP und ohne Peptid einen

Zustand wiedergibt, in dem die Kinase unmittelbar nach der Übertragung der Phosphatgruppe durch eine Konformationsänderung die Substrate abstößt. Eine weitere mögliche Erklärung könnte es sein, im Rahmen der Kristallisierung durch einen sehr hohen Überschuss von ADP eine unnatürliche Konformation der Kinase erzeugt wird. Das kokristallisierte Peptid in der Kristallstruktur 3IEC ist ein bakterielles Produkt, welches *Heliobacter pylori* im Rahmen einer langen Evolution hervorgebracht hat. Es ist durchaus denkbar, dass es MARK in einem Zustand nach erfolgtem Umsatz fixiert, um die erneute Substratbindung zu verhindern. Dies würde die große Ähnlichkeit zu AURORA erklären.

Da keine Kristallstruktur der Kinase mit gebundenem ATP und Protein vorliegt, zeigen Vergleiche der artifiziellen Strukturen mit homologen Proteinen oder proteinogen inhibiertem MARK lediglich Abweichungen auf. Es können aber keine stichhaltigen Beweise daraus abgeleitet werden. Die durch *docking* und *modelling* erzeugte Struktur zeigt eine plausible Positionierung für *loop* und Substrate und wurde als strukturelle Basis für das Design eines Inhibitors verwendet.

### 4.3.5 Potentielle Inhibitoren

Beim näheren Betrachten der generierten Geometrie der *binding site* fällt auf, dass sich während des Aufbaus des *loops* die Substrate einander angenähert haben. Im Gegensatz zur ursprünglichen Struktur aus dem *docking* haben sich ATP und Peptid um etwa 0.7 Å einander angenähert. Dies resultiert vermutlich aus der leichten Verdrillung des Peptidrückgrats, den die Modelle im Gegensatz zu den nativen Kristallstrukturen aufweisen, und welche eine leichte Streckung in der Senkrechten zur Folge hat. Da das Protein in Lösung eine flexible Struktur besitzt, sollte sich diese Varianz im Modell nicht nennenswert auswirken.



*Abbildung 4.3-19: Der seitliche Blick zeigt im unteren rechten Bereich den Querschnitt durch die Schleife, die sich unterhalb der Phosphateinheiten und des Peptids senkrecht zur Sichte Ebene bewegt. Das Triphosphat wird durch das Protein fixiert und ermöglicht so dem Protein eine exakt auf den Übergangszustand der Reaktion angepasste Struktur einzunehmen.*

Die Abbildungen 4.3-19 und 4.3-20 zeigen, wie nach dem erstellten Modell das Peptid und ATP in der Kavität zueinander angeordnet sein müssen und auch wie die regulatorische Schleife im aktiven Zustand der Kinase verlaufen könnte. Ausgehend von der Perspektive, die in Abbildung 4.3-4 dargestellt ist, zeigt die erste der beiden Abbildung eine Drehung um 90° nach links. Analog dazu zeigt Abbildung 4.3-20 dieselbe Struktur aus der gegenüberliegenden Richtung.

Die senkrecht zur Betrachtungsebene verlaufende regulatorische Schleife ist unten rechts in Abbildung 4.3-19 als Querschnitt zu erkennen (unten links in Abbildung 4.3.20). Ein direkter Abstand zwischen dem N9 des Adenins und dem Seitenkettensauerstoff von Ser<sup>262</sup> von circa 13 Å und ein Winkel von etwa 110 bis 120° zwischen den Substraten müssen beim Design des Inhibitors berücksichtigt werden. Zusätzlich ist das Volumen des *loops* zu beachten, der eine Gerade als Verknüpfungselement ausschließt. S-(5'-Adenosyl)-L-Homocystein (siehe Abschnitt 4.3.3) würde aufgrund der kurzen Aminosäureseitenkette mit dem *loop* kollidieren und daher keine bindende Wechselwirkung erzeugen können.

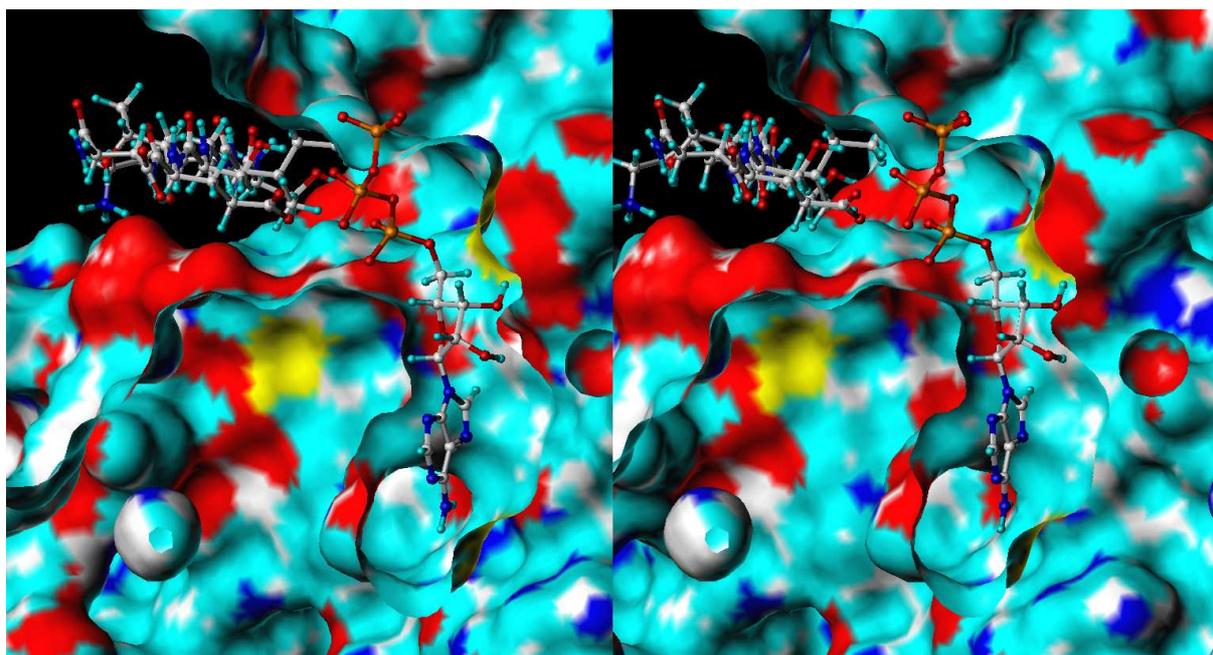


Abbildung 4.3-20: Zu Abbildung 4.3-19 analoge Abbildung mit der Ansicht von der gegenüberliegenden Seite. Der Hohlraum links unterhalb der Bildmitte gibt den Querschnitt der regulatorischen Schleife wieder.

Rationales Wirkstoffdesign beruht auf der Kenntnis der Struktur von Inhibitoren und/oder des dazu gehörenden Proteins, dessen *binding site* dem Negativabdruck der Pharmakophore entspricht. Unter der Annahme, dass ein zu einem Epitop geometrisch und chemisch komplementäres Molekül die Wechselwirkung eines Proteins mit seinem Substrat stören kann, ist es möglich, potenzielle Inhibitoren *in silico* zu designen.

In diesem Fall sind zwar die Substrate und damit zwei Teile eines potenziellen Inhibitors bekannt, aber die Struktur der *binding site* ist aufgrund der Dimerisierung verzerrt. Die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Arbeiten zur Modellierung des aktiven Zentrums von MARK zeigen, welche Strecke und Winkel in der Struktur eines Inhibitors berücksichtigt werden müssen, der als Konjugat aus Peptid, *linker* und Base konzipiert ist.

Zusammen mit dem Wissen um die beteiligten Liganden war es nun möglich, Vorschläge für potenzielle Inhibitoren zu erarbeiten, die sowohl die Peptidsequenz als *target* der Kinase beinhalten als auch mit Adenin einen Teil des Nukleotids. Der potentielle Inhibitor sollte keine Ribose aufweisen, um weniger Angriffsfläche für Abbauvorgänge zu bieten und die Handhabbarkeit der Synthesen zu verbessern. Weiterhin war ein hohes Maß an Flexibilität in das Konstrukt nötig, da die Base in die schmale Nukleotidtasche gelangen muss und dabei kovalent an das Peptid gebunden ist. Als Verknüpfung sollten Amid- oder Etherbindungen

dienen, da diese im Gegensatz zu Estern und anderen Strukturen eine wesentlich höhere Stabilität im lebenden Organismus aufweisen.

In der Planung wurde Serin<sup>212</sup> durch Lysin, Asparaginsäure bzw. Glutaminsäure ersetzt. Der Grund dafür war die längere Seitenkette, die hilft, die Strecke zwischen Base und Peptid zu überbrücken, und die damit verbundene Möglichkeit, Amidbindungen zur Verknüpfung einzusetzen. Diese ist dazu in der Lage mit ihrer mesomeriestabilisierten C-N-Bindung die Konformation des Moleküls stabilisieren. Unter Umständen ist es der Carboxylfunktion an dieser Stelle möglich einen Teil der Funktion der Phosphateinheiten zu mimikrieren, indem es eine Wechselwirkung mit dem an Glu<sup>100</sup> der Kinase koordinierten Magnesiumion eingeht. Die frei drehbaren C-C-Bindungen in der Aminosäureseitenkette und dem *linker* zum Adenin sollten eine ausreichende Flexibilität erlauben, um beide Epitope der Kinase in geeigneter geometrischer Anordnung zu präsentieren.

Aus verschiedenen Vorschlägen, die auf räumliche Komplementarität und synthetische Zugänglichkeit hin untersucht wurden, fiel die Wahl auf die Moleküle **17**, **23**, **27**, **28**, **32** und **33** (siehe Abbildung 4.3-21 und Abschnitt 4.4, Abbildung 4.4-1 bis 4.4-5). Die entsprechenden Synthesearbeiten sind in Abschnitt 4.5 erläutert. Am Ende der Synthese sollte ein Aminosäureanalogon vorliegen, welches sich in der automatisierten Festphasensynthese zum Einbau in Peptide eignet.

Um zu überprüfen, ob die ausgewählten Strukturen die Strecke in der Kavität überbrücken können, wurden die entsprechenden Peptide mit den modifizierten Seitenketten an der Position von Ser<sup>262</sup> in die Struktur aus dem *docking* eingepasst. Anschließend erfolgten eine Energieminimierung und die Bestimmung der Bindungsenergie analog zu dem in Abschnitt 4.3.3 beschriebenen Verfahren.

*Tabelle 4.3-11: Liste der unterschiedlichen Bindungsenergien in Modell 1 von MARK. Die direkten Abstände zwischen C $\alpha$  der theoretisch zu phosphorylierenden Aminosäure und dem N9 des Adenins variieren nach dem Optimieren in der Bindungstasche geringfügig.*

Molekül	Energie [kcal/mol]	Distanz [Å]
<b>6</b>	-44.8	12.3
<b>12</b>	-47.6	13.1
<b>16</b>	-46.2	10.6
<b>17</b>	-44.2	12.3
<b>21</b>	-46.6	12.2
<b>22</b>	-47.7	12.9

## Ergebnisse und Diskussion

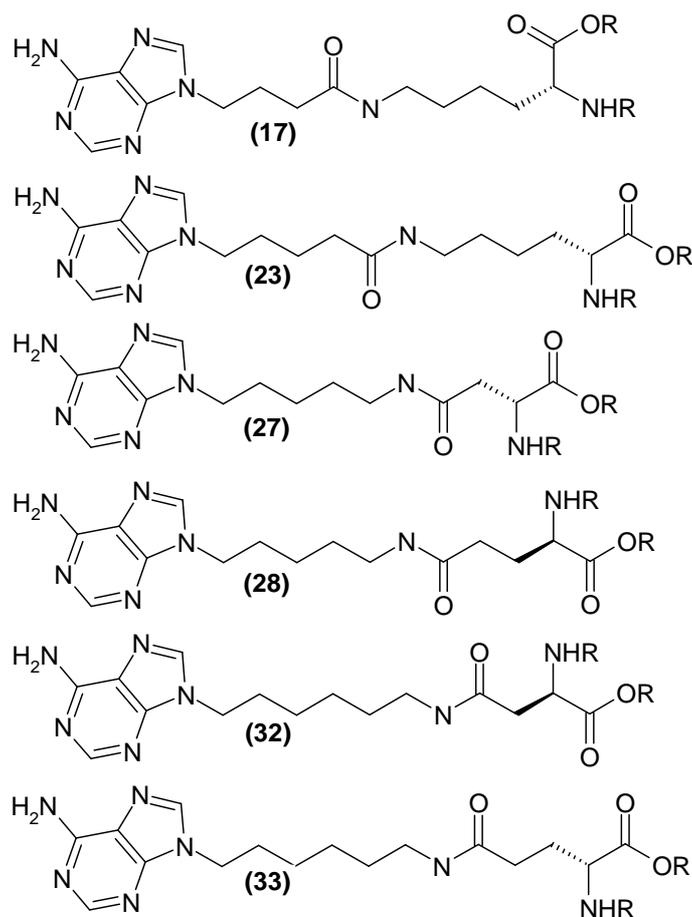


Abbildung 4.3-21: Strukturformeln der unterschiedlichen Aminosäureanaloge, die für die Synthese in Betracht gezogen wurden. Da die im Rahmen der Synthese benötigten Schutzgruppen hier nicht gezeigt sind, ist die Nummerierung lediglich in Klammern angegeben.

Tabelle 4.3.11 gibt die im Rahmen des verwendeten Modells resultierenden Bindungsenergien der sechs unterschiedlichen in die Sequenz SKIGX eingefügten inhibitorischen Aminosäuren an, die Ser<sup>262</sup> in den inhibitorischen Peptiden substituieren (die entsprechenden Strukturen sind in Abbildung 4.3-20 dargestellt). Des Weiteren sind die Abstände zwischen C $\alpha$  der an der Stelle von Ser<sup>262</sup> verwendeten Aminosäure und dem N9 des Adenins aufgelistet um ein Maß für die Strecke zu haben, die durch die modifizierte Seitenkette überbrückt wird. Diese Distanz wurde in der optimierten Struktur gemessen und gibt den direkten Abstand zwischen den Endpunkten wieder ohne die Konformation des *linkers* oder den regulatorischen *loop* zu berücksichtigen.

#### 4.4 Übersicht der synthetisierten Substanzen

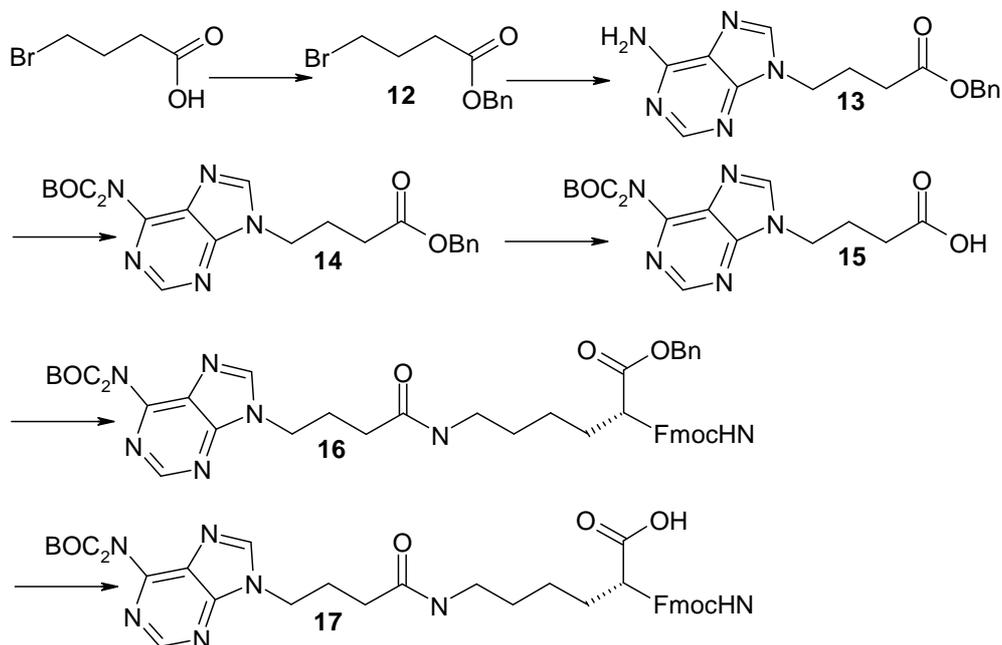


Abbildung 4.4-1: Übersicht der Syntheseroute, die zum ersten inhibitorischen Baustein für die Peptidsynthese nach der Fmoc-Strategie führt. Beim Schritt von **15** nach **16** wird die Carboxylgruppe mit der entschützten Amino-Funktion der Seitenkette von Lysin verknüpft.

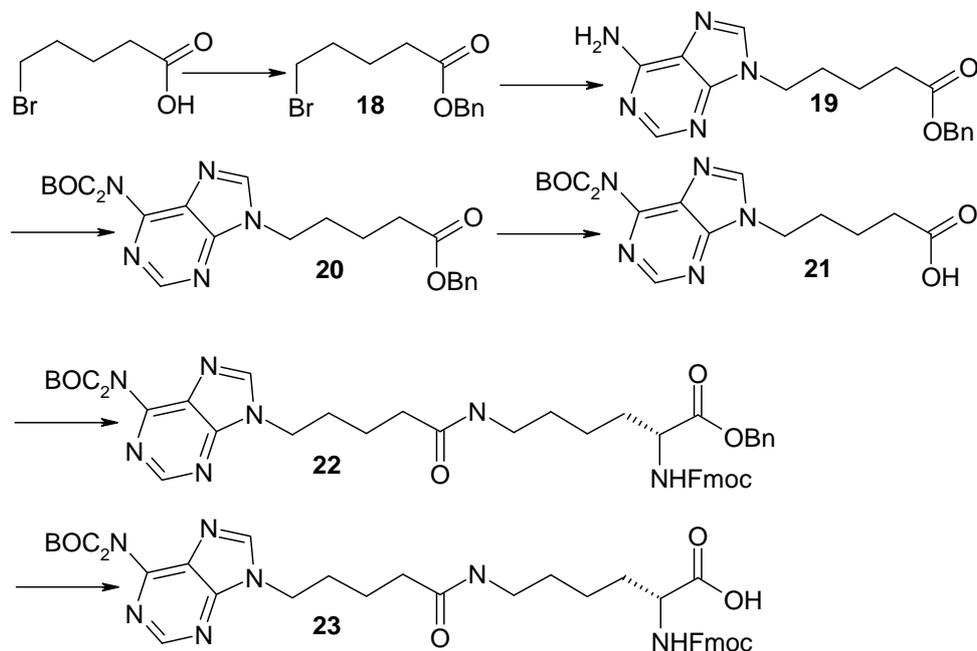


Abbildung 4.4-2: Zu Abbildung 4.4-1 analoge Reaktionsfolge, die eine zusätzliche  $\text{CH}_2$ -Gruppe zwischen N9 des Adenins und der Amidbindung aufweist.

## Ergebnisse und Diskussion

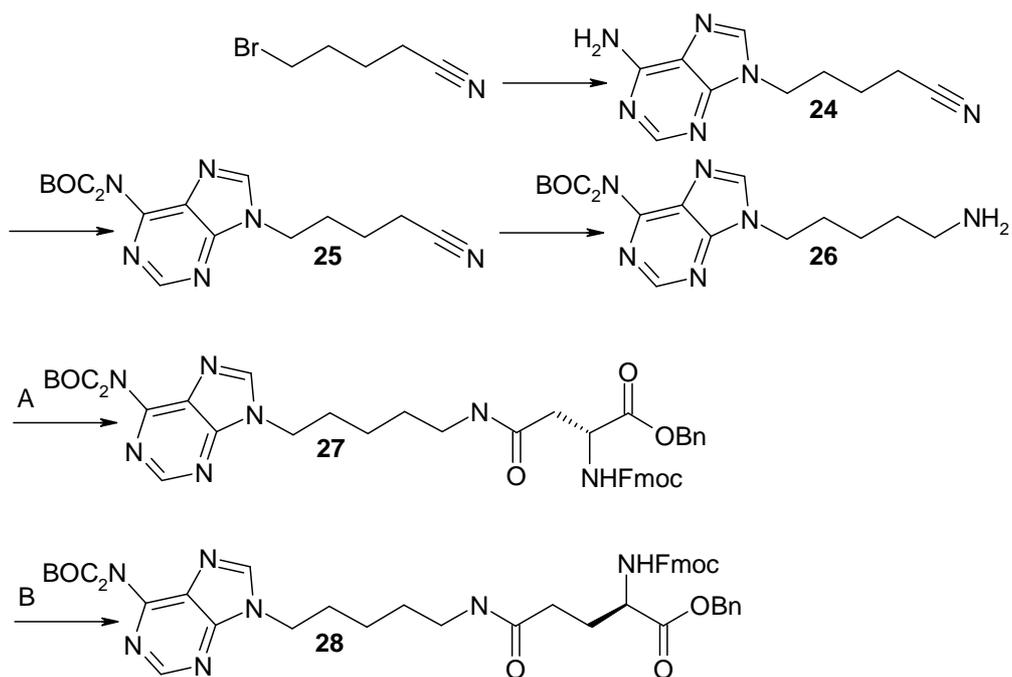


Abbildung 4.4-3: Schema der 2. Verknüpfungsvariante zwischen funktional alkyliertem Adenin und Aminosäure. Im Gegensatz zu der in Abbildung 4.4-1 bzw 4.4-2 gezeigten Variante ist hier die Amidbindung anders orientiert.

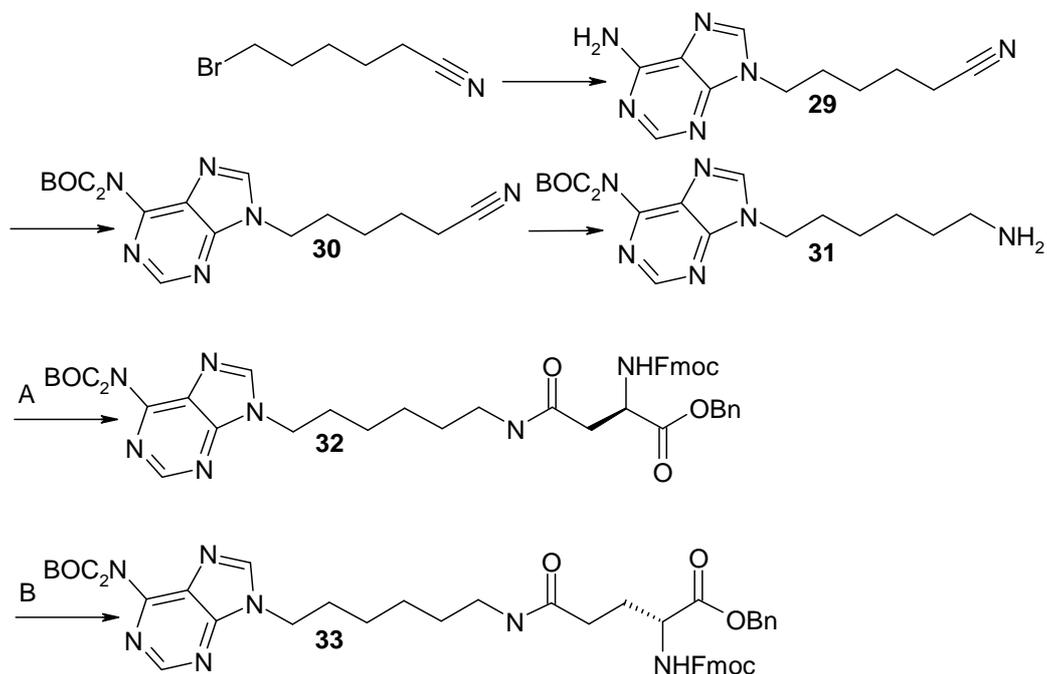


Abbildung 4.4-4: Zu Abbildung 4.4-3 analoge Reaktionsfolge, die eine zusätzliche  $\text{CH}_2$ -Gruppe zwischen der Seitenkette der Aminosäure und Adenin aufweist.

## Ergebnisse und Diskussion

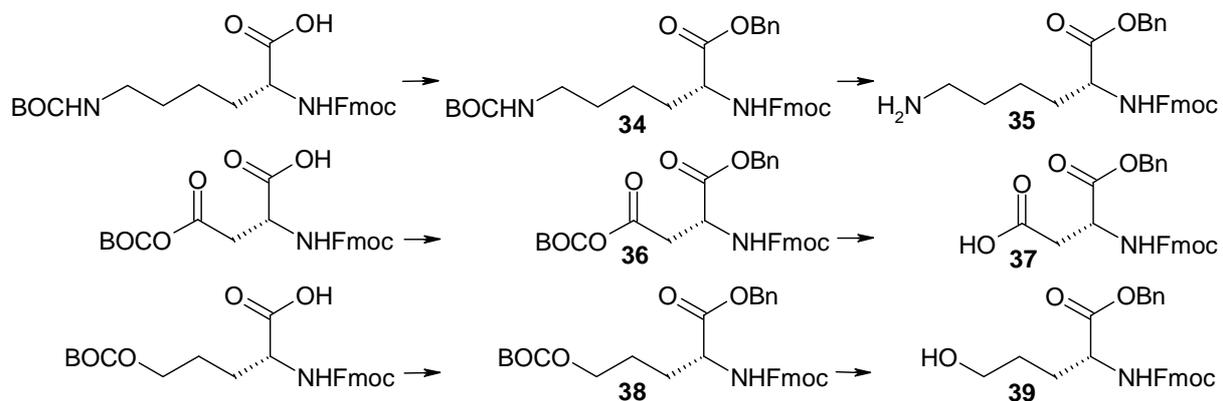


Abbildung 4.4-5: Reaktionsschema, welches die Umschüttung der kommerziell erhältlichen Aminosäuren Lysin, Asparaginsäure und Glutaminsäure zeigt. Im Anschluss an die Benzylierung der Carboxylgruppe wird die Boc-Gruppe der Seitenkette abgespalten.

## 4.5 Synthese der inhibitorischen Bausteine für die Peptidsynthese

Die *molecular modelling*-Arbeiten haben gezeigt, dass die optimierte Röntgenkristallstruktur von MARK als Basis für rationales Inhibitor-Design dienen kann. Trotz der Schwierigkeiten, die durch Dimerisierung und die sehr beweglichen Aminosäuren des regulatorischen *loops* verursacht werden, ist es gelungen, ein funktionales Modell der Kinase zu erstellen.

Die inhibitorischen Bausteine **17**, **23**, **27**, **28**, **32** und **33** passten im Rahmen der artifiziellen Struktur zur ermittelten Geometrie der Bindungstasche, wobei **27** vermutlich zu kurz für eine gute Überbrückung der ermittelten Distanz und Geometrie ist.

Die grundsätzliche Synthesestrategie bestand aus zwei Teilen. Eine Aminosäure (hier: Lysin, Asparaginsäure und Glutaminsäure) wurde C-terminal mit einer Benzylgruppe geschützt, um anschließend die Schutzgruppe an der Amino- bzw. Carboxylgruppe der Seitenkette abzuspalten. Des Weiteren wurde die Base Adenin an N9 alkyliert und an der N6-Aminogruppe mittels Di-*tert*-butyldicarbonat Boc-geschützt. Anschließend wurde die funktionelle Gruppe am Alkylrest freigesetzt und mit der Seitenkette der Aminosäure in einer TBTU-aktivierten Reaktion miteinander zu einer Amidbindung verknüpft.

Die Schutzgruppenstrategie lieferte am Ende der Synthese ein Aminosäureanalogon mit einer orthogonal zur Fmoc-Gruppe Boc-geschützten Aminofunktion am Ende der modifizierten Seitenkette.

Startpunkt der Synthesearbeiten war die Umschützung käuflich erhältlicher Fmoc-Aminosäuren. Lysin (Fmoc-Lys(*t*-Bu)-OH), Asparaginsäure (Fmoc-Asp(*t*-Bu)-OH) und Glutaminsäure (Fmoc-Glu(*t*-Bu)-OH) wurden nach einer Vorschrift von Hamachi *et al.* benzyliert und an der Seitenkette entschützt (siehe Abbildung 4.4-5).<sup>156, 143</sup>

Die Aminosäure wurde hierzu mit zwei Äquivalenten Benzylbromid in Gegenwart von einem Äquivalent Natriumhydrogencarbonat umgesetzt. Letzteres deprotoniert die Carboxylfunktion und ermöglicht so den nukleophilen Angriff auf das durch Brom stark positiviert aliphatische C-Atom des Benzylbromids. Im Anschluss an Reaktion und Aufarbeitung erhält man das Produkt **35** in 83 %iger Ausbeute.

Die nun an allen drei funktionellen Gruppen blockierte Aminosäure wird anschließend in DCM/TFA (6:1) gelöst. Der pH-Wert reicht aus, um die Carbonylfunktion der Boc-Schutzgruppe zu protonieren und anschließend CO<sub>2</sub> und Isobuten freizusetzen, wodurch die Aminogruppe der Seitenkette für die Folgereaktion zur Verfügung steht.

Die anderen beiden Schutzgruppen bleiben unter diesen Bedingungen stabil. Asparaginsäure und Glutaminsäure lassen sich nach demselben Schema in ihre äquivalenten Formen überführen.

Der zweite Teil der Synthese besteht aus der regioselektiven Alkylierung von Adenin und darauf folgenden Schützungs- bzw. Entschützungsreaktionen. 4-Brombutansäure und 5-Brompentansäure mussten vor der Addition an Adenin an der Carboxylfunktion geschützt werden. Dadurch werden Nebenreaktionen an der Carboxylfunktion vermieden. Als relativ inerte Nitrile konnten 4-Bromvaleronitril und 6-Bromhexannitril ohne vorherige Veränderungen verwendet werden.

Die Veresterung wird nach bekanntem Standardschema mit DIC als Aktivatorsubstanz durchgeführt.<sup>157-159</sup> Die Carbonsäure addiert sich an die C-N-Doppelbindung des DIC und bildet so ein *O*-Acylisoharnstoffderivat. Dies führt zu einer starken Erhöhung der Elektrophilie am Carbonyl-Kohlenstoff, was einen Angriff der OH-Gruppe des Benzylalkohols ermöglicht.

Adenin ist aus zwei unterschiedlichen stickstoffhaltigen Ringen zusammengesetzt. Der Pyrimidinring ist aufgrund der Lokalisierung der Elektronen an den Stickstoffatomen ein  $\pi$ -Elektronen-armer Ring. Der fünfgliedrige Imidazolring dagegen verfügt über einfach und doppelt gebundenen Stickstoff, die in einem tautomeren Verhältnis zueinander stehen, und ist insgesamt elektronenreich. Durch die Kondensation der beiden Ringe ist ein Austausch an Elektronendichte möglich. Die Balance der Elektronendichte und damit auch die Reaktivitäten der unterschiedlichen Positionen werden in hohem Maße von den Substituenten der Ringe beeinflusst.

Aufgrund der ähnlichen Reaktivitäten von N7 und N9 erhält man in der Regel Substitutionen an beiden Positionen. Interessanterweise wurde festgestellt, dass DMF als Lösungsmittel die N7-Alkylierung vollständig unterdrückt.<sup>160</sup> Dies ermöglicht einen verhältnismäßig einfachen Zugang zu N9-Alkylderivaten.

Um die gewünschte Alkylierung an N9 zu erhalten, wurde Adenin zunächst äquimolar mit Natriumhydrid bei 100 °C behandelt (siehe Abbildung 4.5-1). Das intermediär gebildete Anion an N9 kann das durch Brom stark positiviertete endständige C-Atom des Esters nukleophil angreifen.

Aufgrund des oben erwähnten Lösungsmittelleffekts erhält man ausschließlich das N9-Addukt mit einer Ausbeute von rund 60 %. Um diese Literaturaussage zu verifizieren, wurde in einem ersten Versuch Adenin mit Ethylchlorid umgesetzt. Die <sup>13</sup>C-Verschiebungen der C-Atome 4

und 5, die zu beiden Ringen gehören (siehe Abbildung 4.5-1, links), unterscheiden sich deutlich. Während die von 2 Stickstoffatomen benachbarten C-Atome im Adenin-Molekül eine Verschiebung von etwas über 150 ppm besitzt, liegt der Wert für C5 bei lediglich etwas über 120 ppm.

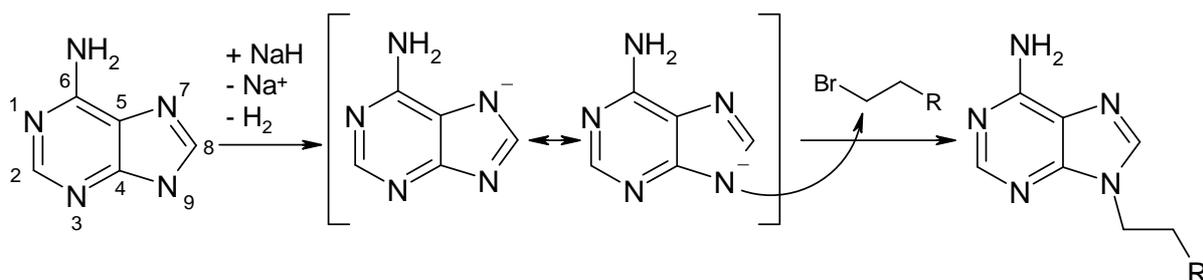


Abbildung 4.5-1: Mechanismus der selektiven Alkylierung von Adenin an N9. Das Hydrid überführt das in der Tautomerie von N7 und N9 gebundene Proton in ein H<sub>2</sub>-Molekül und überführt Adenin in ein Anion. Durch Lösungsmittelleffekte wird das N7-Anion abgeschirmt und man erhält ausschließlich das N9-Addukt.

Die CH<sub>2</sub>-Gruppe, die an N9 gebunden wurde, zeigt im HMBC-Spektrum neben dem Kontakt zur benachbarten Methylgruppe auch zwei charakteristische Kontakte zum Adenin. Die Verbindung zu C8 bei 141.3 ppm wäre für beide Alkylierungspositionen zutreffend. Der Kontakt zu C4 bei 150.2 ppm beweist eindeutig, dass die Ethylgruppe an N9 gebunden vorliegt. Eine N7-Alkylierung hätte ein Kreuzsignal bei 119.8 ppm auf der <sup>13</sup>C-Skala erzeugt (siehe Abbildung 4.5-2). Das N7-Analogon konnte nicht als Nebenprodukt identifiziert werden.

Im Anschluss an die Alkylierung des Adenins mit den entsprechenden Estern erfolgte die Schützung der freien Aminogruppe an der 6-Position von Adenin. Das in katalytischer Menge eingesetzte DMAP aktiviert zunächst Di-*tert*-butyldicarbonat als 4-(Dimethylamino)-1-(butyloxycarbonyl)-pyridiniumsalz, welches am Carbonylkohlenstoff nukleophil durch die Aminogruppe des Adenins angegriffen wird. Nach der anschließenden Protonenwanderung wird DMAP wieder abgespalten. Der Zyklus wiederholt sich aufgrund des verwendeten Überschusses ein zweites Mal, und man erhält letztendlich das an der Aminogruppe zweifach Boc-geschützte Adeninderivat.

Im Anschluss an die Schützung der Aminogruppe erfolgte die Abspaltung der Benzylfunktion am Ende der N9-Alkylgruppe. Bei den Substanzen **16** und **22** wurde die Entfernung der Benzylschutzgruppe durch Rühren unter einer Wasserstoffatmosphäre in Gegenwart von

## Ergebnisse und Diskussion

Palladium als Katalysator erreicht. Die Reaktion wurde beendet, nachdem kein Edukt mehr durch Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden konnte.

Durch Adsorption auf der Platinoberfläche wird der Wasserstoff in der Atmosphäre aktiviert und ist dadurch in der Lage, sich in die O-C-Bindung zwischen Benzyl- und Carboxylgruppe zu insertieren. Durch Filtration und Evaporation lassen sich Palladium/Kohle und das bei der Abspaltung entstehende Toluol leicht abtrennen.

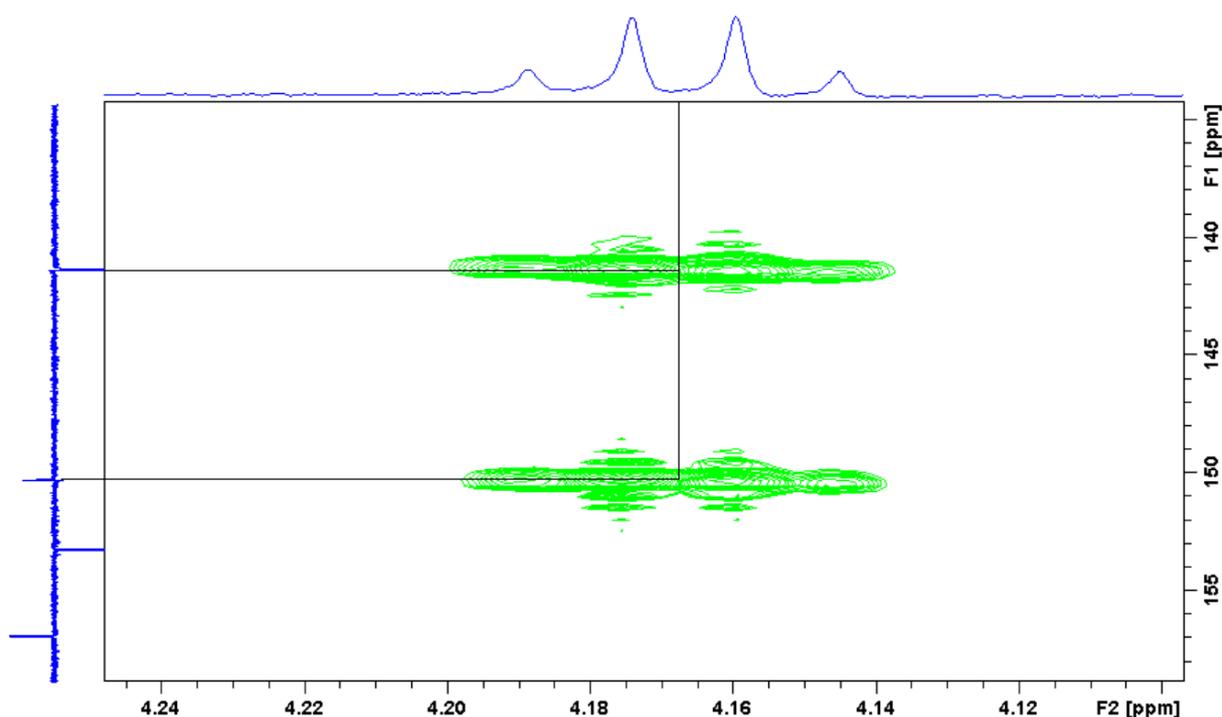


Abbildung 4.5-2: Nachweis der N9-Alkylierung von Adenin. Die Kreuzsignale der Alkyl-CH<sub>2</sub>-Gruppe zu den Kohlenstoffsignalen bei 141.3 (C4) und 150.2 ppm (C8) beweisen eindeutig, dass die Alkylierung zwischen C4 und C8 an N9 stattgefunden hat.

Die Verknüpfung des modifizierten Lysins (**35**) mit freien Carboxylfunktionen der Produkte **15** und **21** wurde analog zu der in Abschnitt 2.1 erläuterten Ausbildung der Peptidbindung im Verlauf der Synthese am Harz durchgeführt (siehe Abbildung 4.5-4). TBTU und DIPEA wurden in 1.2-fachem Überschuss eingesetzt, **35** in 1.5-fachem. Die Verbindungen **16** und **22** konnten mit einer Ausbeute von 60 % isoliert werden. Die anschließende Entschützung der Carboxylgruppe der Aminosäure mit Palladium/Kohle und Wasserstoff erfolgte nahezu quantitativ. Die erhaltenen Substanzen **17** und **23** konnten erfolgreich in der automatisierten Peptidsynthese verwendet werden (siehe Abschnitt 4.6).

## Ergebnisse und Diskussion

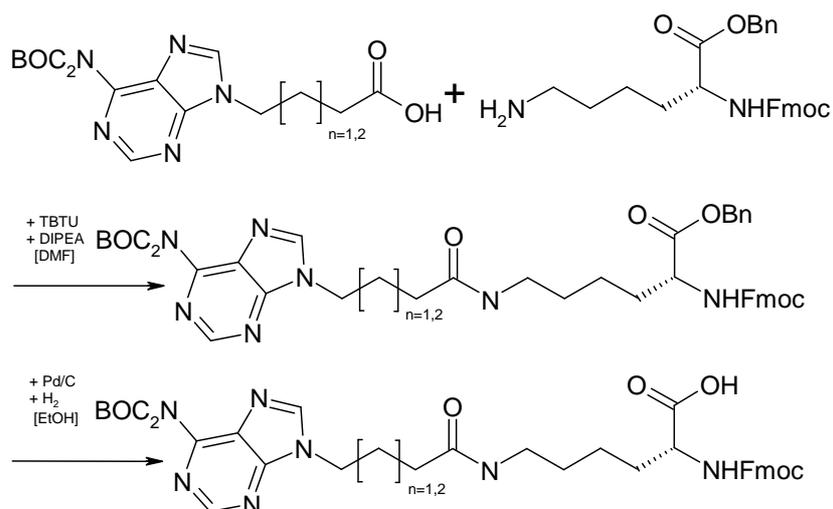


Abbildung 4.5-4: Schema der Umsetzung von **15** und **21** mit **35**. Anschließend erfolgt die Entfernung der Benzylschutzgruppe, und die resultierenden Substanzen **17** und **23** lassen sich in der Festphasensynthese verwenden.

Die Boc-geschützten Adeninderivate mit Nitrilfunktion (**25** und **30**) sollten durch Hydrierung in die entsprechenden Amine überführt werden. Diese Reaktion erwies sich als deutlich schwieriger als gedacht. Mehrere Standardhydrierverfahren wurden getestet.<sup>161-168</sup> Die Kombination aus LiBH<sub>4</sub> und Me<sub>3</sub>SiCl lieferte ebenso wenig das gewünschte Produkt wie LiAlH<sub>4</sub> in Et<sub>2</sub>O und Al und NiCl<sub>2</sub> in THF. Lediglich mit LiBH<sub>4</sub> und NiCl<sub>2</sub> in EtOH konnte das Nitril erfolgreich zum Amin umgesetzt werden. Allerdings waren die Ausbeuten mit 15 % sehr gering und die Aufarbeitung sehr aufwendig.

LiBH<sub>4</sub> erzeugt auf der komplexen amorphen NiCl<sub>2</sub>-Oberfläche aktiven Wasserstoff, der dazu in der Lage ist, das Nitril anzugreifen. Genaue Details über den Ablauf der Reaktion sind nicht bekannt, ebenso wenig, aus welchem Grund die aktiven Spezies der anderen Hydrierungsvarianten nicht zur Produktbildung führen.

Für alle Hydrierversuche wurden je 100 mg des Nitrils mit den den Vorschriften entsprechenden Überschüssen des entsprechenden Hydrierungsmittel umgesetzt. Jeweils 25 mg des Rohproduktes wurden mittels HPLC aufgereinigt und die gesammelten UV-aktiven Fraktionen untersucht. Außer der Hydrierung mit LiBH<sub>4</sub> und NiCl<sub>2</sub> lieferte keines ein Produkt mit der entsprechenden Retentionszeit, Masse und NMR-Spektrum. Nebenprodukte wurden nicht genauer untersucht.

Nachdem die Hydrierung des Nitrils erfolgreich durchgeführt werden konnte, galt es die Amine **26** und **31** analog zu dem in Abbildung 4.4-6 geschilderten Ablauf mit den modifizierten Aminosäuren **37** und **39** umzusetzen.

Die Verbindungen **27**, **28**, **32** und **33** sollten nach der Entfernung der Benzylschutzgruppe entsprechend den auf Lysin basierenden Bausteinen **17** und **23** in der Peptidsynthese verwendet werden. Allerdings scheiterten alle Versuche, die Amine mit den Aminosäurederivaten **37** und **39** umzusetzen. Im Anschluss an die Umsetzung mit TBTU und DIPEA konnte das Nitril annähernd quantitativ zurückgewonnen werden. Vermutlich führt die Aktivierung in der Nähe des C $\alpha$  der Aminosäure zu einer Aspartimidbildung oder einer analogen Umlagerung der Aminosäure. Die in sehr geringem Umfang entstandenen Nebenprodukte stellten nicht das gewünschte Produkt dar und wurden nicht weiter charakterisiert. Auch andere Aktivatoren wie HATU führten nicht zur Produktbildung. Das Amin konnte auch hier nach den entsprechenden Versuchen annähernd quantitativ aus dem Reaktionsgemisch isoliert werden.

Das Umsetzen der geplanten Synthesen war trotz der plausiblen Reaktionsfolgen nicht trivial. Die Alkylierung des Adenins verlief mit 60 % Ausbeute auf demselben Niveau wie die Literatursynthesen mit anderen halogenierten aliphatischen Substanzen.<sup>160</sup>

Die Einführung und Entschützung der Boc- und Benzylgruppen zeigten keinerlei Probleme auf und lieferten die gewünschten Produkte in hohen Ausbeuten. Allerdings kann eine zu große Menge des Palladium/Kohle-Katalysators dazu führen, dass die Fmoc-Gruppe der Aminosäuren angegriffen wird.

Die Verknüpfung der Adeninderivate mit freier Carboxylfunktion mit der Seitenkette von Lysin lieferte Ausbeuten von circa 60 %. Vermutlich verhindern die Sterik der Edukte und die gewählten Überschüsse höhere Ausbeuten. Aufgrund der einfacheren Zugänglichkeit wurde die Aminosäurekomponente im 1.5fachen Überschuss eingesetzt, größere Mengen hätten wiederum zu Problemen bei der Aufreinigung geführt. Letztere erwies sich als besonders schwierig, da sich die verbliebenen Edukte nur über längere Trennstrecken erfolgreich separieren ließen.

Es stellte sich heraus, dass die Hydrierung der Nitrilfunktion ein besonders komplexes Problem ist, da unterschiedliche Methoden zu unterschiedlichen Produkten führten. Dies konnte durch den Vergleich der HPLC-Läufe der einzelnen Reaktionsansätze gezeigt werden. Lediglich die Verwendung von LiBH<sub>4</sub> in Gegenwart von NiCl<sub>2</sub> lieferte das gewünschte Produkt, wenn auch in geringer Ausbeute.

Das weitaus schwerwiegendere Problem dieses Synthesepfades war die Tatsache, dass die an der Carboxylgruppe der Seitenkette aktivierten Aminosäuren sich nicht mit den freien Aminogruppen der Adeninderivate verknüpfen ließen. Vermutlich reagieren die Aminosäuren

## Ergebnisse und Diskussion

nach der Aktivierung in einer sehr schnellen Reaktion intramolekular, bevor die eigentliche Amidbindung gebildet werden kann. Das Adeninderivat konnte annähernd quantitativ aus den Reaktionsansätzen isoliert werden, egal ob TBTU oder HATU als Aktivator verwendet wurde. Damit konnten lediglich zwei statt der geplanten sechs Varianten des *linkers* zwischen Aminosäure und Adenin erfolgreich synthetisiert werden.

Die erhaltenen Mengen beider Moleküle ermöglichten die Synthese einer Vielzahl von Peptiden, die auf unterschiedlichen Zielsequenzen von MARK beruhen und deren Herstellung und Überprüfung in den folgenden Abschnitten erläutert wird.

## 4.6 Übersicht der inhibitorischen Peptide

Mit den Aminosäureanaloga **17** und **23** wurden im Rahmen der Fmoc-Strategie Peptide synthetisiert, deren Eigenschaften mit Biacore und Kinase-Assays untersucht wurden. Die inhibitorischen Peptide **42**, **44**, **54**, **56**, **58**, **60**, **62**, **63**, **65** und **67** enthalten einen circa 11 Å überbrückenden *spacer* zwischen Amidbindung und Adenin N9.

Die anderen Peptide (**43**, **45**, **55**, **57**, **59**, **61**, **64**, **66**, **68**) verfügen über den mit 13 Å Spannweite um eine CH<sub>2</sub>-Gruppe längeren *spacer*. Die zusätzliche CH<sub>2</sub>-Gruppe hat neben der Länge auch Einfluss auf die Position der Base, da sie andere Winkel-Kombinationen zulässt als das kürzere Analogon. Daraus können trotz der großen Homologie durchaus leicht unterschiedliche Bindungsmodi resultieren.

Um die synthetisierten Bausteine auf ihre Eignung für die Synthese am Harz zu überprüfen, wurden vier kurze Peptide synthetisiert und in einem ersten Test auf ihre inhibitorischen Eigenschaften hin überprüft.

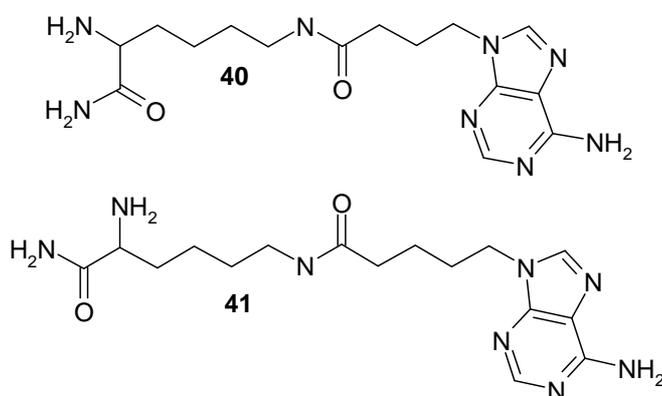


Abbildung 4.1-6: Darstellung der modifizierten Seitenketten der inhibitorischen Peptide. Die unten aufgelisteten Substanzen tragen diese erweiterte Aminosäure an der Position von Ser<sup>262</sup>. Die Peptide **42**, **44**, **54**, **56**, **58**, **60**, **62**, **63**, **65** und **67** verfügen über vier C-Atome zwischen Amidbindung und N9 des Adenin, die Peptide **43**, **45**, **55**, **57**, **59**, **61**, **64**, **66**, **68** über fünf. Neben der Länge variieren dadurch auch die möglichen Kombinationen der unterschiedlichen Bindungswinkel, woraus unterschiedliche Bindungsmodi hervorgehen können.

Tabelle 4.1.-1: Übersicht der inhibitorischen Peptide und der dazugehörigen Referenzsubstanzen. 42 bis 45 stehen für die Testpeptide, die zur Überprüfung der Funktionalität von 17 und 23 synthetisiert wurden. Anschließend sind die unmodifizierten 13 Aminosäuren langen Peptide aufgelistet gefolgt von den dazugehörigen Analoga, die die modifizierten Aminosäuren 17 und 23 an der Position der Phosphorylierungsstelle tragen.

Substanz	Sequenz	Herkunft
42	<sup>258</sup> SKIG- <sup>262</sup> 17	Tau, repeat 1
43	<sup>258</sup> SKIG- <sup>262</sup> 23	Tau, repeat 1
44	<sup>212</sup> YRSP- <sup>216</sup> 17	Cdc25C
45	<sup>212</sup> YRSP- <sup>216</sup> 23	Cdc25C
46	<sup>255</sup> NVSKIGSTENLK <sup>267</sup>	Tau, repeat 1
47	<sup>352</sup> PAMRRSLSVEHLE <sup>364</sup>	PTPH1
48	<sup>209</sup> SGLYRSPMPENL <sup>221</sup>	Cdc25C
49	<sup>385</sup> ARLRRTESVPSDI <sup>397</sup>	KSR1
50	<sup>318</sup> RVQSKIGSLDNIT <sup>330</sup>	Tau, repeat 2
51	<sup>505</sup> LLNKRRGSPILR <sup>517</sup>	Palladin
52	<sup>209</sup> SGLYRSPFPENL <sup>221</sup>	Cdc25C V1
53	<sup>209</sup> SGLYKRSPFPENL <sup>221</sup>	Cdc25C V2
54	<sup>255</sup> NVSKIG-17-TENLK <sup>267</sup>	Tau, repeat 1
55	<sup>255</sup> NVSKIG-23-TENLK <sup>267</sup>	Tau, repeat 1
56	<sup>352</sup> PAMRRSL-17-VEHLE <sup>364</sup>	PTPH1
57	<sup>352</sup> PAMRRSL-23-VEHLE <sup>364</sup>	PTPH1
58	<sup>209</sup> SGLYRSP-17-MPENL <sup>221</sup>	Cdc25C
59	<sup>209</sup> SGLYRSP-23-MPENL <sup>221</sup>	Cdc25C
60	<sup>385</sup> ARLRRTES-17-VPSDI <sup>397</sup>	KSR1
61	<sup>385</sup> ARLRRTES-23-VPSDI <sup>397</sup>	KSR1
62	<sup>318</sup> RVQSKIG-17-LDNIT <sup>330</sup>	Tau, repeat 2
63	<sup>505</sup> LLNKRRG-17-VPILR <sup>517</sup>	Palladin
64	<sup>505</sup> LLNKRRG-23-VPILR <sup>517</sup>	Palladin
65	<sup>209</sup> SGLYRSP-17-FPENL <sup>221</sup>	Cdc25C V1
66	<sup>209</sup> SGLYRSP-23-FPENL <sup>221</sup>	Cdc25C V1
67	<sup>209</sup> SGLYKRP-17-FPENL <sup>221</sup>	Cdc25C V2
68	<sup>209</sup> SGLYKRP-23-FPENL <sup>221</sup>	Cdc25C V2

Aus den *modelling*-Experimenten ging hervor, dass 13 Aminosäuren die komplette Front der Kinase abdecken, wenn der postulierte Bindungsmodus korrekt ist. Da in den ersten SPR-Messungen für alle Peptide recht ähnliche Affinitäten festgestellt wurden, und der Effekt der inhibitorischen Aminosäure nicht vorhergesagt werden konnte, wurden auch die alternativen Zielsequenzen von MARK in die Untersuchungen miteinbezogen. Tabelle 4.1-1 zeigt die Peptide, die in SPR-Experimenten (siehe Abschnitt 4.8) mit ihren modifizierten Varianten verglichen worden sind. Neben den verwendeten Namen sind Sequenz, Position der zu

## Ergebnisse und Diskussion

phosphorylierenden Aminosäure und das Protein, aus dem das jeweilige *target* stammt, aufgeführt.

Zu Beginn wurden die Substanzen **42** bis **45** synthetisiert um die Verwendbarkeit von **17** und **23** in der Festphasensynthese zu überprüfen. Des Weiteren wurden mit diesen Peptiden erste Inhibitionsversuche durchgeführt um einen Einblick in die Wirksamkeit der Substanzen zu erhalten. Nach den erfolgreichen Tests wurden die deutlich längeren Peptide **46** bis **68** synthetisiert und in verschiedenen Assays untersucht.

## 4.7 Synthese der inhibitorischen Peptide

Um zu überprüfen, ob sich die synthetisierten Aminosäureanaloge effizient in der Festphasensynthese einsetzen lassen, wurde eine kleine Zahl kurzer Test-Peptide synthetisiert. Hierfür wurde die Sequenz des ersten Tau-*repeats* gewählt, da die SPR-Experimente hier vielversprechende Daten lieferten. Für die zweite Variante fiel die Wahl auf Cdc25C, da entsprechende Peptide bei *in vitro* Tests gute Bindungseigenschaften gezeigt haben, auch wenn dies im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Die kurzen Sequenzausschnitte SKIG17/23 und YRSP17/23 (**42** und **43** bzw. **44** und **45**) wurden manuell an PAL-PEG-PS-Harz nach dem in Abschnitt 7.3 beschriebenen Verfahren synthetisiert und die Ausbeute anhand der Fmoc-Werte nach jeder einzelnen Aminosäure gemessen.

Die erste Aminosäure war jeweils das modifizierte Lysin in der Form **17** bzw. **23**. Diese ließen sich mit einer durchschnittlichen Ausbeute von 30 % am Harz immobilisieren. Die darauf folgenden vier Aminosäuren verlängerten die Sequenz den gemessenen Fmoc-Werten zufolge nahezu quantitativ. Die große und voluminöse Seitenkette der Bausteine **17** und **23** scheint die eigene Kupplung zu behindern, nicht jedoch die darauf folgende. Die so synthetisierten Peptide wurden in dem beschriebenen radioaktiven Kinaseassay auf ihre inhibitorische Wirkung hin untersucht (siehe Abschnitt 4.8).

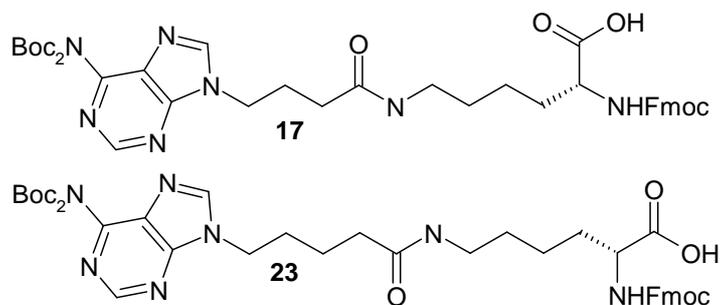


Abbildung 4.7-1: Strukturen der beiden in den Synthesen verwendeten Aminosäureanaloge. Sie unterscheiden sich um eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe zwischen der Amidbindung und der Base.

Interessanterweise konnte für kein auf Cdc25C basierendes Peptid in SPR-Messungen (siehe Abschnitt 4.2.2 und 4.8) eine Affinität zu MARK beobachtet werden. Und dies, obwohl es sich bei Cdc25C nach Literatur um ein *target* von MARK handelt.<sup>46, 141, 147</sup> Für die Peptide **42** und **43**, die auf dem ersten *repeat* von Tau basieren, und die geschützten Synthesebausteine selber konnten Aktivitätsverringernungen von circa 15 % festgestellt werden. Die detaillierte

Diskussion findet sich in Abschnitt 4.8. Dieser inhibitorische Effekt sollte durch die Verwendung von längeren geeigneten Sequenzen steigerbar sein.

Auf diesen Kenntnissen basierend wurde eine umfassendere Synthese von Peptiden geplant, die auf den bekannten Zielsequenzen von MARK beruhen. Jedes Peptid wurde unmodifiziert und je einmal mit **17** und einmal mit **23** an der Position der Phosphorylierungsstelle synthetisiert. Im Rahmen der Planung stellte sich heraus, dass ein weiteres potenzielles *target* von MARK entdeckt worden ist. Die Erkenntnisse gehen auf unveröffentlichte Daten des Arbeitskreises Mandelkow *et al.* zurück, die aus der Analyse einer Vielzahl von Sequenzen auf ihre MARK-Affinität hin stammen. Palladin ist ein Protein aus der Familie der Myotilin-Myopalladin-Palladin-Familie, es dient zur Modulierung des Aktins im Cytoskelett und ist im Rahmen der embryonalen Entwicklung von besonderer Bedeutung. Weitere Details über die Funktionen sind bisher nicht bekannt.<sup>169-171</sup>

Aus dem besagten Test stammen auch zwei weitere Erkenntnisse, die zu den modifizierten Cdc25C-Sequenzen von **52** und **53** führten. Innerhalb dieser Versuchsanordnung zeigte sich, dass der Austausch des Methionins an der +1 Position (von der Phosphorylierungsstelle aus betrachtet) gegen Phenylalanin die Bindung an die Kinase positiv beeinflusst. Vermutlich wird dadurch der für hydrophobe bzw. aromatische Wechselwirkungen verfügbare Bereich in geeigneter Weise vergrößert. Die Substitution von Arginin und Serin an der -3 bzw. -2 Position gegen die stärker positiv geladene Gruppierung Lysin und Arginin führte bei diesen Untersuchungen ebenfalls zu einer deutlichen Verbesserung der Bindungseigenschaften.

Der Austausch von Methionin gegen Phenylalanin wurde in den Peptiden **52** und den entsprechenden Analoga umgesetzt. Beide die Cdc25C-Sequenz betreffenden Erkenntnisse wurden in der Sequenz von **53** vereint.

Für diese Arbeiten stand ein moderner Mikrowellenreaktor der Firma CEM zur Verfügung. Die Kombination aus dem Mikrowellengerät *Discovery* und dem ergänzenden Peptidsyntheseaufsatz *Liberty* ermöglicht einen schnellen und effizienten Aufbau der gewünschten Substanzen an einer festen Phase.

Zuerst wurden die unmodifizierten Peptide **46** bis **53** synthetisiert. Die vor der Abspaltung vom Harz bestimmten Kupplungsausbeuten in Form der Fmoc-Werte und die resultierenden Ausbeuten entsprachen den Erwartungen.

*Tabelle 4.7-1: Kupplungsausbeuten der unmodifizierten Peptidsequenzen. Die Ausbeuten liegen durchgehend im guten bis sehr guten Bereich.*

Substanz	Ausbeute nach Fmoc-Wert
<b>46</b>	76 %
<b>47</b>	85 %
<b>48</b>	100 %
<b>49</b>	100 %
<b>50</b>	98 %
<b>51</b>	98 %
<b>52</b>	100 %
<b>53</b>	96 %

Im Anschluss daran wurden die Sequenzen der potenziell inhibitorischen Peptide mit dem Baustein **23** synthetisiert. Für **46** konnte eine Kupplungs-Ausbeute von 75 % gemessen werden, ein Wert, der annähernd identisch mit dem der unmodifizierten Sequenz ist. Der während der manuellen Kupplung beobachtete Verlust von 70 % der Bindungsstellen während der Immobilisierung der modifizierten Aminosäuren am Harz scheint im Rahmen der Mikrowellensynthese weitaus geringer zu sein.

Allerdings wurde festgestellt, dass die Ausbeuten ab Peptid **59** gegen null tendierten. Als Problem konnte der Umstand identifiziert werden, dass die modifizierten Aminosäuren in DMF nicht stabil sind. Weder während der Synthese der vollständig geschützten Moleküle in DMF noch im Verlauf der Entschützung der Carboxylfunktion in Ethanol traten Hinweise auf Stabilitätsprobleme auf.

Eine Probe **17** wurde in deuteriertem DMF gelöst und einem Stabilitätstest unterzogen. Über einen Zeitraum von 14 Stunden wurde alle 60 Minuten ein  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum gemessen. Die Daten zeigen, dass die Signale der Fmoc-Schutzgruppe mit einer Halbwertszeit von circa 12 Stunden abnehmen. Die entsprechenden Signale verändern sich und erfahren einen *shift* um 0.02 ppm. Abbildung 4.7.1 zeigt den Zerfall anhand der abnehmenden Intensität des Signals des Adenin-Protons H2 (8.877 ppm) im Verlauf der Zeit.

Es ist anzunehmen, dass in dieser Konstellation die Basizität des Adenins ausreicht, um die Abspaltung der Fmoc-Gruppe zu bewirken. Dies führt zu Mehrfachkupplungen, Reaktionen zwischen den zu kuppelnden Aminosäureanaloga und zu einem frühzeitigen Abbruch der Synthese aufgrund von annähernd quantitativem *capping*.

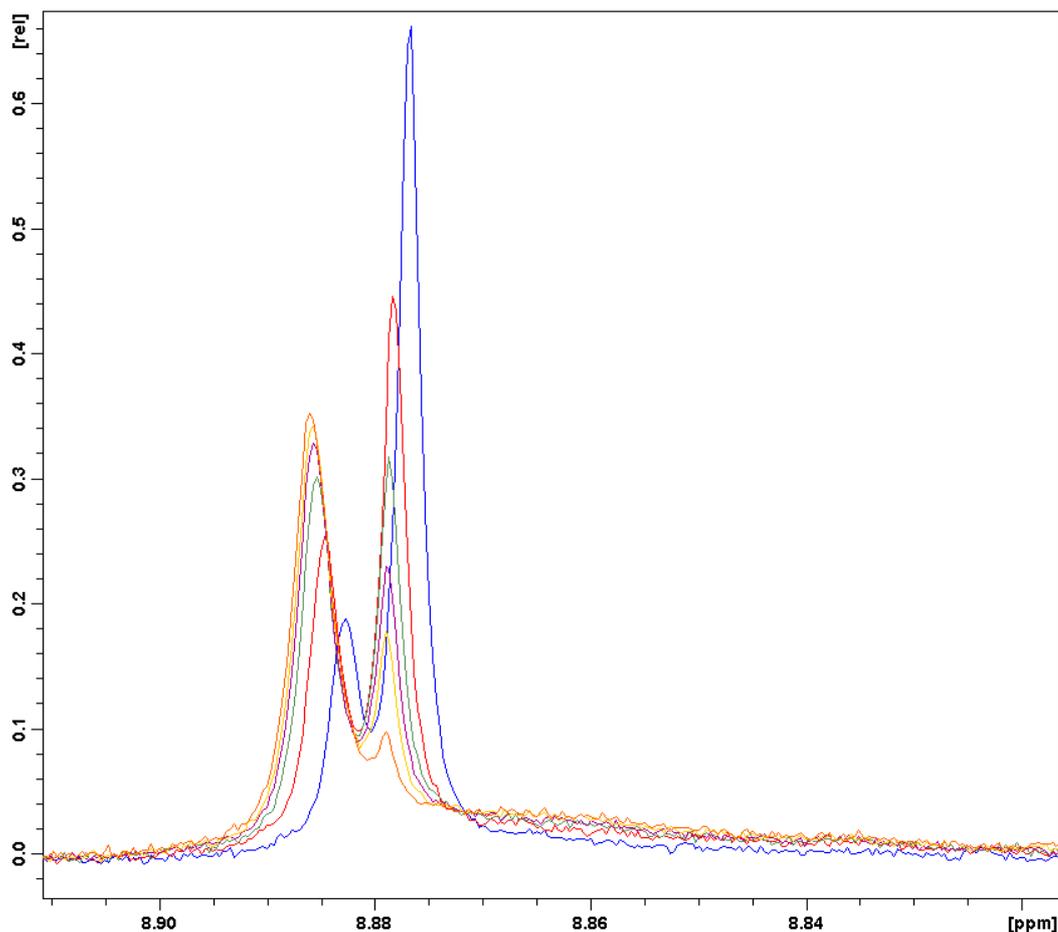


Abbildung 4.7-1: Darstellung des Verfalls von **17** in DMF anhand des <sup>1</sup>H-NMR-Signals der aromatischen Adenin-Protons H2. Zwischen dem Lösen der Substanz und der ersten Messung (blau) vergingen circa 15 Minuten. Die nachfolgenden Signale (rot, grün, lila, gelb orange) wurden in vierstündigen Intervallen gemessen. Der ursprüngliche Synthesebaustein **17** (rechtes blaues Signal) zersetzt sich und die Änderung der elektronischen Gegebenheiten verschiebt das Signal des Adeninprotons.

Der Ablauf der Synthese wurde dahingehend so modifiziert, dass eine entsprechende Menge des Aminosäureanalogons erst unmittelbar vor der Kupplung in DMF gelöst wurde. Dadurch konnte die Zeit minimiert werden, die die labile Substanz vor der Reaktion dem Lösungsmittel ausgesetzt war.

Auf diese Weise konnten alle geplanten Peptide erfolgreich synthetisiert werden. Die Ausbeuten lagen zwischen 42 % und 77 %. Sie liegen damit deutlich unter denen der nativen Sequenzen, lieferten aber ausreichende Mengen der entsprechenden Peptide.

Die Sequenzen der einzelnen Peptide sind in Abschnitt 4.6 dargestellt, ebenso die Strukturen der modifizierten Seitenketten. Aufgrund eines technischen Problems des Syntheseroboters konnte das auf dem vierten *repeat* basierende Peptid mit **23** an der Phosphorylierungsposition nicht als Produkt isoliert werden, und mangels weiterer Mengen von **23** war es nicht möglich,

## Ergebnisse und Diskussion

dieses Peptid erneut zu synthetisieren. Da der Literatur zu entnehmen ist, dass der erste Tau-repeat das primäre *target* von MARK ist, war anzunehmen, dass das Fehlen dieses Peptides unproblematisch ist.

*Tabelle 4.7-2: Kupplungsausbeuten der Peptide, an deren 6. Position das Aminosäureanalogon 17 in die Sequenz integriert wurde. Bei 58 und den darauf folgenden Peptiden wurde 17 erst unmittelbar vor der Kupplung in DMF gelöst und dem Syntheseroboter zur Verfügung gestellt.*

Substanz	Ausbeute nach Fmoc-Wert
<b>54</b>	75 %
<b>56</b>	48 %
<b>58</b>	57 %
<b>60</b>	77 %
<b>62</b>	65 %
<b>63</b>	58 %
<b>65</b>	42 %
<b>67</b>	46 %

*Tabelle 4.7-3: Kupplungsausbeuten der Peptide, an deren 6. Position das Aminosäureanalogon 23 in die Sequenz integriert wurde. Dieses wurde in allen Fällen erst unmittelbar vor der Kupplung in DMF gelöst und dem Syntheseroboter zur Verfügung gestellt.*

Substanz	Ausbeute nach Fmoc-Wert
<b>55</b>	26 %
<b>57</b>	35 %
<b>59</b>	27 %
<b>61</b>	31 %
<b>64</b>	12 %
<b>66</b>	37 %
<b>68</b>	32 %

Auffällig ist, dass die Kupplungsausbeuten im Falle des um eine CH<sub>2</sub>-Gruppe längeren Aminosäureanalogons **23** deutlich schlechter ausfallen als mit der kürzeren Variante **17**. Die Ausbeuten nach dem Fmoc-Wert sind in den Tabellen 4.7-2 und 4.7-3 wiedergegeben und zeigen, dass sich die zusätzliche CH<sub>2</sub>-Gruppe deutlich auf die Kupplungsausbeute auswirkt. Die Peptide wurden über ihre Masse und die zugehörigen NMR-Spektren charakterisiert (siehe Abschnitt 7.3-6 und 7.5).

### 4.8 SPR-Messungen der inhibitorischen Peptide

Für die SPR-Vermessung der hergestellten inhibitorischen Peptide und der zugehörigen Referenzsubstanzen wurde eine neue Charge MARK und ein neuer CM5-Chip verwendet. Vor der Immobilisierung musste das Protein umgepuffert werden, da die hochkonzentrierte Proteinprobe größere Mengen Tris als Puffersubstanz enthielt. Diese konkurriert mit den Aminogruppen der Kinase um die aktivierten Carboxylgruppen auf der Dextranmatrix. Da die Puffersubstanzen gegenüber dem Protein in einem großen Überschuss vorhanden sind, wäre es nicht möglich, eine adäquate Menge an Protein zu immobilisieren ohne den Puffer zu wechseln.

Hierfür wurden 50  $\mu\text{L}$  der Stammlösung (20 mg/mL) zusammen mit 1.8 mL PBS-Puffer in ein Centricon mit der Ausschlussgröße 10 kDa gegeben und zentrifugiert. Nach 30 Minuten bei 2000 Umdrehungen pro Minute und 4 °C wurden die verbliebenen 200  $\mu\text{L}$  wieder auf 2000  $\mu\text{L}$  ergänzt und erneut zentrifugiert. So wurden die ursprünglichen 100  $\mu\text{L}$  Proteinlösung mit 8 mL PBS-Puffer gewaschen und auf 200  $\mu\text{L}$  Gesamtvolumen ergänzt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels eines ND-100 Nanodrop-Gerätes der Firma Peqlab ergab eine Proteinkonzentration von 2.6 mg/mL. Das entspricht einem Verlust von etwa 75 %, der durch Adhäsion an der Membran zu erklären ist. Wie auch in 4.2.2 beschrieben, wurde ein PBS-Puffer angesetzt und steril filtriert um über alle Messungen identische Eigenschaften des flüssigen Mediums zu gewährleisten.

Nach der Aktivierung der Chipoberfläche durch EDC und NHS konnten 2292 RU Protein immobilisiert werden. Allerdings stand zu diesem Zeitpunkt nur die native Variante der Kinase ohne die aktivierende Mutation T208E zur Verfügung, worunter die Vergleichbarkeit zu den älteren Ergebnissen leidet. Die immobilisierte Menge entspricht 2.3 ng bzw. 65 fmol Protein und sollte bei einer Ligandenmolmasse von etwa 1700 eine maximale Antwort von 101 RU liefern. Die zu vermessenden Substanzen wurden in den Konzentrationen 0, 3.9, 5.2, 7.8, 10.4, 15.6, 20.8, 31.2, 42.6, 62.5, 83.3, 125, 166.6, 250 und 500  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Hierzu wurden je 2 ineinandergreifende Konzentrationsreihen von 500 bzw. 166.6  $\mu\text{M}$  abwärts auf 96-well Titerplatten erstellt und gemessen.

Vor jeder Messung wurden 3 *start up cycles* zur Evaluierung der Nulllinie angefertigt. Bei einer Flussrate von 25  $\mu\text{L}/\text{min}$  und einer Temperatur von konstanten 25 °C betrug die Kontaktzeit der zu vermessenden Substanzen 240 Sekunden, die anschließende Dissoziationszeit 160 Sekunden.

Die Regeneration erfolgte mittels 0.1 M NaOH innerhalb von 20 Sekunden bei einer Flussgeschwindigkeit von 25  $\mu\text{L}/\text{min}$  mit einer 20 Sekunden langen Stabilisierungsperiode.

Durch Pufferinjektionen und deren Subtraktion von den Sensogrammen wurden störungsfreie Messkurven erhalten. Das *fitten* der Daten erfolgte nach dem *one-site-binding*-Modell unter Zuhilfenahme der Software Origin 7.5.

Etwa 20 Sekunden nach der Injektion hat das System einen Gleichgewichtszustand (*steady state*) erreicht. Dies ist um Faktor 10 schneller als bei den in Abschnitt 4.2.2 erläuterten Messungen, was durch die geringere Aktivität ohne T208E-Mutation zu erklären ist. Ansonsten entsprechen die Sensogramme vom Verlauf her dem, welches in Abbildung 4.2-1 dargestellt ist. Die Auftragung der  $\text{RU}_{\text{max}}$ -Werte gegen die zugehörigen Konzentrationen der vermessenen Peptide liefert einen Ausschnitt einer Sättigungskurve, aus deren Verlauf nach dem *one-site-binding*-Modell der  $K_D$ -Wert der Interaktion berechnet werden kann.

Um die Konstanz der Aktivität der immobilisierten Kinase zu überprüfen, wurde jede Titerplatte mit 2 kurzen Konzentrationsreihen eines Vergleichs-peptids versehen, die vor Beginn und nach Beendigung der eigentlichen Messreihen getestet wurden. Es konnten während den mehrere Tage dauernden Messungen aller vorhandenen Substanzen keine nennenswerten Aktivitätsverluste beobachtet werden.

Abbildung 4.8-1 zeigt die Ergebnisse für die drei auf der Sequenz des ersten Tau-*repeats* beruhenden Peptide. Der  $K_D$ -Wert von 320  $\mu\text{M}$  der nativen Sequenz stimmt in etwa mit dem gemessenen Wert für das 10 Aminosäuren lange Peptid **8** (140  $\mu\text{M}$ ) überein (siehe Abschnitt 4.2.2). Besonders interessant ist dieser Wert vor dem Hintergrund, dass hier die native weniger aktive Variante von MARK immobilisiert wurde, und somit deutlich schlechtere Affinitäten zu erwarten waren. Dies scheint zu bestätigen, dass die zusätzliche Verlängerung der Peptidsequenz einen deutlichen Effekt auf die Bindung zwischen MARK und dem Liganden bewirkt.

## Ergebnisse und Diskussion

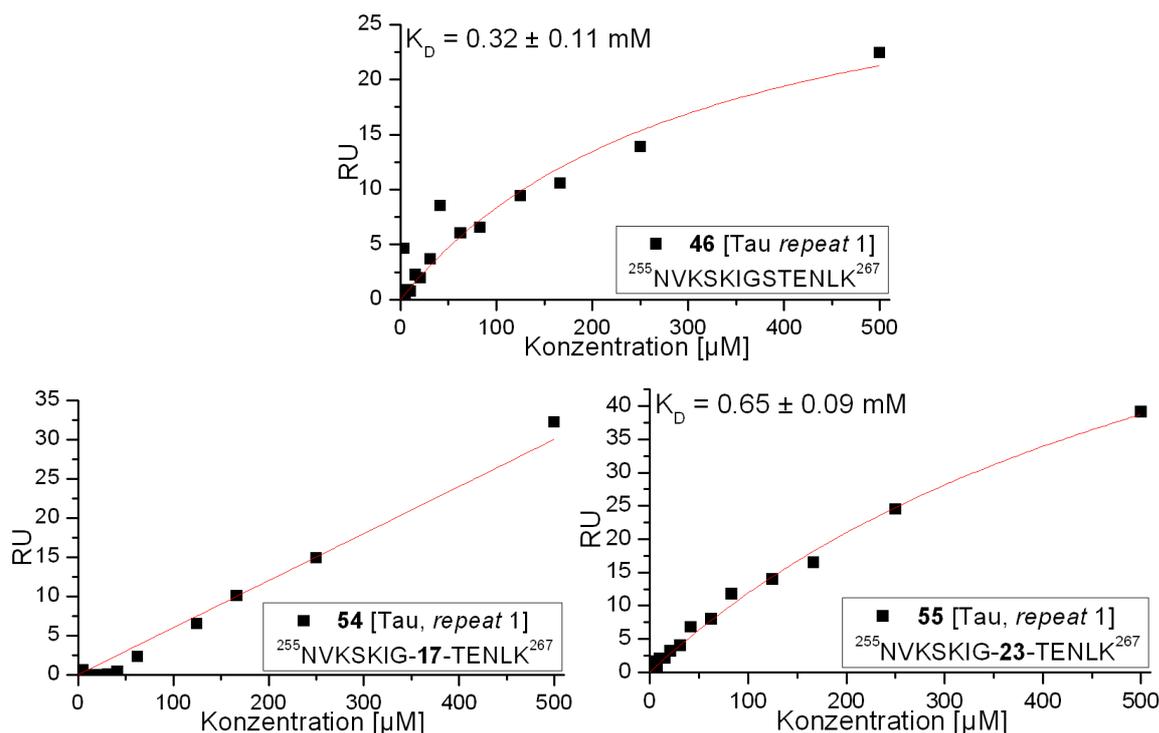


Abbildung 4.8-1: Thermodynamische Analyse der drei auf der Sequenz des ersten repeats beruhenden Peptide (**46**, **54**, **55**; Sequenz: NVKSKIG-S/17/23-TENLK). Zwischen den  $K_D$ -Werten von **46** und **55** liegt ein Faktor von 2, während das um eine  $CH_2$ -Gruppe zwischen Lysin und Adenin verkürzte **54** keine messbare Affinität zeigt.

Deutlich ist hier auch zu erkennen, dass das um eine  $CH_2$ -Gruppe zwischen Lysin und Adenin verkürzte Peptid **54** (*repeat 1*, s.o.) innerhalb des Messbereichs keinerlei Affinität aufweist. Vermutlich nimmt es in Lösung eine Konformation ein, die einen gleichzeitigen Kontakt des Peptides und des Adenins mit ihren entsprechenden Bindungspartnern am Protein nicht zulässt oder sogar die Base abschirmt.

Ein analoges Verhalten konnte auch bei den folgenden 9 Liganden beobachtet werden. Die von PTPH1 (**47**, **56** und **57**), Cdc25C (**48**, **58** und **59**) und KSR1 (**49**, **60** und **61**) abgeleiteten Peptide zeigten innerhalb der Parameter des SPR-Experiments bis auf eine einzige Ausnahme keine nennenswerte Affinität zu MARK. Lediglich für **59** (Cdc25C, **23**) konnte mit einem  $K_D$ -Wert von 1.96 mM eine moderate Bindungsstärke nachgewiesen werden. Die ersten SPR-Messungen zeigten für diese Sequenzen aufgrund der erhöhten Aktivität der T208E-Mutante ähnliche Affinitäten wie **59** (Cdc25C, **23**). Allerdings ist hier die detaillierte Vergleichbarkeit aufgrund der Verwendung der unterschiedlichen Varianten der Kinase nicht gegeben.

## Ergebnisse und Diskussion

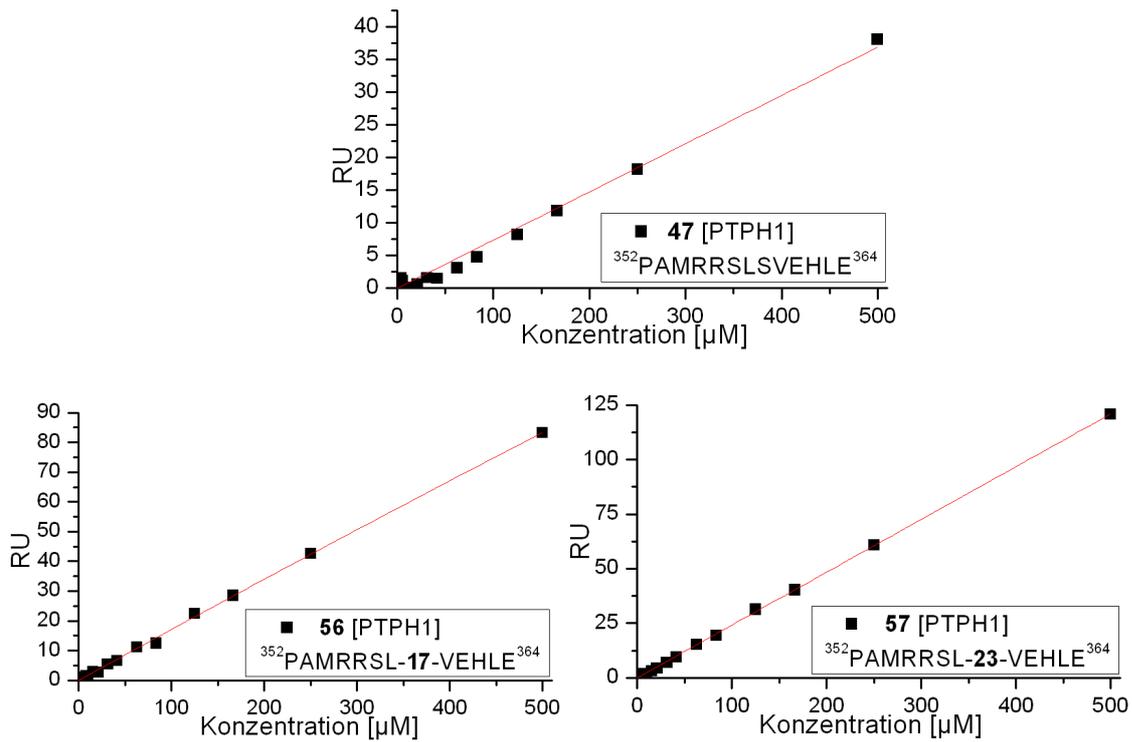


Abbildung 4.8-2: Thermodynamische Analyse der drei auf PTPH1 basierenden Peptide (47, 56, 57; Sequenz: PAMRRSL-S/17/23-VEHLE). Keiner der Liganden weist eine nennenswerte Affinität zu MARK auf.

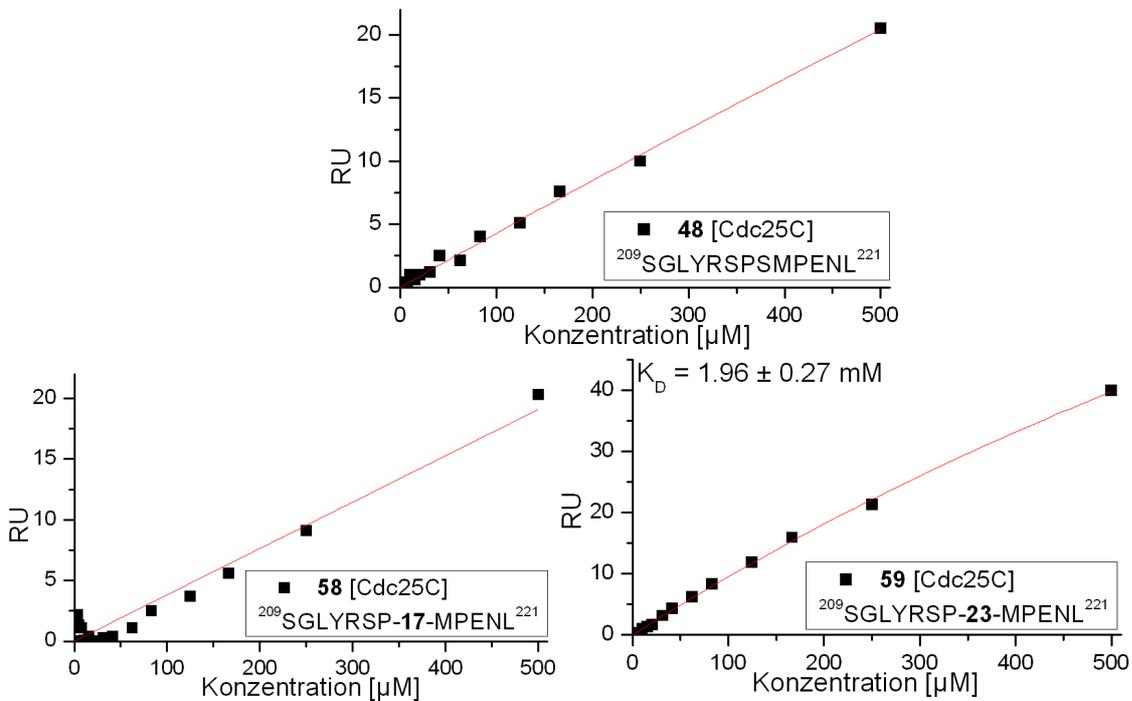


Abbildung 4.8-3: Thermodynamische Analyse der drei auf Cdc25C basierenden Peptide (48, 58, 59; Sequenz: SGLYRSP-S/17/23-MPENL). Lediglich 59 zeigt mit einem  $K_D$ -Wert von 1.96 mM eine geringe Affinität zu MARK.

## Ergebnisse und Diskussion

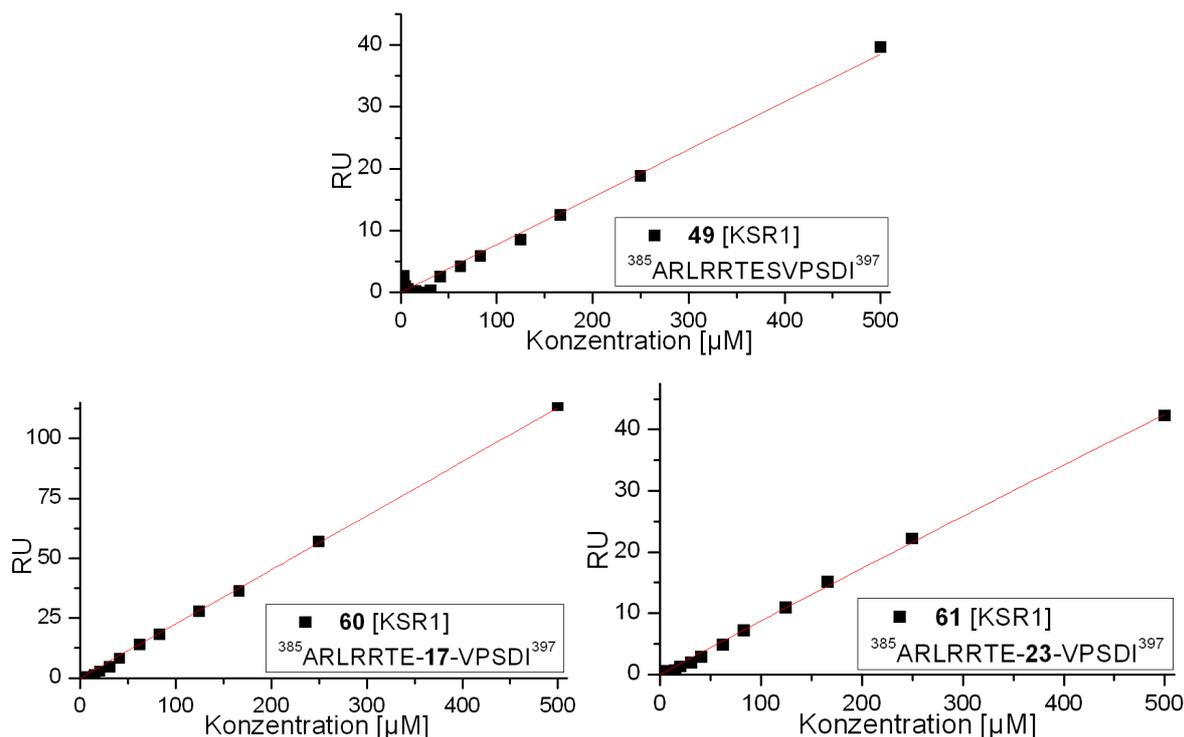


Abbildung 4.8-4: Thermodynamische Analyse der drei auf KSR1 basierenden Peptide (**49**, **60**, **60**; Sequenz: ARLRRTESVPSDI). Keiner der Liganden weist eine nennenswerte Affinität zu MARK auf.

Die ersten SPR-Experimente haben gezeigt, dass der erste *repeat* eine größere Affinität zu MARK aufweist als der vierte. Dies trifft auch auf die nicht modifizierten Peptide **46** (*repeat* 1) und **50** (*repeat* 4) zu. Der ursprüngliche Faktor 3 zwischen den entsprechenden Sequenzen verringert sich beim Test der entsprechenden 13 Aminosäuren langen Peptide zwar auf Faktor 2, dies ist allerdings im Rahmen der Messungenauigkeiten irrelevant.

Durch ein technisches Problem konnte das auf dem vierten *repeat* basierende Peptid mit **23** an der Phosphorylierungsposition nicht synthetisiert werden. Nach der Synthese der weiteren Peptide war keine ausreichende Menge von **23** mehr vorhanden. Und da der erste *repeat* sich als der bessere Binder herausgestellt hatte, wurden die folgenden Synthesen nicht mit weniger Substanz durchgeführt und auf dieses Peptid verzichtet.

Im Verhältnis zu **54** (*repeat* 1, **17**), für das keinerlei Affinität gemessen wurde, bindet **62** (*repeat* 4, **17**) sogar stärker als die native Sequenz **50** (*repeat* 4) an MARK (siehe Abbildung 4.8-5). Anscheinend bewirkt der Wechsel in der Sequenz von *repeat* 1 (NVKSKIGSTENLK) zu *repeat* 2 (RVQSKIGSLDNIT) eine Änderung in der Konformation des Peptides, die zu einer verstärkten Exposition der modifizierten Seitenkette dem Protein gegenüber führt.

## Ergebnisse und Diskussion

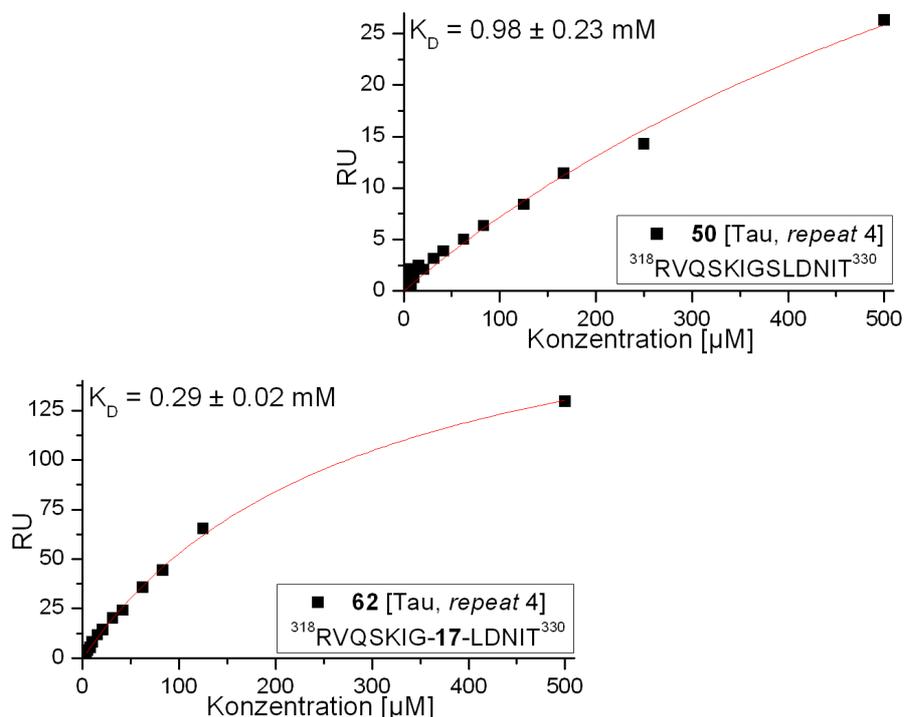


Abbildung 4.8-5: Thermodynamische Analyse der zwei auf dem 4. Tau-repeat basierenden Peptide (**50**, **62**; Sequenz: RVQSIG-S/17/23-LDNIT). Interessanterweise ist hier eine erhöhte Affinität der modifizierten gegenüber der nativen Sequenz zu erkennen. Aus technischen Gründen war das verlängerte Analogon von **62** nicht verfügbar.

Die neueste auf dem Protein Palladin beruhende Zielsequenz von MARK erwies sich in diesen Experimenten als hochaffin (**51**, **63** und **64**). Sowohl für das native Peptid als auch für beide modifizierte Varianten konnten relativ niedrige Bindungskonstanten zwischen 0.23 und 0.38 mM nachgewiesen werden. Die modifizierten Peptide scheinen eine geringfügig stärkere Affinität zum Protein zu besitzen als die native Sequenz. Die beiden modifizierten Aminosäureanaloga **17** und **23** scheinen hier keinen negativen Einfluss auf die Affinität und Struktur der Peptide zu haben. Allerdings entsprechen die gemessenen RU-Antworten dem Fünffachen des berechneten  $\text{RU}_{\text{max}}$ -Wertes von circa 100. Das Phänomen betrifft alle drei Varianten der Sequenz, im Fall von **64** (Palladin, **23**) liegt der Faktor sogar bei einem Wert von acht. Eine Mehrfachbindung der Peptide an die Kinase ist eine mögliche Erklärung hierfür. Dadurch würde die erhöhte Massendifferenz zwischen Mess- und Vergleichszelle deutlich stärkere RU-Unterschiede hervorrufen, was aber auch durch starke *rebinding*-Effekte bewirkt worden sein kann. Auch wenn der Bindungsmodus unter Umständen vom *one-site-binding*-Modell abweicht, scheint die Palladinsequenz ein sehr interessanter Kandidat für einen Inhibitor darzustellen. Durch induzierte Konformationsänderungen oder partielle

## Ergebnisse und Diskussion

Überlappungen mit dem eigentlichen Epitop könnte auch eine Bindung an mehreren unterschiedlichen Stellen an der Kinase einen inhibitorischen Effekt besitzen.

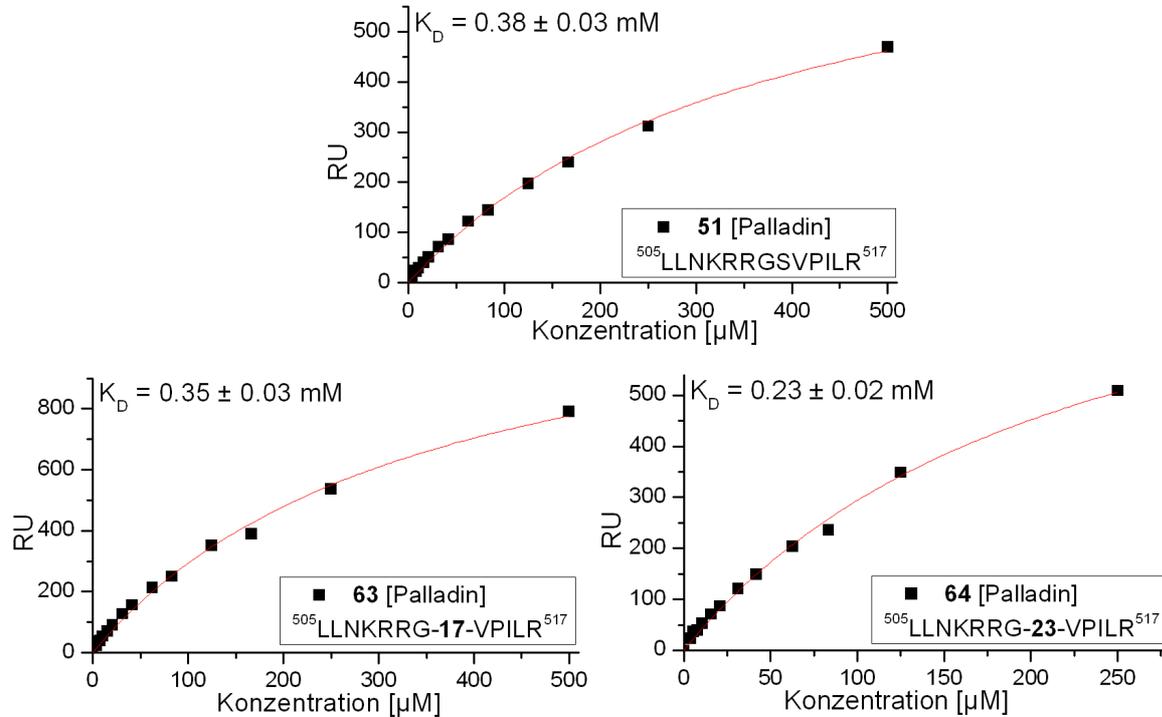


Abbildung 4.8-6: Thermodynamische Analyse der drei auf der Palladin beruhenden Peptide (**51**, **63**, **64**; Sequenz: LLNKRRG-S/17/23-VPILR). Die K<sub>D</sub>-Werte aller Peptide liegen sehr nahe beieinander, ein negativer Effekt durch die modifizierten Aminosäureanaloge konnte hier nicht beobachtet werden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Mandelkow *et al.* konnte für die Cdc25C-Varianten von **52** (Cdc25C V1) keine nennenswerte Affinität nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.8-7). Der Austausch von Methionin gegen Phenylalanin und die damit verbundene Steigerung der unpolaren Fläche bewirkt im Rahmen dieses Experiments keine Steigerung der Bindungsaktivität. Dieses Verhalten wurde sowohl bei den nativen als auch bei den mit **17** und **23** modifizierten Varianten beobachtet.

Die Variante **68** (Cdc25C V2, **23**) konnte nur in sehr schlechten Ausbeuten synthetisiert werden, daher stand nur eine geringe Menge für das entsprechende SPR-Experiment zur Verfügung. Der *fit* der wenigen sehr geringen Konzentrationen ergibt einen sehr guten K<sub>D</sub>-Wert von 45 µM, der nicht gut in das Gesamtbild der vermessenen Substanzen passt. Der Wert ist allerdings aufgrund der geringen Zahl der Datenpunkte nicht genauso gesichert wie die entsprechenden Konzentrationsreihen der anderen Substanzen.

## Ergebnisse und Diskussion

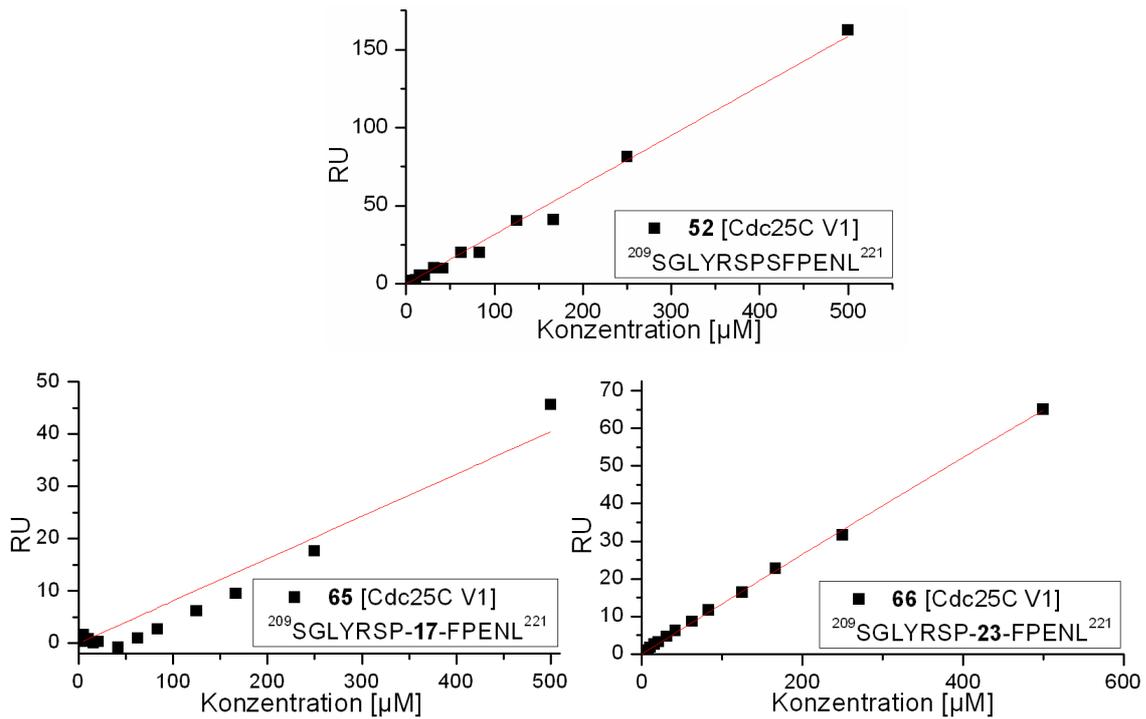


Abbildung 4.8-7: Thermodynamische Analyse der drei auf der ersten Cdc25C-Variante basierenden Peptide (52, 65, 66; Sequenz: SGLYRSP-S/17/23-FPENL). Keiner der Liganden weist eine nennenswerte Affinität zu MARK auf.

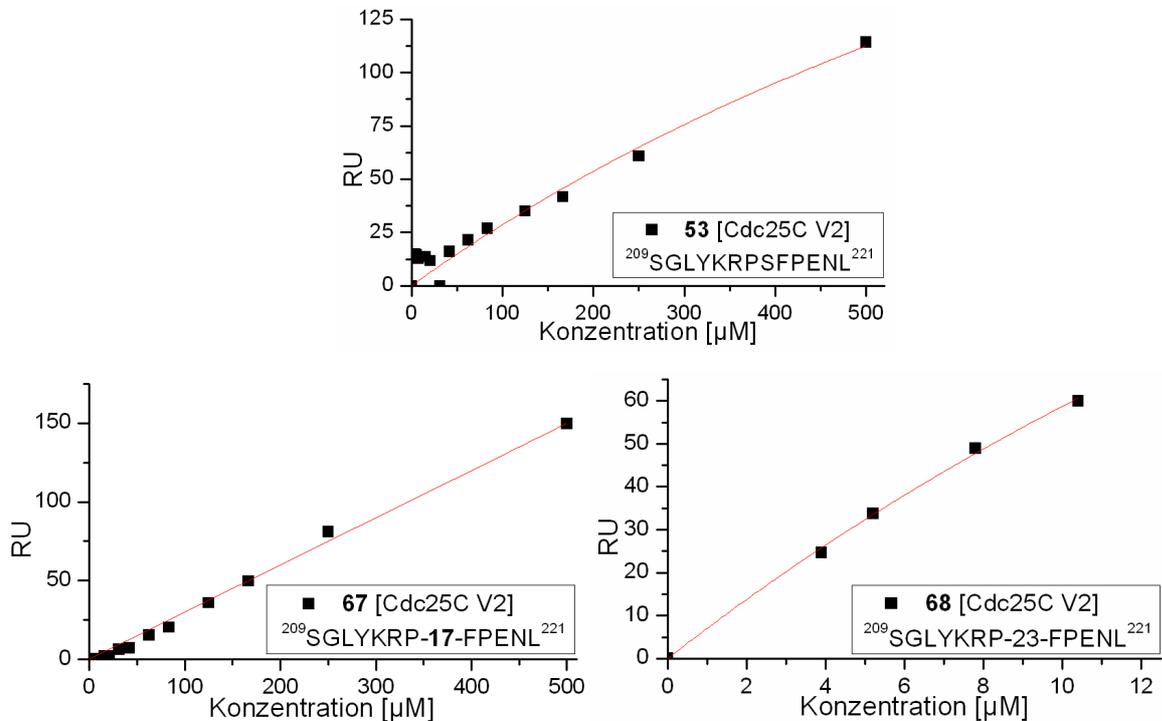


Abbildung 4.8-8: Thermodynamische Analyse der drei auf der zweiten Cdc25C-Variante basierenden Peptide (53, 67, 68; Sequenz: SGLYKSP-S/17/23-FPEML). Keiner der Liganden weist eine nennenswerte Affinität zu MARK auf.

## Ergebnisse und Diskussion

Zusätzlich zur Auswertung der Affinitäten wurden einzelne Kurven auf die Bindungseigenschaften hin untersucht. Analog zu dem in Abschnitt 4.2.2 erläuterten Vorgehen wurde der Verlauf einzelner Bindungsereignisse unter Zuhilfenahme der Langmuir-Gleichung angepasst und Werte für  $K_D$ ,  $k_a$  und  $k_d$  extrapoliert. Aufgrund des teilweise relativ rechtwinkligen Verlaufs sind die erhaltenen Werte stark fehlerbehaftet. Die ermittelten Werte der fünf Peptide, die gute Bindungseigenschaften in den SPR-Experimenten gezeigt haben, sind in Abbildung 4.8-9 dargestellt. Die auf diese Weise ermittelten  $K_D$ -Werte liegen im Bereich zwischen 7 und 72  $\mu\text{M}$ . Sie liegen analog zu den in Abschnitt 4.2.2 ermittelten Werten circa eine Zehnerpotenz unter den Werten, die die Auswertung der konzentrationsabhängigen Affinitäten zeigten.

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse beider Auswertungen ist in Tabelle 4.8-1 dargestellt. Vor dem Hintergrund der teilweise nicht optimalen kinetischen Anpassung der Langmuir-Gleichung an die Daten sollte die Auswertung nach der konzentrationsabhängigen Affinität eine zuverlässigere Rangfolge liefern. Besonders interessant scheint die Palladin-Sequenz (**63** und **64**) zu sein, die trotz oder gerade wegen eines vom *one-site-binding*-Modell abweichenden Bindungsmodus eine hohe Affinität zu MARK zu besitzen scheint.

*Tabelle 4.8-1: Tabelle, die die höchsten gemessenen Aktivitäten wiedergibt. Die Reihenfolgen divergieren je nach Auswertungsmethode. Insbesondere die Palladin-Sequenz (**63**, **64**) scheint besonders positive Bindungseigenschaften aufzuweisen, während die anderen Liganden relativ diffuse Ergebnisse zeigen.*

Peptid	Thermodynamik $K_D$ [mM]	Peptid	Kinetik $K_D$ [mM]
<b>64</b> (Palladin, <b>23</b> )	0.23	<b>63</b> (Palladin, <b>17</b> )	0.007
<b>62</b> ( <i>repeat</i> 4, <b>17</b> )	0.29	<b>59</b> (Cdc25C, <b>23</b> )	0.015
<b>63</b> (Palladin, <b>17</b> )	0.35	<b>62</b> ( <i>repeat</i> 4, <b>17</b> )	0.020
<b>55</b> ( <i>repeat</i> 1, <b>23</b> )	0.65	<b>55</b> ( <i>repeat</i> 1, <b>23</b> )	0.022
<b>59</b> (Cdc25C, <b>23</b> )	1.96	<b>64</b> (Palladin, <b>23</b> )	0.072

Neben der Palladinsequenz zeigt auch das auf dem ersten *Tau-repeat* beruhende Peptid **55** (*repeat* 1, **23**) eine gute Bindungsaffinität. Allerdings erfährt die Sequenz des 4. *repeats* durch die Modifikation an der Seitenkette eine deutliche Steigerung der Affinität, die nicht den Beobachtungen bei den nativen Peptiden entspricht. Dies deutet darauf hin, dass die Konformationen der Peptide, die die modifizierten Seitenketten enthalten, nicht der der nativen Substrate von MARK entsprechen.

## Ergebnisse und Diskussion

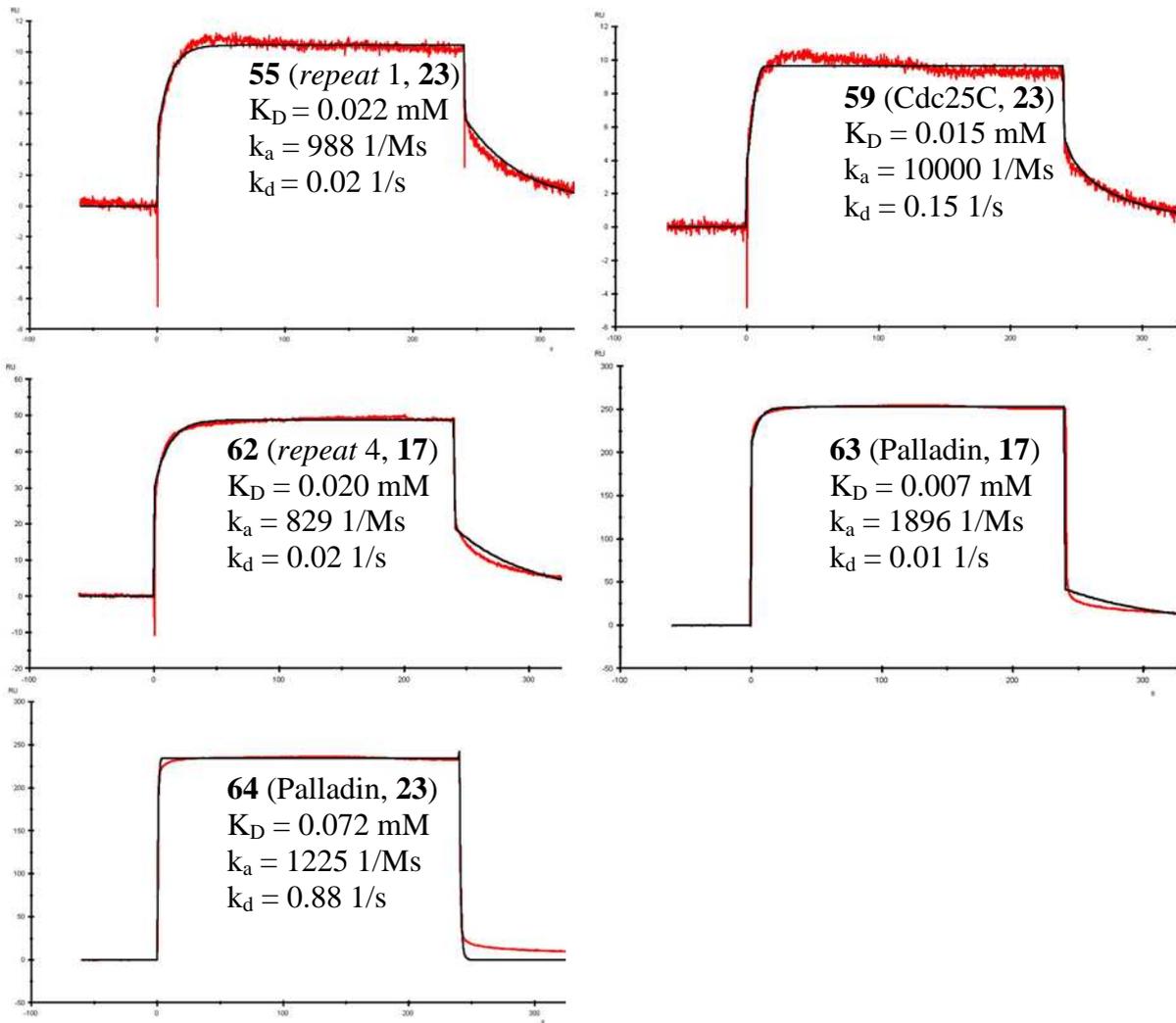


Abbildung 4.8-9: Darstellung der Langmuir-fits der am besten bindenden Peptide aus den SPR-Experimenten. Aufgrund des teilweise sehr steilen Verlaufs sind die Extrapolationen der Werte nur bedingt aussagekräftig. Insbesondere die off-rates ergeben teilweise fragwürdige Ergebnisse. Für die Peptide 55, 59, und 62 lieferte der Kurvenverlauf bei einer Konzentration von  $125 \mu\text{M}$  den besten fit, für 63 und 64 wurde der Verlauf bei einer Konzentration von  $250 \mu\text{M}$  gewählt.

Der Vergleich der unterschiedlichen Substanzen und ihrer beobachteten Affinitäten hat gezeigt, dass nur ein geringer Teil der synthetisierten Peptide innerhalb der Parameter des verwendeten Systems eine nennenswerte Affinität zur immobilisierten Kinase aufweist. Abgesehen von der Sequenz des ersten Tau-repeats zeigen alle Peptide, die mit dem modifizierten Lysin 17 bzw. 23 synthetisiert worden sind und Affinität zeigen, eine höhere Bindungsaffinität als die dazugehörigen nativen Peptide. Daraus lässt sich schließen, dass die strukturelle Veränderung durch den Austausch von Serin und ATP gegen Lysin mit einem

über einen *linker* kovalent daran gebundenen Adenin zu inhibitorisch wirksamen Substanzen führt.

Allerdings bewirkt die Kombination von Peptid und Nukleotid in einem Molekül nicht die zu erwartende Steigerung der Bindungsaffinität. Theoretisch sollten sich die einzelnen  $K_D$ -Werte im Idealfall miteinander multiplizieren.<sup>172</sup> Mit millimolaren Bindungskonstanten für die Peptidsequenz und einem  $K_D$ -Wert von 242  $\mu\text{M}$  für ATP sollte es nach dem von Bundle *et al.* erarbeiteten Modell möglich sein, im Falle einer optimalen Geometrie Affinitäten im nanomolaren Bereich zu erzeugen. Die Peptide, die die modifizierten Seitenketten tragen und an MARK binden, weisen Affinitäten in derselben Größenordnung wie ihre nativen Analoga auf. Die gewählte Art der Verknüpfung scheint die Bedingungen dieses synergetischen Konzepts nicht in ausreichendem Maß zu erfüllen. Auch die große Zahl der Freiheitsgrade durch die beiden sehr beweglichen Alkylketten kann sich negativ auf die Bindung zur Kinase auswirken.

Als weiterer Parameter wurde für die Substanzen, die im Rahmen der SPR-Messungen Affinität gezeigt haben, der  $EC_{50}$ -Wert ermittelt. Die mittlere effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ) ist ein wichtiger Wert zur Beschreibung der Wirksamkeit von pharmazeutischen Produkten. Der  $EC_{50}$ -Wert wird aus einer logarithmischen Dosis-Wirkungs-Kurve abgeleitet und gibt die Konzentration wieder, bei der unter den Testbedingungen die Hälfte der vorhandenen Rezeptoren mit Substrat belegt ist. Hierfür wurden aus den mit Origin ermittelten Gleichungen der Bindungskurven der Wert für eine unendliche Konzentration extrapoliert, auf 100 % gesetzt und die experimentell ermittelten RU-Antworten entsprechend umgerechnet. Die resultierenden sigmoiden Kurven sind in Abbildung 4.8-10 dargestellt.

Auffällig ist der niedrige Wert von  $EC_{50} = 45.1 \mu\text{M}$  für **55** (*repeat 1*, **23**), der nicht die Positionierung im Rahmen der anderen Auswertungen der SPR-Ergebnisse widerspiegelt (siehe Tabelle 4.6-1). Des Weiteren weisen die nach den gemessenen  $K_D$ -Werten favorisierten Peptide **63** (Palladin, **17**) und **64** (Palladin, **23**) die mit Abstand höchsten Werte auf.

Den  $EC_{50}$ -Werten zufolge sollte **55** (*repeat 1*, **23**) der effizienteste Inhibitor sein, da er seine Wirkung auch schon bei relativ niedrigen Konzentrationen entfaltet. Und dies, obwohl die entsprechenden Daten, die aus dem Affinitäts- und Kinetik-plot gewonnen wurden, dieser Substanz im Verhältnis zu den anderen nur eine mittelmäßige Affinität bestätigen. Insgesamt sind die durch die SPR-Experimente erhaltenen Daten nicht eindeutig. Je nach Auswertungsmethode ergeben sich unterschiedliche ausgeprägte Wirkungen für die unterschiedlichen Substanzen.

## Ergebnisse und Diskussion

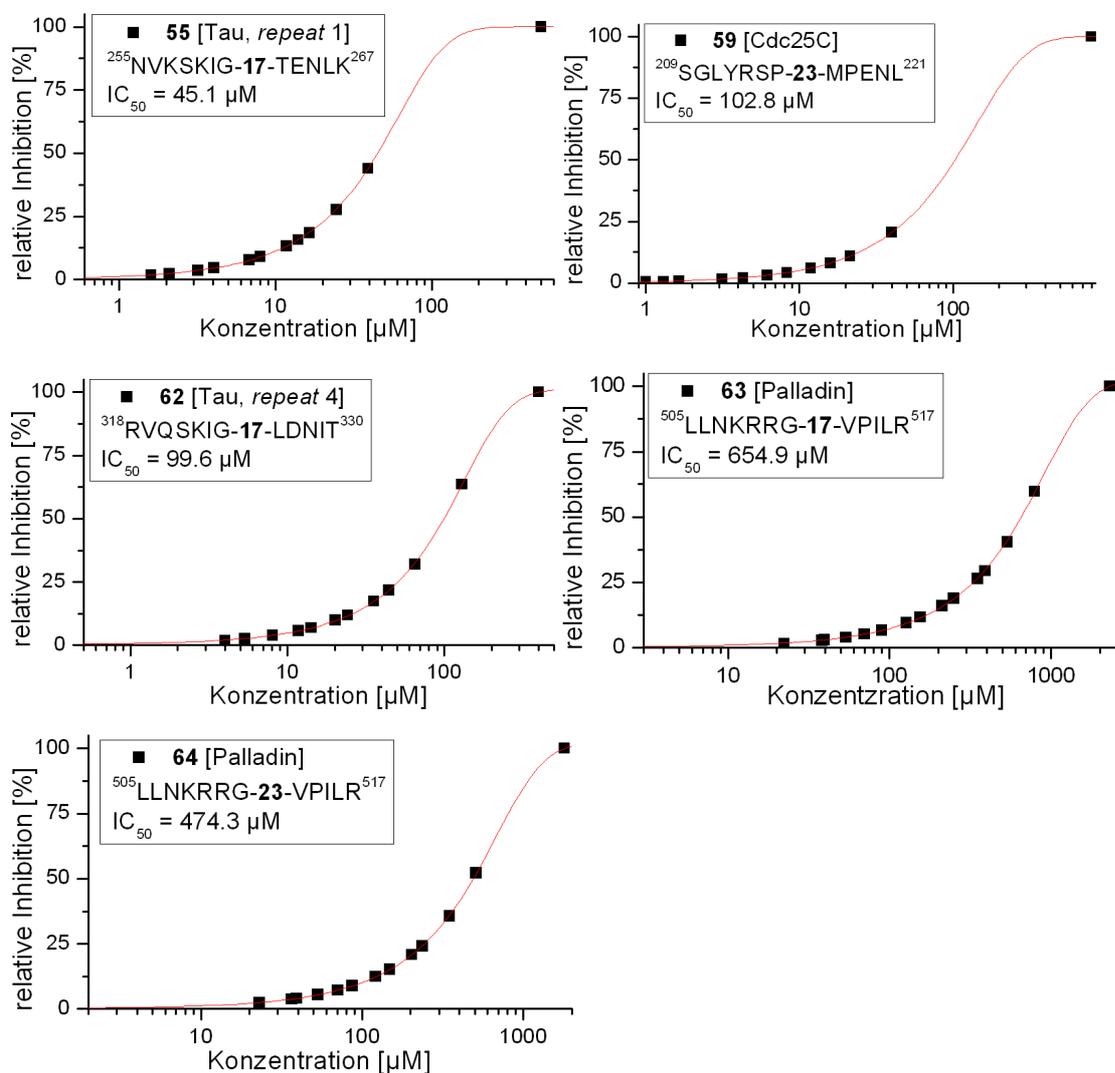


Abbildung 4.8-10: Darstellung der sigmoiden Dosis-Wirkungs-Beziehung der fünf vielversprechendsten Substanzen aus den vorangegangenen SPR-Experimenten. Interessanterweise scheint **55**, welches laut der Affinitäts- und Kinetikauswertung nicht als vielversprechendster Kandidat erschien, in besonders geringer Konzentration wirksam zu sein, wobei die bisher favorisierte auf Palladin beruhende Sequenz um Faktor 10 höhere Werte liefert.

**58** (Cdc25C, **17**) zeigt im Affinitäts-plot einen eher hohen  $K_D$ -Wert, die kinetische Auswertung trifft den Kurvenverlauf gut und der  $EC_{50}$ -Wert von circa  $100 \mu M$  ist relativ niedrig.

Die beiden auf der Palladin-Sequenz beruhenden Peptide **63** (Palladin, **17**) und **64** (Palladin, **23**) zeigen ein sehr unterschiedliches Verhalten im Affinitäts-plot und liefern nach der kinetischen Auswertung entgegengesetzte Charakteristika. Nach den  $EC_{50}$ -Werten zu

urteilen benötigen sie relativ hohe Konzentrationen, um wirksam zu sein. Besonders vielversprechend erscheint **55** (*repeat 1, 23*), da es in allen 3 Auswertungsvarianten gut positioniert ist und trotz mittelmäßiger Ergebnisse im Affinitäts- und Kinetik-*plot* zusammen mit dem niedrigen EC<sub>50</sub>-Wert insgesamt recht gute Werte liefert.

Durch die teilweise stark unterschiedlichen Bewertungen, die die Substanzen im Rahmen der SPR-Auswertung erfahren, sind eindeutige Rangfolgen nur schwer zu erstellen. Um eine erweiterte Basis für die Beurteilung der Wirksamkeit der einzelnen inhibitorischen Peptide zu erstellen, wurden weitere Testverfahren angewendet, die im nächsten Abschnitt näher erläutert werden.

### 4.9 Ergebnisse der Kinase-Assays

Neben der Beurteilung der Affinitäten der synthetisierten Peptide durch SPR-Experimente wurden unterschiedliche biochemische Verfahren angewendet, um zusätzliche Informationen zu erhalten.

Wie in Abschnitt 4.5 beschrieben, wurden unmittelbar nachdem die modifizierten Aminosäuren entschützt vorlagen, erste Kupplungsversuche unternommen. Zuerst wurden die Bausteine **17** und **23** an PAL-PEG-Harz immobilisiert und abgespalten. Anhand des Fmoc-Wertes und der erhaltenen Ausbeute nach der Aufreinigung mittels HPLC konnte bestätigt werden, dass sich diese Moleküle wie erwartet in der Festphasensynthese einsetzen lassen. Anschließend folgte die Synthese von 4 Pentapeptiden, um das Kupplungsverhalten der Bausteine **17** und **23** und der darauffolgenden Aminosäuren näher zu untersuchen. Anschließend wurden die erhaltenen Substanzen in einem *in vitro*-Test auf ihren Effekt auf den Substratumsatz von MARK hin untersucht.

Hierfür wurde ein Puffer verwendet, dessen Zusammensetzung in Tabelle 4.7-1 aufgelistet ist. Die Konzentration von MARK betrug dabei 3 nM. Vor der Zugabe des mit  $7.4 \cdot 10^7$  MBq/mol radioaktiv dotierten ATPs und des zu phosphorylierenden Substratpeptids TR1 (<sup>255</sup>NVKSKIGSTENLK<sup>267</sup>) wurde die Kinase mit dem potenziellen Inhibitor 20 Minuten in einem Eppendorf-*tube* auf Eis vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Phosphorylierung über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 30 °C in einem Inkubator.

## Ergebnisse und Diskussion

*Tabelle 4.9-1: Zusammensetzung des Puffers für den Kinaseassay mit radioaktiv dotiertem ATP. Sowohl ATP als auch das auf dem ersten repeat basierende Substratpeptid und der potenzielle Inhibitor wurden in einer Konzentration von 50  $\mu$ M eingesetzt.*

Substanz	Konzentration [mM]
Tris-HCl (pH 8.0)	50
NaCl	100
MgCl <sub>2</sub>	5
EDTA	2
DTT	1
Benzamidin	1
PMSF	0.5
ATP	0.05
TR1	0.05

Nach Ablauf der Zeit wurde die Kinase in den einzelnen Gefäßen durch Zugabe von Trichloressigsäure (finale Konzentration 10 %) ausgefällt, während das Peptid in Lösung blieb. Die einzelnen Lösungen wurden auf Phosphocellulose pipettiert und bis zur Konstanz der Radioaktivität mit 0.1 M Phosphorsäure gewaschen.

Die Peptide bleiben an der Oberfläche der Phosphocellulose haften, während die restlichen löslichen Bestandteile, insbesondere das unverbrauchte radioaktive ATP, durch das Auswaschen entfernt werden. Die verbliebene Radioaktivität stammte von <sup>32</sup>P-haltigem  $\gamma$ -Phosphatgruppen, die von MARK auf TR1 übertragen wurden, und war ein Maß für die Aktivität der Kinase.

Neben den zu testenden Substanzen wurde jeweils eine Reaktion ohne Inhibitor und eine mit Hymenialdisine in einer Konzentration von 50  $\mu$ M durchgeführt. Bei Hymenialdisine handelt es sich um einen effektiven Kinaseinhibitor, der neben MARK auch auf GSK3 $\beta$ , Cdk2 und Cdk5 wirkt.<sup>173, 174</sup> Die Ergebnisse dieser beiden Experimente markieren den Maximal- und den Minimalwert, zwischen denen sich die anderen Substanzen theoretisch platzieren müssen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.9-1 dargestellt.

Bei einer geringen Hintergrundradioaktivität (links in Abbildung 4.9-1) stecken der Wert der nicht inhibierten Reaktion (zweiter Balken von links in Abbildung 4.9-1) und der der inhibierten Reaktion mit Hymenialdisine (zweiter Balken von links in Abbildung 4.9-1, 90 % Aktivitätsverlust) den Bereich ab, innerhalb dessen die Wirkung der potenziell inhibitorischen Substanzen einzuordnen ist.

Die Ergebnisse des Assays zeigen, dass der inhibitorische Effekt der synthetisierten Substanzen eher gering ist. Die auf Cdc25C basierende Sequenz zeigt praktisch keinerlei

Wirkung, was sich mit den bisher gemessenen Daten, die durch SPR-Experimente gewonnen wurden, deckt. Und dies, obwohl es sich dabei um natürliches Substrat von MARK handelt.

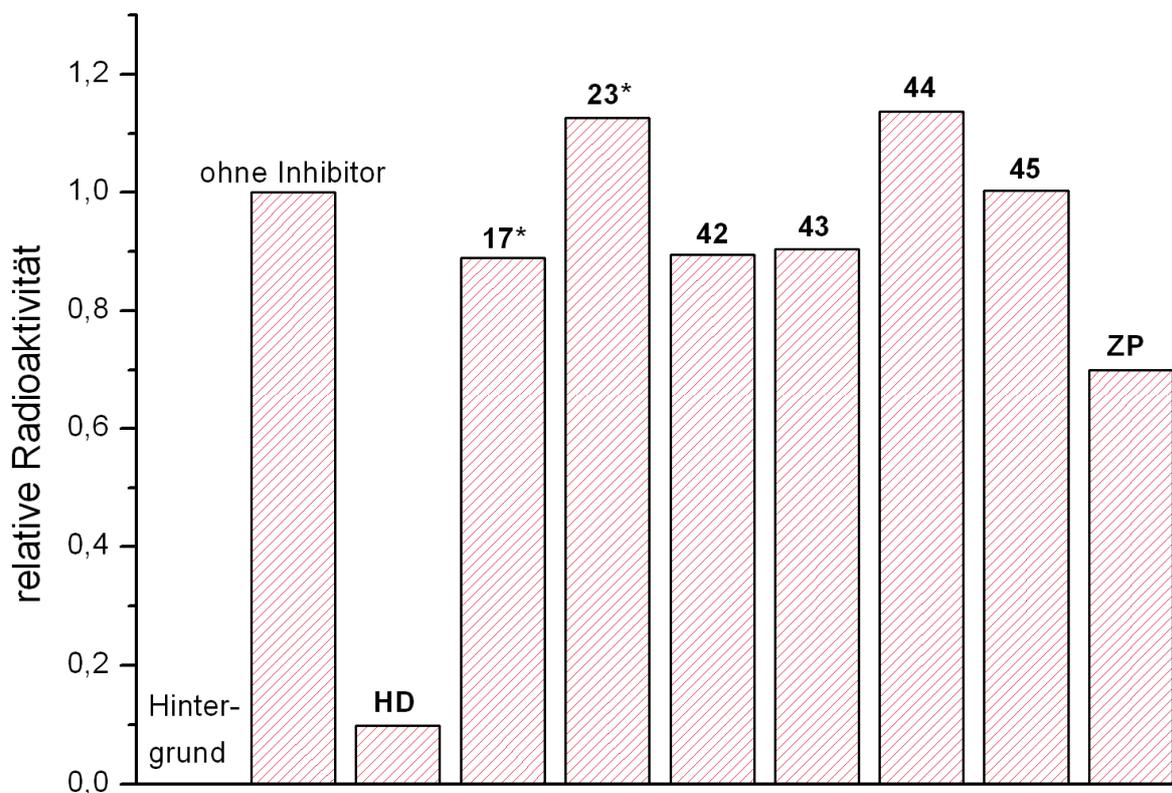


Abbildung 4.9-1: Grafische Darstellung der Ergebnisse des Assays mit radioaktiv dotiertem ATP. Für den entschützten Baustein **6** und die beiden auf dem ersten Tau-repeat beruhenden Peptide konnte eine inhibitorische Wirkung von circa 15 % nachgewiesen werden. **17\*** und **23\*** entsprechen den entschützten Synthesebausteinen **17** und **23** (siehe Abbildung 4.9-2). Die ähnliche Inhibitionsrate von **42** und **43** spiegelt nicht den deutlichen Unterschied wieder, den die einzelnen Aminosäuren **17\*** und **23\*** zeigen.

Für die entschützte Variante von **17** (**17\***) konnte annähernd die gleiche inhibitorische Wirkung nachgewiesen werden wie für die wesentlich komplexeren Substanzen **42** ( $^{258}\text{SKIG17}^{262}$ ) und **43** ( $^{258}\text{SKIG23}^{262}$ ). Hier scheint die peptidische Sequenz von eher untergeordneter Bedeutung zu sein. Daraus lässt sich schließen, dass der beobachtete Effekt größtenteils auf die modifizierte Seitenkette zurückzuführen ist. Diese weist trotz der starken Vereinfachung inhibitorisches Potenzial auf, auch wenn dieses nicht sehr stark ausfällt.

Peptid **42** ( $^{258}\text{SKIG17}^{262}$ ) und **44** ( $^{212}\text{YRSP17}^{216}$ ) basieren auf der gleichen modifizierten Aminosäure (**17**) und zeigen einen deutlichen Unterschied in ihrer inhibitorischen Wirkung. Während **42** den Kinaseumsatz um 10 % verringerte, konnte für **44** kein Einfluss auf die Phosphorylierung nachgewiesen werden. Die Verlängerung der Seitenkette des inhibitorischen Bausteins um eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe (**43** ( $^{258}\text{SKIG23}^{262}$ ) und **45** ( $^{212}\text{YRSP23}^{216}$ ))

zeigt denselben Effekt. Hier ist zwar eine Abhängigkeit der Wirkung von der Sequenz zu beobachten, allerdings sind die beobachteten Effekte gering und unterscheiden sich praktisch nicht von der Wirkung des entschützten Aminosäurederivates **17**.

Besonders interessant scheint vor diesem Hintergrund die recht hohe Aktivität eines Zwischenproduktes der Synthese (**ZP**) zu sein (siehe Abbildung 4.9-1 rechts und 4.9-2). Dabei handelt es sich um eine entschützte Zwischenstufe der Synthese von **17**. Sie besteht aus Adenin mit einer addierten Butansäure an N9-Position. MARK bindet in dem Bereich, wo sich nach dem Modell bei einem Bindungsereignis die Carboxylgruppe befinden sollte ein  $Mg^{2+}$ . Dieses hat die Aufgabe, die Phosphate von ATP zu stabilisieren. Da die freie Carboxylgruppe einen größeren Bereich negativer Ladung darstellt als die Amidbindung der Aminosäureanaloge **17** und **23**, scheint sich hier ein Schwachpunkt der Vereinfachung der ATP-Struktur zu manifestieren. Folgende Generationen der inhibitorischen Moleküle sollten in diesem Bereich neben der Ribose eine hohe negative Ladungsdichte aufweisen, um die Originalstruktur besser zu mimikrieren. Zusätzliche strukturelle Analoga zur Riboseeinheit des ATPs sollten ebenfalls einen positiven Effekt auf die Affinität haben.

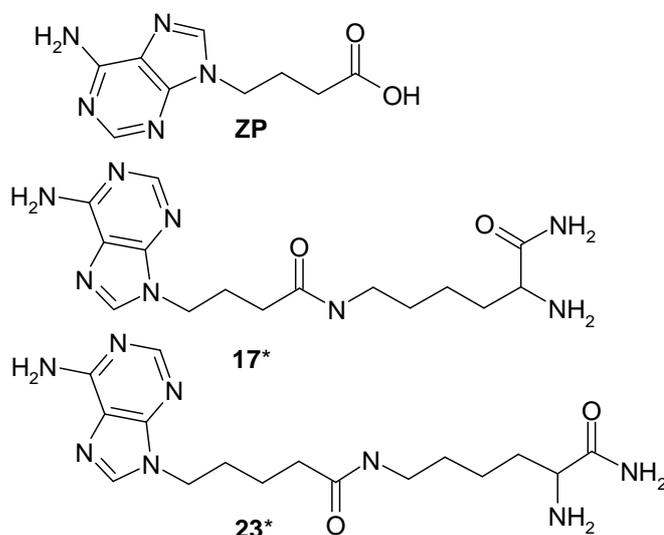


Abbildung 4.9-2: Strukturen des Synthesezwischenproduktes **ZP** und der entschützten modifizierten Aminosäure **17** und **23** ohne Schutzgruppen, wie sie im ersten Inhibitionsassay untersucht wurden (siehe Abbildung 4.9-1). Die erhöhte Affinität dieser Substanz ist vermutlich darin begründet, dass die negative Ladung der Carboxylgruppe besser als die Amidbindung in den anderen Substanzen mit dem Magnesium wechselwirken kann, welches das Triphosphat des ATPs stabilisiert.

## Ergebnisse und Diskussion

Die Substanzen, deren Synthese und Untersuchung im Rahmen von SPR-Experimenten in den Abschnitten 4.5 und 4.6 erläutert wurden, sind ebenfalls diesem Assay unterzogen worden. Die in Abbildung 4.9-3 dargestellten Daten resultieren aus einer vierfachen Durchführung des Experiments.

Während bei den Peptid-Paaren **54/55** und **58/59**, die auf dem ersten Tau-repeat und Cdc25C beruhen, praktisch identische Inhibitionsraten bei beiden Aminosäureanaloga zu erkennen sind, weisen die anderen Peptide diesbezüglich teilweise sehr große Unterschiede auf. Wobei mal **17** und mal **23** einer Sequenz zu besseren Bindungseigenschaften verhilft. Daraus lässt sich schließen, dass die Peptide unterschiedliche Konformationen einnehmen, die Adenin auf unterschiedliche Weise der Kinase präsentieren.

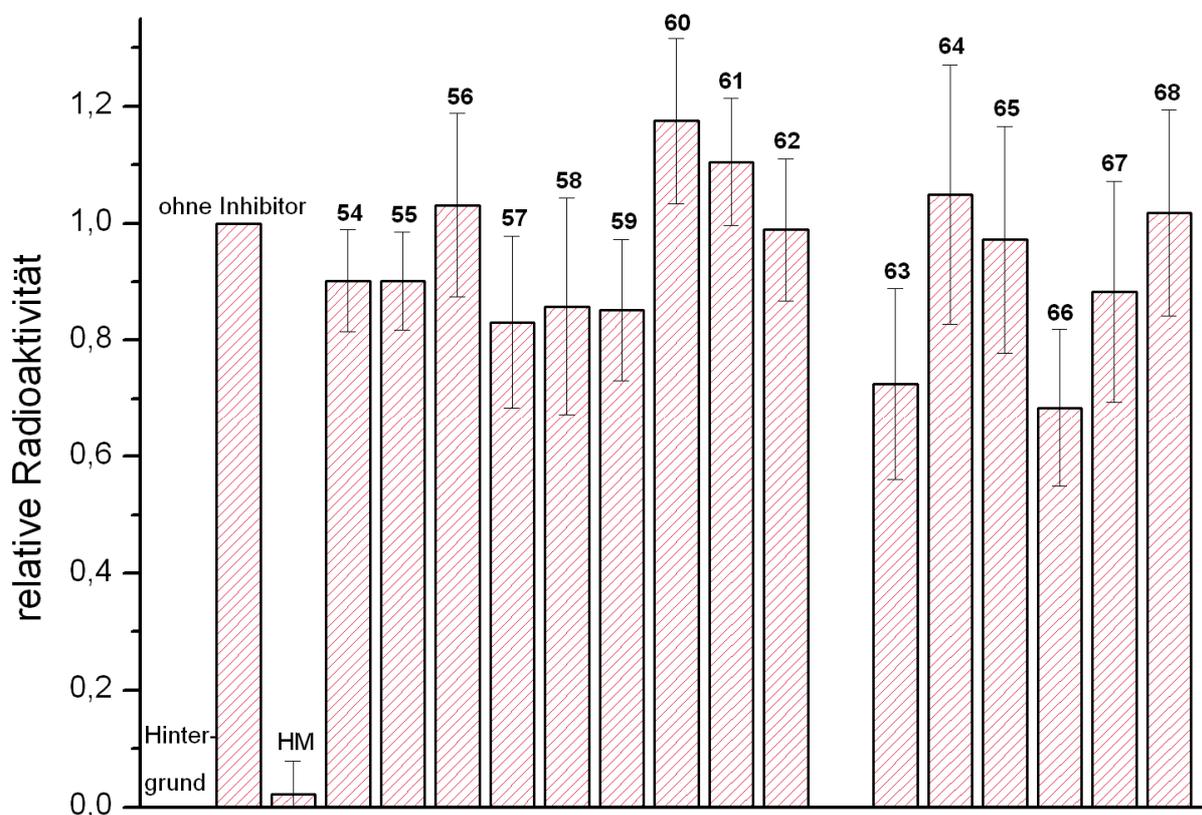


Abbildung 4.9-3: Grafische Darstellung der inhibitorischen Aktivität der verschiedenen auf **17** und **23** basierenden Peptide. Als besonders effizient haben sich in diesem Assay das Palladin-basierte **63** und die Cdc25C-Variante **66** herausgestellt. Im Vergleich mit den SPR-Messungen stellt sich heraus, dass beide Verfahren zu stark unterschiedlichen Ergebnissen führen.

Sehr interessant ist dieser Aspekt bei den in diesem Test besonders erfolgreichen Substanzen **63** (Palladin, **17**) und **66** (Cdc25C V1, **23**), die die Aktivität von MARK um durchschnittlich 27.5 bzw. 31.6 % verringern. Während das Palladin-basierte **63** (Palladin, **17**) eine hohe Inhibition aufweist, ist das Analogon **64** (Palladin, **23**) praktisch wirkungslos. Bei **66** (Cdc25C V1, **23**) ist die Situation identisch, nur ist hier die verkürzte Variante **65** (Cdc25C V1, **17**) ohne jeden Effekt. Die auf den bekannten Zielsequenzen von MARK beruhenden Peptide **54** (*repeat 1*, **17**), **55** (*repeat 1*, **23**), **57** (PTPH1, **23**), **58** (Cdc25C, **17**), **59** (Cdc25C, **23**) und **67** (Cdc25C V2, **17**) zeigen geringe Inhibitionsraten im Bereich von 10 bis 17 %, während die übrigen Substanzen in diesem Assay keine messbare Wirkung zeigen.

Die SPR-Untersuchungen unterschieden sich in vielerlei Hinsicht von dem hier angewandten Messprinzip. Die teilweise sehr deutlichen Unterschiede in den Ergebnissen beider Verfahren sind auf die unterschiedlichen Testbedingungen zurückzuführen.

Im Gegensatz zu dem hier durchgeführten Assay, in dem die Substanzen zusammengegeben und nach der Inkubation analysiert werden, ist SPR eine Methode, bei der ein Fließgleichgewicht untersucht wird. Durch die kovalente Bindung des Proteins an eine Matrix kann es zu konformationellen Veränderungen kommen, die sich auf die Bindung von Liganden auswirkt. Auch die Verwendung von Tris-HCl- statt PBS-Puffer und die Stabilisatorsubstanzen wie DTT, Benzamidin und DTT können das Protein beeinflussen.

Ein weiterer entscheidender Punkt ist die Tatsache, dass bei den Affinitätsmessungen keine konkurrierenden Substrate vorhanden waren, die einen Effekt auf die Messergebnisse gehabt haben könnten. Konformationelle Änderungen der Kinasestruktur durch die Bindung von ATP bzw. den ATP-Analoga könnten die Bindungsmodi der Peptide beeinflussen.

Die in den SPR-Messungen erfolgreichen Peptide **55** (*repeat 1*, **23**), **59** (Cdc25C, **23**) und **63** (Palladin, **17**) zeigen auch im Radioassay inhibitorische Eigenschaften. Während die ersten beiden Substanzen den Umsatz um etwa 10 % verringern, zeigt **63** mit knapp 30 % einen sehr starken Effekt. In den SPR-Experimenten lagen die  $K_D$ -Werte von **55** (650  $\mu$ M), **59** (1.96 mM), **63** (350  $\mu$ M) und **64** (230  $\mu$ M) nahe beieinander und spiegelten nicht die hier beobachtete Staffelung wieder. **63** (Palladin, **17**) zeigte im SPR-Experiment mit einem  $K_D$ -Wert von 290  $\mu$ M ebenfalls analoge Affinität, konnte aber im Assay mit radioaktivem ATP keinerlei Inhibition bewirken. Anscheinend bindet dieses Peptid nicht lange genug im aktiven Zentrum, um ATP in ausreichendem Maß aus der Bindungstasche zu verdrängen.

Erstaunlicherweise erwies sich in diesem Test die Cdc25C Variante mit Phenylalanin statt Methionin an der +1 Position neben der Phosphorylierungsstelle (**66**) als aktivster Inhibitor,

ohne dass eine Affinität im Biacore-Experiment beobachtet wurde. Auch die zweite Cdc25C-Variante in ihrer kurzen Form verringert den Umsatz von MARK um circa 10 % während das analoge **68** (Cdc25C V2, **23**) ohne Wirkung ist.

Vor diesem Hintergrund ist die Tatsache, dass MARK eine recht langsame Kinase ist, von besonderer Bedeutung. Mit einer *turnover-number* von  $1 \text{ s}^{-1}$ , einem  $K_D$  von  $242 \mu\text{M}$  für ATP und  $456 \mu\text{M}$  für TR1 ist das aktive Zentrum nur relativ selten mit beiden Substraten besetzt.<sup>175, 176</sup> Mit den Konzentrationen von Enzym und Ligand lässt sich bei vorhandenem  $K_D$ -Wert die Rezeptorbelegung berechnen. Gleichung 4.7-1 zeigt, in welchem Verhältnis die Faktoren zueinander stehen.<sup>177</sup>

$$RB = \frac{0.5 * k + 0.5 * E + 0.5 * L - \sqrt{k^2 + 2kE + 2kL + E^2 - 2EL + L^2}}{E}$$

*Gleichung 4.9-1: Die prozentuale Rezeptorbelegung (RB) hängt von der Gleichgewichtskonstanten (k), der Enzymkonzentration (E) und der Ligandenkonzentration (L) ab.*

Die in den unterschiedlichen Tests verwendeten Standard-Konzentrationen von  $50 \mu\text{M}$  für ATP und  $0.0132 \mu\text{M}$  für die Kinase führen zu einer 17 %igen Belegung von MARK mit dem Nukleotid. Und erst mit gebundenem Nukleotid kann anschließend das Substrat binden und die Phosphatgruppe übertragen werden. Aus dem Assay geht hervor, dass die beiden besten Inhibitoren **63** (Palladin, **17**) und **66** (Cdc25C V1, **23**) dazu in der Lage sind, im Rahmen der Parameter der Untersuchung rund 30 % des ATPs aus der Bindungstasche zu verdrängen. Und dies, obwohl das Protein zu 83 % ohne gebundenes Substrat vorliegt und in dieser Form ebenfalls mit den inhibitorischen Peptiden wechselwirken kann. Der Effekt der getesteten Substanzen sollte sich bei einer zusätzlichen Aktivierung der Kinase, wie sie *in vivo* in unterschiedlichen Varianten vorkommt, noch stärker bemerkbar machen.

In einem System, in dem zwei Substanzen kompetitiv in der *binding-site* eines Proteins binden, lässt sich ebenfalls die Rezeptorbelegung mit einem der beiden Substrate berechnen. Die Gleichung (siehe Gleichung 4.7-2) geht aus den Berechnungen nach Michaelis-Menten hervor und benötigt die Konzentrationen und  $K_M$ -Werte der beteiligten Substanzen. Wenn man davon ausgeht, dass die Reaktion vom Enzym-Substrat-Komplex zu den Produkten ( $k_2$ ) wesentlich kleiner ist als die Rückreaktion zu den Edukten ( $k_{-1}$ ), was bei einer langsamen Kinase der Fall sein sollte, dann ist die Näherung  $K_M = K_D$  gerechtfertigt.

$$ES = \frac{E_o}{1 + \frac{K_M}{[S]} + \frac{K_M * [I]}{[S] * K_I}}$$

*Gleichung 4.9-2: Gleichung zur Berechnung der Enzym-Substrat-Konzentration in Gegenwart eines Inhibitors in Abhängigkeit von den Konzentrationen und  $K_M$ -Werten der beteiligten Substanzen. Unter der Annahme, dass  $K_M=K_D$ , was bei einem sehr geringen  $k_{-1}$  akzeptabel ist, lassen sich die entsprechenden  $K_D$ -Werte berechnen. Die Gesamtzymkonzentration der Kinase ( $E_o$ ), die Konzentration des Substrates (in diesem Fall ATP,  $[S]$ ) und die zugehörige Bindungskonstante ( $K_M$ ) sowie die Konzentration des Inhibitors ( $[I]$ ) fließen in die Rechnung ein.*

Mit Hilfe dieser Gleichung lassen sich aufgrund der prozentualen Verminderung des Kinaseumsatzes  $K_D$ -Werte aus den erhaltenen Daten extrapolieren. Diese Daten sind jedoch nur eine Annäherung, da mit  $K_M=K_D$  und der Verwendung eines einzigen Messwertes Vereinfachungen vorgenommen wurden.

Die in Tabelle 4.7-2 angegebenen Werte beruhen auf den bekannten Konzentrationen der eingesetzten Substanzen. Des Weiteren wurden der  $K_D$ -Wert von ATP und die im Assay beobachtete prozentuale Verminderung der Kinaseaktion in die Berechnung mit einbezogen.

In den vorangegangenen SPR-Experimenten konnten für die Peptide, die auf den Sequenzen des Tau-*repeats* 1 und Palladin beruhen, besonders gute Bindungseigenschaften nachgewiesen werden. Hier zeigt sich ein ähnliches Bild, allerdings konnte im Biacore keine nennenswerte Affinität für **54** (*repeat* 1, **17**) nachgewiesen, dafür aber für **64** (Palladin, **23**), also ein Befund, der im Gegensatz zu dem Radioassay steht. **59** (Cdc25C, **23**) dagegen weist in beiden Tests eine um einen Faktor von circa 3 schlechtere Affinität als **55** (*repeat* 1, **23**) auf. Dies deutet darauf hin, dass es bei den unterschiedlichen Methoden trotz teilweise divergenter Resultate einige Parallelen zwischen den Ergebnissen gibt. Eine mögliche Begründung könnte sein, dass nicht alle Sequenzen darauf angewiesen sind, dass eine ATP-induzierte Konformation das optimale Epitop für das *target* präsentiert. Besonders auffällig ist in diesem Zusammenhang, dass der effizienteste Inhibitor im *in vitro* Test (**66**) keinerlei Affinität im Biacore gezeigt hat.

## Ergebnisse und Diskussion

*Tabelle 4.9-2: Zusammenfassung der extrapolierten  $K_D$ -Werte aus dem Radioassay und der Ergebnisse der SPR- und FRET-Experimente. Die berechneten Werte basieren auf der ATP-Belegung von MARK, die aus veröffentlichten Affinitätswerten abgeleitet wurde.<sup>175, 176</sup> Die Miteinbeziehung der bekannten Konzentrationen und einiger Vereinfachungen ermöglicht eine Abschätzung der Bindungskonstanten.*

Peptid	Verringerung des Umsatzes (Radioassay) [%]	Extrapolierter $K_D$ -Wert [ $\mu$ M]	SPR $K_D$ -Wert (Affinität) [ $\mu$ M]	SPR $K_D$ -Wert (Kinetik) [ $\mu$ M]	$K_D$ -Werte aus FRET-Assay [ $\mu$ M]
<b>54</b>	9.8	350	-	-	8.04
<b>55</b>	9.9	325	650	22	5.90
<b>56</b>	0	-	-	-	-
<b>57</b>	6.9	600	-	-	-
<b>58</b>	4.2	950	-	-	-
<b>59</b>	4.8	950	1960	15	-
<b>60</b>	0	-	-	-	9.42
<b>61</b>	0	-	-	-	-
<b>62</b>	1.1	> 2500	290	20	-
<b>63</b>	27.5	125	350	7	340.11
<b>64</b>	0	-	230	72	4.86
<b>65</b>	2.8	> 2500	-	-	48.99
<b>66</b>	31.6	75	-	-	-
<b>67</b>	11.7	325	-	-	-
<b>68</b>	0	-	-	-	-

Aus diesem Experiment geht hervor, dass ein Zusammenführen der Daten mit den SPR-Experimenten nur teilweise funktioniert. Insbesondere die Tatsache, dass einige der Substanzen inhibitorische Wirkung zeigen, ohne dass eine auch nur geringe Affinität zur Kinase nachgewiesen werden konnte, ist schwer interpretierbar.

Um die Wirkung der inhibitorischen Peptide besser beurteilen zu können, wurde ein zweiter Assay angewandt. Wie in Abschnitt 2.5 beschrieben, ermöglicht die Verwendung eines speziellen mit Chromophoren versehenen rekombinanten Substrates eine photometrische Echtzeitbeobachtung der Kinasereaktion. Das Verhältnis der beobachteten emittierten Wellenlängen von Edukt und Produkt gibt direkt den Umsatz der Kinase wieder. Die Substanzen, die sich in den SPR-Experimenten und im ersten Assay als vielversprechend herausgestellt haben, wurden in den Konzentrationen 1000, 500, 200, 100 und 50  $\mu$ M vermessen. Die Zusammensetzung der Reaktionslösung entsprach den in Tabelle 4.7-1 aufgelisteten Parametern. Bei 30 °C wurde der Umsatz über einen Zeitraum von 100 Minuten beobachtet.

Das Edukt emittiert bei Anregung mit einer Wellenlänge von 433 nm die eingestrahlte Energie bei einer Wellenlänge von 480 nm. Nach erfolgter Reaktion sind beide Chromophore in unmittelbarer Nähe zueinander positioniert und es findet eine Übertragung der Energie durch Wechselwirkung der Dipolmomente der beiden Chromophoren statt. Dies hat eine erhöhte Emission bei 528 nm zur Folge bei einer gleichzeitigen Verringerung der Emission bei 480 nm. Abbildung 4.9-4 zeigt die grafische Darstellung des beobachteten Reaktionsverlaufes über die Zeit anhand der Daten von **55** (*repeat 1*, **23**). Die gemessene Inhibition macht sich mit dem Fortschreiten der Reaktion immer stärker bemerkbar.

Im Gegensatz zu dem Radioassay konkurrieren die potenziell inhibitorischen Peptide nicht mit einem 13 Aminosäuren langen Peptid aus dem ersten *repeat* von Tau (siehe Abschnitt 2.5), sondern mit einem komplexen rekombinanten Proteinkonstrukt, welches einen Ausschnitt aus Cdc25C als Phosphorylierungsmotiv beinhaltet. Dieses weist im Gegensatz zu der auf Tau beruhenden Zielsequenz ein Bindungsmotiv für die 14-3-3 $\tau$ -Domäne auf (siehe Abschnitt 2.4), wodurch der Faltmechanismus und damit der Energietransfer erst möglich werden.

Für die Auswertung der Experimente wurde das Verhältnis der emittierten Wellenlängen der beiden Chromophoren gegen die Konzentrationen der inhibitorischen Peptide aufgetragen. Die Datenpunkte der Reaktionen nach 100 Minuten wurden für die Auswertung verwendet, da sich hier die Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen besonders stark entwickelt haben. Aus ungeklärten Gründen traten bei einigen Konzentrationen der Peptide **63** (Palladin, **17**), **64** (Palladin, **23**) und **66** (Cdc25C V1, **23**) Werte auf, die absolut nicht zu den übrigen Ergebnissen der einzelnen Messreihen passten. Für die Auswertung wurden die Daten gewählt, die eine vernünftige Interpretation zuließen.

In Abbildung 4.9-5 sind die Verhältnisse der Wellenlängenmaxima von Edukt und Produkt gegen die Zeit aufgetragen. Analog zu den SPR-Messungen wurden die  $K_D$ -Werte mit der Software Origin 7.5 aus der Krümmung der einzelnen Kurven berechnet. Als zusätzliche Referenz wurde zudem das Peptid **60** (KSR1, **17**) vermessen. Hierfür wurden weder im SPR-Experiment noch im Radioassay Interaktionen mit der Kinase nachgewiesen. Entgegen den Erwartungen konnte in diesem zweiten Assay ein recht guter inhibitorischer Effekt für dieses Peptid nachgewiesen werden.

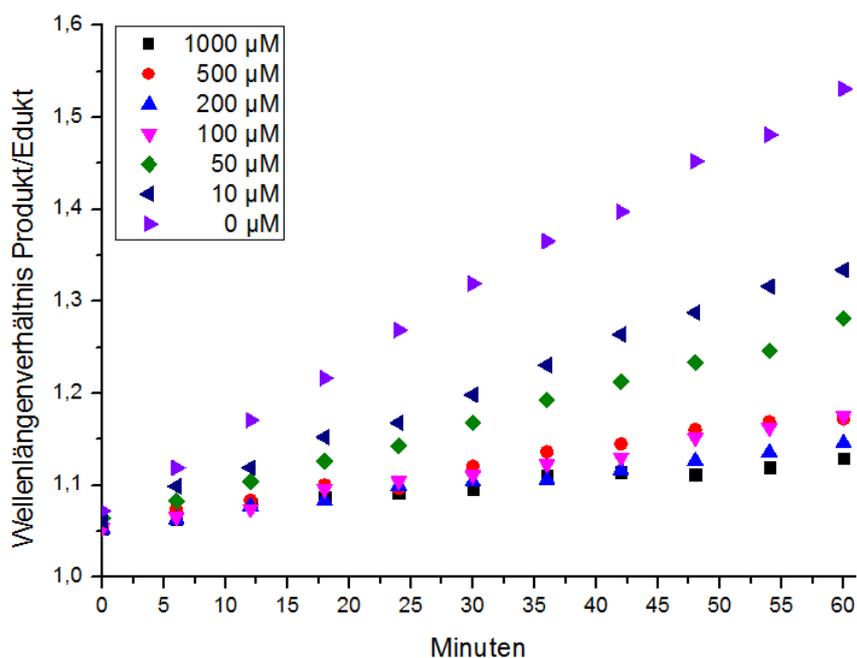


Abbildung 4.9-4: Darstellung des Verlaufs der Inhibition mit der Zeit anhand der Daten, die bei der Untersuchung von **55** gewonnen wurden. Die einzelnen Datenpunkte stellen das Verhältnis der emittierten Wellenlängen 528 nm (Produkt) und 420 nm (Edukt) zu dem entsprechenden Zeitpunkt dar.

In diesem Test ergeben sich für alle Peptide bis auf **63** (Palladin, **17**) und **66** (Cdc25C V1, **23**) einstellige mikromolare  $K_D$ -Werte. Dies entspricht einem Unterschied von zwei Zehnerpotenzen zu den SPR-Daten, die in den konzentrationsabhängigen Tests ermittelt wurden. Andererseits passen die Werte gut zu den Ergebnissen der kinetischen Auswertung. Der einzige Parameter, der in diesem Assay geändert wurde, war die Verwendung eines anderen Substrates. Dieses ist im Gegensatz zu TR1 nicht 13, sondern 756 Aminosäuren lang und enthält mittig das 18 Aminosäuren lange Bindungsepitop. Daher sollte es in Lösung eine deutlich geringere Beweglichkeit aufweisen, als die zu testenden Peptide. Daneben ist es für das rekombinante Konstrukt auch aus sterischen Gründen schwieriger, der Kinase das Epitop zu präsentieren. Dies könnte zur Erklärung beitragen, weshalb die  $K_D$ -Werte der getesteten inhibitorischen Peptide in diesem System deutlich niedriger sind, als in den SPR-Experimenten zu beobachten war.

**63** (Palladin, **17**), welches in allen vorangegangenen Tests gute Bindungseigenschaften aufwies, zeigt mit einem  $K_D$ -Wert von 340  $\mu\text{M}$  eine deutlich geringere Interaktion mit der Kinase als die anderen Substanzen. Der Wert von 49  $\mu\text{M}$  für **66** (Cdc25C V1, **23**) liegt sehr nah bei den anderen Peptiden, deren Werte alle zwischen 4.8 und 9.4  $\mu\text{M}$  schwanken.

## Ergebnisse und Diskussion

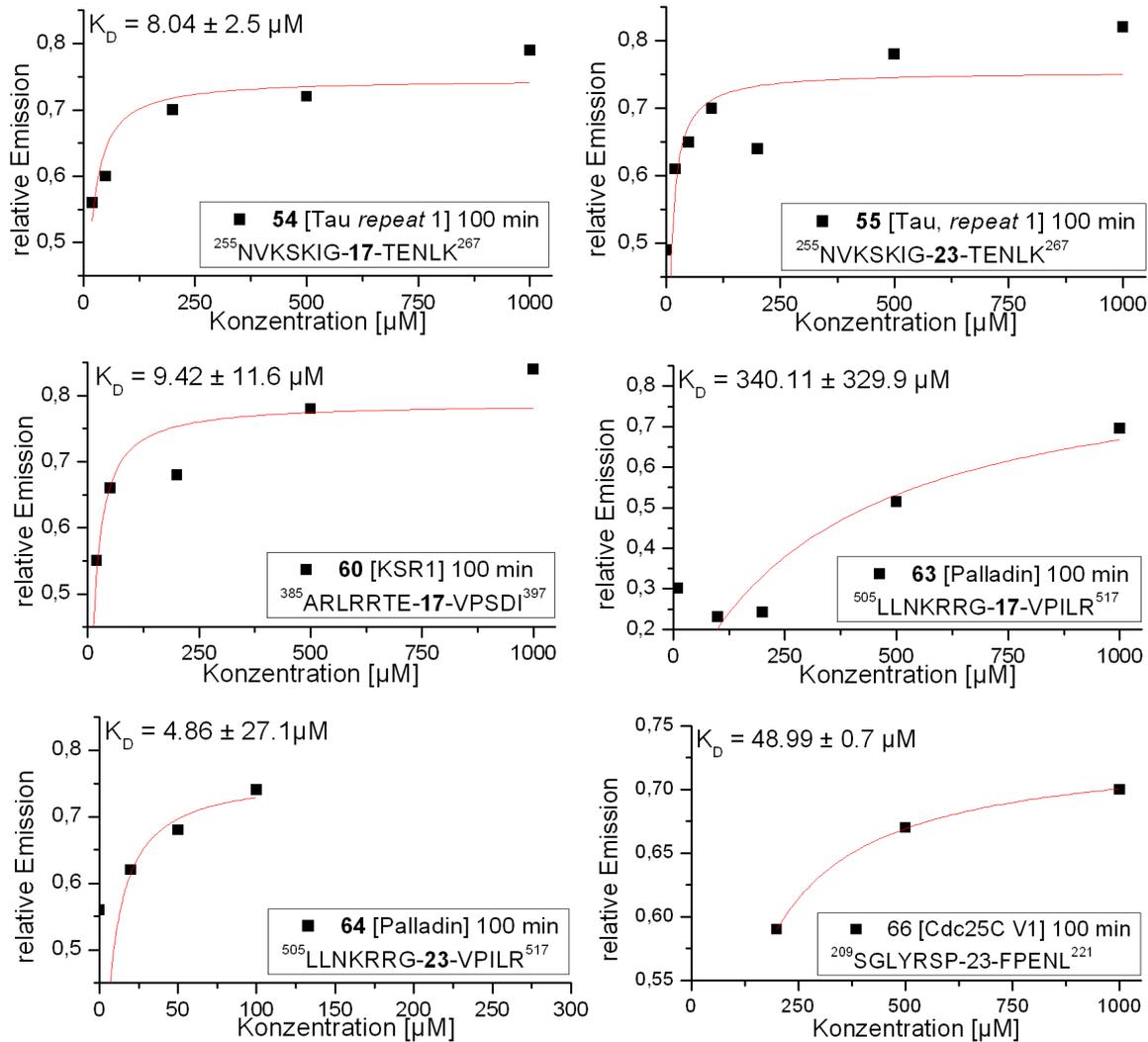


Abbildung 4.9-5: Darstellung der Verhältnisse der von Edukt und Produkt emittierten Wellenlängen, die gegen die Konzentration der entsprechenden Substanzen aufgetragen wurden. Abgesehen von **63** und **66** liegen die ermittelten Werte sehr eng beieinander.

Diese Daten belegen, dass eine Interaktion zwischen MARK und den inhibitorischen Peptiden stattfindet. Eine Differenzierung der Ergebnisse nach unterschiedlicher Sequenz, wie sie in den vorangegangenen Tests festgestellt wurde, trat hier so gut wie nicht auf. Die Peptide **63** (Palladin, **17**) und **64** (Palladin, **23**) lieferten im SPR-Experiment gute  $K_D$ -Werte von etwa 285  $\mu\text{M}$ , während im Radioassay nur ersteres (**63**) eine sehr gute Inhibition bewirkte. Im Rahmen dieses Assays wurde eine entgegengesetzte Staffelung festgestellt, wobei die Ergebnisse schwer zu beurteilen sind, da alle Werte sehr nahe beieinander liegen.

Aus ungeklärten Gründen scheinen die Resultate sehr stark mit den zwingenderweise unterschiedlichen Bedingungen der einzelnen Tests zu schwanken. Immobilisierung, ATP-Gegenwart, Größe und Sequenz des Phosphorylierungs-*targets* scheinen sich auf komplexe Weise auf die Interaktionen von MARK mit den potenziellen Inhibitoren auszuwirken.

## Ergebnisse und Diskussion

Während ATP-induzierte Konformationsänderungen von MARK die Unterschiede zwischen Biacore- und *in vitro*-Experimenten durchaus erklären können, lassen sich die Differenzen zwischen Radio- und FRET-Assay umso schwerer deuten. Temperatur und Zusammensetzung der Reaktionslösung waren identisch, jedoch musste ein anderes Substrat verwendet werden, da die 14-3-3 $\tau$ -Domäne lediglich in der Cdc25C-Sequenz das entsprechende Epitop vorfindet, um die phosphorylierte Aminosäure zu binden.

In allen 3 Testverfahren konnte eine Inhibition von MARK durch die modifizierten Peptide beobachtet werden. Die Charakterisierungen ergeben aber testübergreifend kein eindeutiges Muster. Insgesamt erscheinen die Sequenzen des ersten Tau-*repeats* und des entsprechenden Epitops von Palladin besonders aussichtsreiche Kandidaten für einen erfolgreichen Inhibitor zu sein. Daneben zeigte **66** (Cdc25C V1, **23**) im *in vitro*-Test zusammen mit **63** (Palladin, **17**) mit einer etwa 30 %igen Verminderung des Umsatzes den höchsten Grad an Inhibition. Die Ergebnisse des FRET-Assays zeigen sehr ähnliche Werte für fast alle getesteten Substanzen und lassen sich daher nur schwer in Relation zu den vorangegangenen Ergebnissen setzen.

Um den Effekt der Aminosäuresequenz auf die Spezifität zu überprüfen, wurde die Wirkung der im FRET-Assay getesteten Peptide auf den Umsatz von MARK und GSK3 $\beta$  getestet. Letztere phosphoryliert ebenfalls Tau, aber an anderen Positionen. GSK3 $\beta$  wird ebenso wie MARK durch Hymenialdisine inhibiert und stellt aus diesen Gründen eine ideale Kinase für den Spezifitätstest dar. Als geeignetes einheitliches Substrat für den Test wurde hTau40 verwendet. Mit einer Länge von 441 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 46 kDa entspricht das Protein circa 60 % der Größe des rekombinanten FRET-Substrates. Es beinhaltet sowohl die MARK-Epitope der *repeat*-Regionen als auch die entsprechenden Sequenzabschnitte, die von GSK3 $\beta$  phosphoryliert werden. Dieser Assay wird ebenfalls mit  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]ATP durchgeführt. Für die Auswertung wurde das Reaktionsgemisch einer Gelelektrophorese in 10 %igem SDS-Gel unterzogen, da das phosphorylierte hTau40 beim Abbruch der Reaktion durch Ansäuern ausfällt und außerdem aufgrund seiner Größe nicht in gleichem Maß auf Phosphozellulose haften bleibt wie die im ursprünglichen Radioassay verwendeten kurzen TR1-Peptide. Da das kleine dotierte ATP das Gel sehr schnell passiert, ist die Radioaktivität der 46 kDa-Bande ein Maß für den Umsatz von MARK. GSK3 $\beta$  verfügt über mehrere Phosphorylierungsstellen, und es entstehen mehrere Produkte mit leicht unterschiedlichen Molekulargewichten. Dies lässt sich gut an der Aufspaltung der hTau40-Banden erkennen (siehe Abbildung 4.9-6).

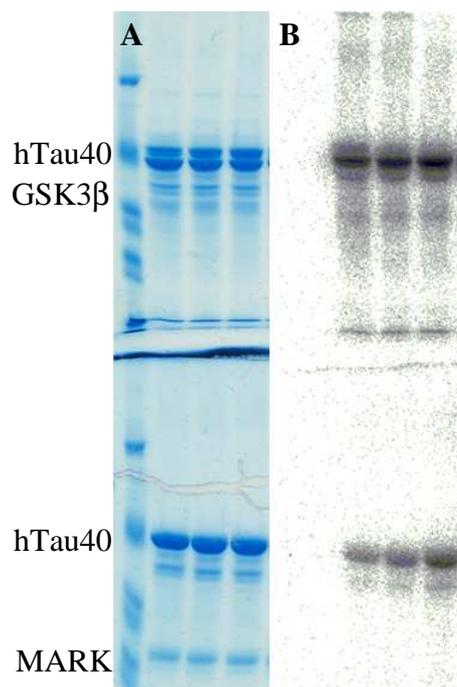


Abbildung 4.9-6: Darstellung der Bestimmung des Kinaseumsatzes durch ein SDS-Gel anhand des Beispiels einer Konzentrationsreihe von **60** (von links nach rechts: Standard, 1 mM, 0.3 mM und 0.1 mM). A zeigt das Gel, nachdem die Reaktionslösung dem elektrischen Feld ausgesetzt wurde. Die Kinasen und hTau40 werden voneinander separiert. B zeigt die zu den Banden gehörige gemessene Radioaktivität.

Ein Szintillationszähler der Firma Raytest (BAS3000) wurde verwendet, um die Gele durch Messung der radioaktiven Zerfallsrate in den entsprechenden Abschnitten des Gels zu analysieren. Auf der rechten Seite von Abbildung 4.9-6 ist die Konzentration der Radioaktivität der Produktbande von hTau40 gut zu erkennen. In den vorangegangenen Tests hatte die Sequenz einen deutlichen Einfluss darauf, wie stark die Interaktion mit MARK beeinflusst werden konnte. Da GSK3β und MARK unterschiedliche Epitope phosphorylieren, ist zu erwarten, dass bisher beobachtete sequenzabhängige Effekte auch hier zum Tragen kommen. Um die Ergebnisse der beiden unterschiedlich schnell arbeitenden Kinasen vergleichen zu können, wurden die Aktivitätsverringerungen prozentual angegeben.

In dieser Variante des Tests konnte für die auf dem ersten Tau-repeat beruhenden Peptide kein nennenswerter Effekt nachgewiesen werden. Die beobachteten und reproduzierbaren 10 % Inhibition bei einer Konzentration von 50 μM, die im Test sämtlicher Peptide festgestellt wurde, konnten mit hTau40 als Substrat nicht bestätigt werden.

## Ergebnisse und Diskussion

Substanz	Sequenz	Herkunft
<b>54</b>	<sup>255</sup> NVSKIG-17-TENLK <sup>267</sup>	Tau, <i>repeat 1</i>
<b>55</b>	<sup>255</sup> NVSKIG-23-TENLK <sup>267</sup>	Tau, <i>repeat 1</i>
<b>60</b>	<sup>385</sup> ARLRTE-17-VPSDI <sup>397</sup>	KSR1
<b>63</b>	<sup>505</sup> LLNKRRG-17-VPILR <sup>517</sup>	Palladin
<b>64</b>	<sup>505</sup> LLNKRRG-23-VPILR <sup>517</sup>	Palladin
<b>66</b>	<sup>209</sup> SGLYRSP-23-FPENL <sup>221</sup>	Cdc25C V1

Tabelle 4.9-3: Übersicht der Peptide, deren inhibitorische Wirkung im Rahmen des Spezifitätstests verwendet wurden.

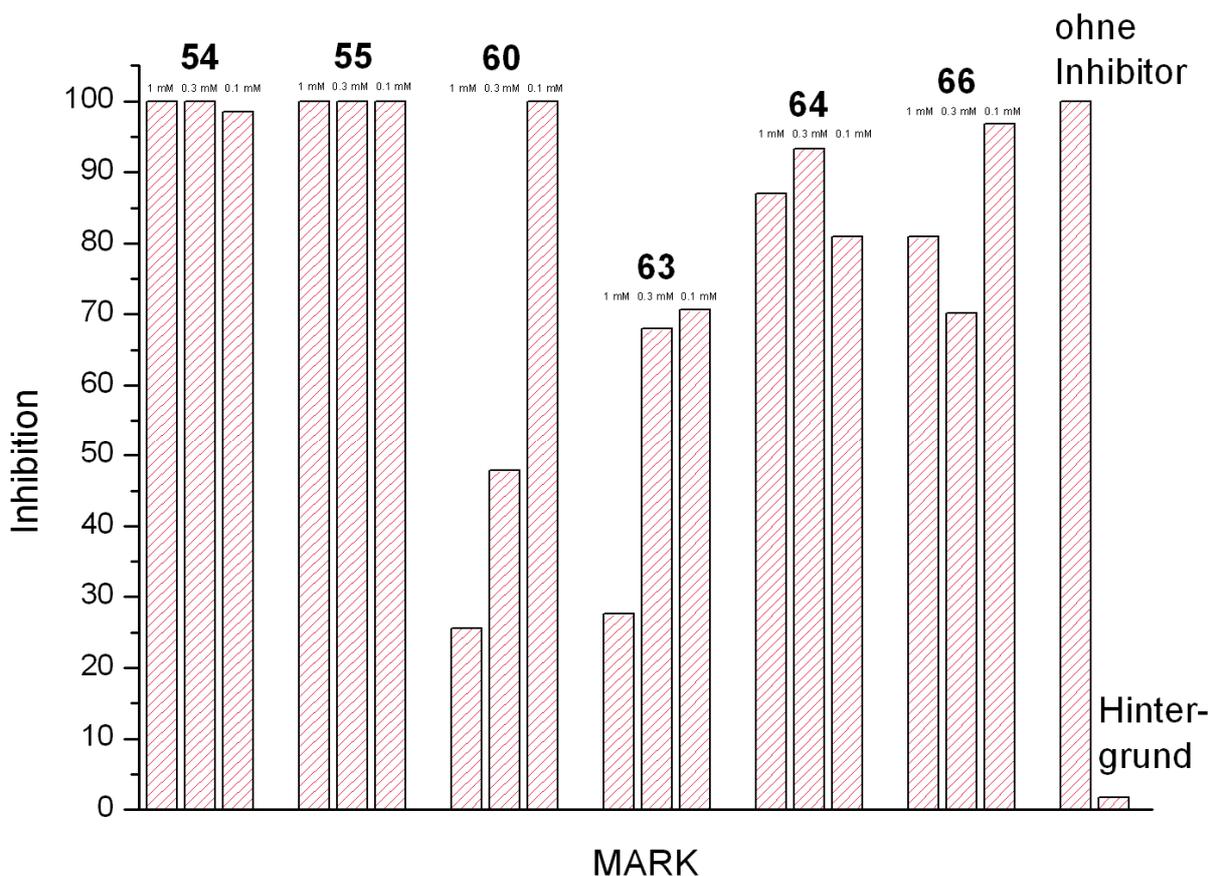


Abbildung 4.9-7: Darstellung des beobachteten Umsatzes von MARK mit hTau40 als Substrat. Von jeder Substanz wurden je drei Konzentrationen vermessen (1, 0.3 und 0.1 mM; in der Grafik von links nach rechts aufgetragen). Für die dem ersten Tau-repeat entsprechenden Peptide konnte keinerlei Wirkung ermittelt werden, während **60** und **63** einen deutlichen Effekt zeigen. **64** und **66** zeigen einen geringen Effekt, der allerdings schlecht mit der Konzentration korreliert.

Analog zu dem vorher durchgeführten FRET-Assay konnte hier ebenfalls für das als Negativprobe ausgelegte **60** (KSR1, **17**) und **63** (Palladin, **17**) eine Konzentrationsabhängigkeit und eine starke Inhibition der Reaktion beobachtet werden. Die um eine CH<sub>2</sub>-

## Ergebnisse und Diskussion

Gruppe im *linker* verlängerte zweite Variante der Palladinsequenz (**64**) zeigt hier einen deutlich geringeren Effekt als sein verkürztes Pendant. Dies entspricht auch dem Ergebnis des ersten Assays mit radioaktiv dotiertem ATP. Dort wurde für **66** (Cdc25C V1, **23**) zusammen mit **63** (Palladin, **17**) die höchste Inhibition der getesteten Substanzen festgestellt, die bei rund 30 % lag. Trotz der hier deutlich höheren vermessenen Konzentrationen konnte der beobachtete Effekt mit hTau40 als Substrat nicht reproduziert werden.

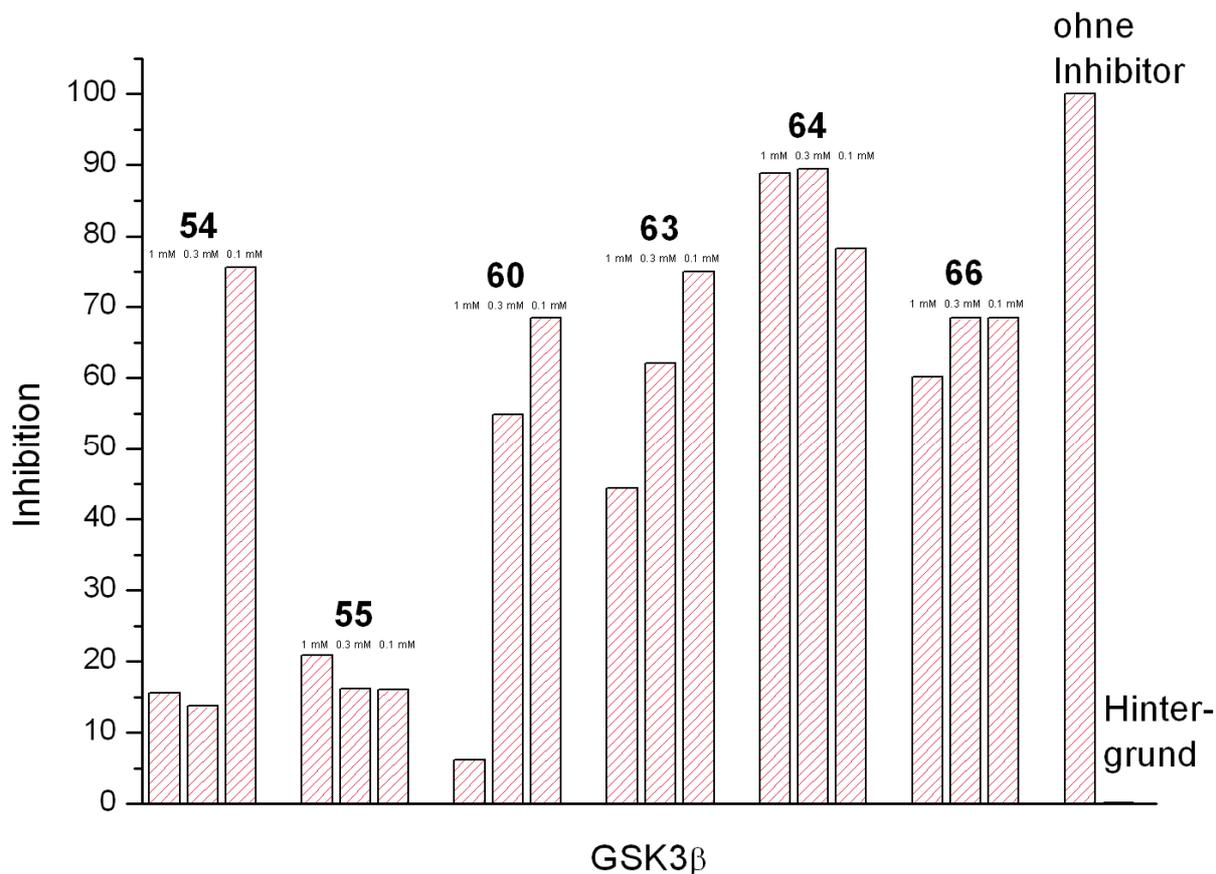


Abbildung 4.9-8: Zu Abbildung 4.9-7 analoge Darstellung der Testergebnisse mit GSK3 $\beta$  als Kinase. Entgegen den Erwartungen sind die hier festgestellten Inhibitionsraten sogar größer als mit MARK.

Der gleiche Versuch mit GSK3 $\beta$  als Kinase zeigt nicht die erwarteten Abstufungen zu MARK. Während **60** (KSR1, **17**), **63** (Palladin, **17**) und **65** (Cdc25C V1, **17**) in etwa die gleichen Auswirkungen bei beiden Kinasen bewirken, zeigen **54** (*repeat 1*, **17**) und **55** (*repeat 1*, **23**) im Gegensatz zum gleichen Experiment mit MARK sogar einen sehr starken Effekt.

Dies widerspricht vollständig den ursprünglichen Erwartungen, die an das Designkonzept der inhibitorischen Peptide gestellt wurde. Zwar konnte eine starke sequenzabhängige Komponente, die die Affinität der Peptide zu beiden Kinasen in hohem Maß beeinflusst,

beobachtet werden, jedoch wies diese keine Spezifität auf. Obwohl MARK und GSK3 $\beta$  unterschiedliche *targets* haben, reichen die verwendeten Sequenzausschnitte nicht aus, um den geplanten Affinitätsunterschied zu bewirken. Eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse könnte ein veränderter Mechanismus sein, der auf das komplexe Substratprotein zurückzuführen sein könnte. Durch das Vorhandensein einer großen Zahl von zusätzlichen Proteinabschnitten im Substrat können zusätzliche Strukturmerkmale in die Interaktion der Bindungspartner eingreifen. Insbesondere die Tatsache, dass GSK3 $\beta$  im Gegensatz zu MARK stark auf die auf dem ersten *repeat* basierenden Peptide **54** und **55** reagiert, widerspricht vollständig den Erwartungen.

Es ist davon auszugehen, dass in allen beobachteten Fällen in erster Linie das Adenin am äußeren Ende der Seitenkette der modifizierten Aminosäure für die beobachteten Effekte verantwortlich ist. Kovalent an das Peptid gebundenes Adenin tritt in Konkurrenz mit dem nativen Substrat ATP und kann einen Teil der Phosphorylierung dadurch verhindern. Anscheinend beeinflusst die Aminosäuresequenz die Struktur in Lösung und damit die Art und Weise, wie Adenin der Kinase präsentiert wird nur geringfügig. Allerdings scheinen diese nicht die Konformation des natürlichen Substrates aufzuweisen. Ansonsten lassen sich die Effekte der verschiedenen Peptide auf GSK3 $\beta$  nicht erklären. Schließlich wird Ser<sup>262</sup> aus dem ersten *Tau-repeat* nicht von GSK3 $\beta$  phosphoryliert und trotzdem wurde ein starker inhibitorischer Effekt bei den auf der entsprechenden Sequenz basierenden Peptiden **54** (*repeat 1, 17*) und **55** (*repeat 1, 23*) beobachtet, während MARK in diesem Assay nicht durch diese Substanzen beeinflusst wurde.<sup>178</sup> Die anderen getesteten Substanzen zeigen mit beiden Kinasen sehr ähnliche Effekte, welche im Falle von GSK3 $\beta$  jedoch etwas stärker ausgeprägt sind.

Auch wenn die unterschiedlichen zu phosphorylierenden Substrate in den vorangegangenen Tests einen großen Einfluss auf die Ergebnisse gehabt hatten, konnte für die auf dem ersten *repeat* (**54/55**) und Palladin (**63/64**) beruhenden Peptide in den meisten Fällen eine inhibitorische Wirkung bestätigt werden. Der Vergleich der beiden Kinasen zeigt allerdings nicht den erwarteten Effekt. Die Spezifität, die durch die Peptidsequenz erzeugt werden sollte, war nicht beobachtbar. Eine mögliche Erklärung könnte es sein, dass die Bindung eines inhibitorischen Peptids nicht die gleiche konformationelle Veränderung in der Kinase induziert wie ATP und dadurch die Ausbildung eines entsprechenden Epitops für das Binden des Peptides ausbleibt bzw. anders verläuft.

## 5 Zusammenfassung

Die genauen Ursachen, die das Absterben von Neuronen im Verlauf der Alzheimer-Erkrankung bewirken, sind immer noch nicht vollständig aufgeklärt. Von entscheidender Bedeutung ist die Tatsache, dass die Hyperphosphorylierung von Tau zum Zusammenbruch des axonalen Transports führt. Dies ist das letzte Glied in der Kette der größtenteils unbekannt Ursachen, an deren Ende das Absterben von Neuronen steht.

Der entscheidende Punkt, der dazu führt, dass der Phosphorylierungsgrad von Tau nicht mehr innerhalb der benötigten Parameter reguliert wird, ist die unnatürlich hohe Aktivität der *microtubule affinity regulating kinase* (MARK). Gelingt es, diese gesteigerte Aktivität zu regulieren, ließe sich der axonale Transport in den Neuronen stabilisieren. Ein spezifischer MARK-Inhibitor wäre dazu in der Lage, die Entstehung des neuronalen Zerfalls zu verlangsamen und könnte den Ausgangspunkt für eine neue Klasse von Medikamenten darstellen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, welche der aus der Literatur bekannten Zielsequenzen von MARK am stärksten an die Kinase binden. Die im Rahmen der SPR-Experimente erhaltenen Daten zeigten Bindungskonstanten zwischen 1.37 (**1**, KSR1, <sup>387</sup>LLRTEVS<sup>393</sup>) und 3.09 mM (**3**, PTPH1, <sup>387</sup>LLRTEVS<sup>393</sup>). Die kinetische Auswertung lieferte deutlich niedrigere  $K_D$ -Werte zwischen 0.013 (**4**, *repeat 1*, <sup>257</sup>KSKIGST<sup>263</sup>) und 0.057 mM (**2**, Cdc25C, <sup>211</sup>LYRSPSM<sup>217</sup>). Große Differenzen in der Affinität konnten in der Untersuchung der vier *repeat*-Regionen des Tauproteins festgestellt werden. Die Verlängerung der ursprünglichen Sequenz um drei Aminosäuren am *N*-Terminus bewirkte bei den auf dem ersten und vierten *repeat* beruhenden Peptiden **8** (*repeat 1*, <sup>254</sup>KNVSKIGST<sup>263</sup>) und **11** (*repeat 4*, <sup>348</sup>DRVQSKIGSL<sup>357</sup>) eine Affinitätssteigerung von 2.06 (**4**, *repeat 1*, <sup>257</sup>KSKIGST<sup>263</sup>) bzw. 1.47 mM (**5**, *repeat 2*, <sup>288</sup>KSKCGST<sup>294</sup>) auf einen  $K_D$ -Wert von 0.14 (**8**, *repeat 1*, <sup>254</sup>KNVSKIGST<sup>263</sup>) bzw. 0.29 mM (**11**, *repeat 4*, <sup>348</sup>DRVQSKIGSL<sup>357</sup>). Die beiden inneren *repeats* (**9**, **10**) zeigten keine entsprechende Wirkung der weiteren Aminosäuren. Zusätzlich wurde der Effekt der Phosphorylierung auf die Bindungseigenschaften untersucht. Die zu **4** (*repeat 1*, <sup>257</sup>KSKIGST<sup>263</sup>) und **5** (*repeat 2*, <sup>288</sup>KSKCGST<sup>294</sup>) analogen phosphorylierten Peptide **6** (*repeat 1*, <sup>257</sup>KSKIG-S(PO<sub>4</sub>)-T<sup>263</sup>) und **7** (*repeat 2*, <sup>288</sup>KSKCG-S(PO<sub>4</sub>)-T<sup>294</sup>) zeigten eine deutliche Verringerung der Affinität um Faktor 2 (**6**, *repeat 1*, <sup>257</sup>KSKIG-S(PO<sub>4</sub>)-T<sup>263</sup>) bzw. 1.5 (**7**, *repeat 2*, <sup>288</sup>KSKCG-S(PO<sub>4</sub>)-T<sup>294</sup>). Dies beweist, dass die Zielsequenzen der Kinase nach erfolgter Umsetzung zum Produkt leicht durch neues Substrat verdrängt werden können.

## Zusammenfassung

Die Röntgenkristallstrukturen von MARK zeigen inaktive Konformationen des Proteins. Während der Kristallisierung dimerisieren je zwei Kinasen über den regulatorischen *loop* miteinander, wodurch dieser die Kavität versperrt. Aus dem Vergleich der Strukturen 2HAK und 1Y8G ging hervor, dass die Aminosäuren Lys<sup>190</sup> bis Pro<sup>214</sup> den Hauptteil der regulatorischen Schleife ausmachen, da sie so flexibel waren, dass sie in 1Y8G nicht aufgelöst werden konnten. Die Struktur ohne den flexiblen Bereich wurde verwendet, um ATP und ein Peptid nacheinander in die Kavität zu *docken*. Zuvor wurde die Nukleotidbindungstasche mit Hilfe der SYBYL-Routine *siteID find pockets* identifiziert, wobei Strukturen anderer Kinasen als Referenz verwendet wurden.

Die resultierende Geometrie zeigte eindeutig den Bereich, in dem die fehlenden Aminosäuren des *loops* im Inneren der Kavität verlaufen mussten. Diese wurden anschließend manuell in das Protein eingeführt. Auf diese Art und Weise wurden drei Modelle kreiert, die sich in erster Linie im Verlauf der Schleife außerhalb der Kavität unterschieden. Sie spiegeln wieder, wie sich der *loop* beim Herausfallen aus dem Protein bewegen könnte. Im Inneren der Bindungstasche waren die Unterschiede zwischen den Modellen noch gering. In der Peripherie, wo kaum Wechselwirkungen zwischen Protein und dem wachsenden *loop* gegeben waren, zeigten die Modelle in zunehmendem Maß energetische Unterschiede zu den nativen Vergleichsstrukturen.

Der grundsätzliche Verlauf der modellierten *loops* deckte sich mit denen verschiedener nativer Kristallstrukturen. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die Modelle ein gutes Abbild der aktiven Konformation von MARK wiedergaben. Die auf diese Weise erarbeitete Geometrie der *binding site* wurde genutzt, um im Modell verschiedene *linker* zwischen den gebundenen Substraten zu etablieren. Diese überbrückten den Abstand zwischen dem *backbone* des gebundenen Peptids und dem N9 des Adenins unter Berücksichtigung der ermittelten Geometrie. Aus den anschließenden Synthesearbeiten resultierten zwei Aminosäureanaloge (**17** und **23**), die erfolgreich in der Festphasensynthese eingesetzt wurden.

Die Peptide wurden mit einer Länge von 13 Aminosäuren synthetisiert, wobei sich die mit der modifizierten Aminosäure an Position acht befand. Diese Wahl wurde vor dem Hintergrund getroffen, dass die Peptide dazu in der Lage sein sollten, den vollständigen frontalen Bereich der Kinase abzudecken. Die Ergebnisse der SPR-Studien zeigten, dass die meisten Verbindungen keine nennenswerte Affinität zur Kinase aufwiesen. Die Peptide **55** (*repeat 1*, <sup>255</sup>NVKSIG-**23**-TENLK<sup>267</sup>), **63** (Palladin, <sup>505</sup>LLNKRRG-**17**-VPILR<sup>517</sup>) und **64**

## Zusammenfassung

(Palladin, <sup>505</sup>LLNKRRG-**23**-VPILR<sup>517</sup>) dagegen zeigten gute Bindungseigenschaften. Neben der SPR-Analyse wurde ein Kinase-Assay angewendet, um die Wirkung der Substanzen *in vitro* zu charakterisieren. Die Resultate deckten sich nur teilweise mit denen der SPR-Versuche. **63** (Palladin, **17**) und **66** (Cdc25C V1, <sup>209</sup>SGLYRSP-**23**-FPENL<sup>221</sup>) zeigten mit einer Inhibitionsrate von rund 30 % den stärksten Effekt auf den Umsatz von MARK. Allerdings wurde für das zu **63** (Palladin, **17**) analoge **64** (Palladin, **23**), welches in den SPR-Experimenten eine stärkere Affinität zu MARK als **63** (**63**: 350 bzw. **64**: 230  $\mu$ M) gezeigt hat, keinerlei Effekt festgestellt. Das *in vitro* sehr effiziente **66** (Cdc25C V1, **23**) wiederum zeigte im Biacore keine Affinität zu MARK.

Diese Substanzen wurden zusätzlich einem FRET-Assay unterzogen, deren Substrat eine photometrische Verfolgung der Reaktion erlaubte. Die im ersten Test sehr effizienten Inhibitoren **63** (Palladin, **17**) und **66** (Cdc25C V1, **23**) zeigten hier mit  $K_D$ -Werte von 49 (**66**) bzw. 340  $\mu$ M (**63**) schlechtere Affinität als die anderen Peptide, deren Werte alle zwischen 4.9 (**64**) und 9.4 (**60**)  $\mu$ M lagen. Allerdings wurde in diesem Assay auch für **60** (KSR1, <sup>385</sup>ARLRTE-**17**-VPSDI<sup>397</sup>), welches aufgrund seiner geringen Affinität im SPR-Test als Negativkontrolle gewählt wurde, ein  $K_D$ -Wert von 9.42  $\mu$ M ermittelt.

Die drei unterschiedlichen Testverfahren lieferten keine übereinstimmenden Ergebnisse. Während im SPR-Experiment ein System im stetigen Fluss und mit einem anderen Puffersystem verwendet wurde, war der einzige Unterschied in den Kinase-Assays das zu phosphorylierende Substrat. Fest steht, dass die synthetisierten Substanzen durchaus inhibitorisches Potential aufwiesen, wobei die Ergebnisse je nach Testmethode zum Teil deutliche Abweichungen zeigten. In allen Tests schienen die auf dem Protein Palladin beruhenden Peptide besonders effiziente Binder zu sein, auch wenn sie im FRET-Assay ähnliche Werte lieferten, wie die anderen Substanzen.

Um zusätzliche Daten in Bezug auf die Spezifität der inhibitorisch wirksamen Peptide zu erhalten, wurde ein weiterer auf radioaktiv dotiertem ATP basierender Assay durchgeführt. Als Vergleichskinase fiel die Wahl auf GSK3 $\beta$ , welche wie MARK ebenfalls Tau phosphoryliert, allerdings an anderen Positionen. Der Vergleich der Aktivitätsverringerungen der Kinasen zeigte, dass alle getesteten Substanzen einen stärkeren Effekt bei GSK3 $\beta$  zeigten als bei MARK.

Zusammenfassend konnten das Design und die Synthese eines inhibitorisch wirksamen Moleküls erfolgreich umgesetzt werden. Insbesondere die auf dem Protein Palladin beruhenden Peptide zeigten hohe Affinitäten im SPR-Experiment und bis zu 30 %

## Zusammenfassung

Verringerung der Kinaseaktivität bei der Übertragung von radioaktivem Phosphat auf das Peptidsubstrat TR1 ( $^{255}\text{NVKSKIGSTENLK}^{267}$ ). Allerdings schwanken die Ergebnisse bei verschiedenen Assays zum Teil recht stark. Jedoch zeigte der Vergleich von MARK und GSK3 $\beta$  dass die erhoffte Spezifität der Konstrukte nicht im gewünschten Maß realisiert werden konnte. Zwar bewirken unterschiedliche Aminosäuresequenzen unterschiedliche Inhibitionsraten bei beiden Kinasen, jedoch konnte keine MARK-spezifische Wirkung festgestellt werden.

## 6 Summary

The molecular cause which leads to the clinical picture called Alzheimer is in most instances unknown. One final incident of this chain of events is the collapse of axonal transport. The crucial point here is that hyperphosphorylation of tau causes the development of neurofibrillary tangles and as consequence the microtubuli loose their stability. The critical shortage of essential substances in the synapse causes a complete breakdown of the cell. The event that leads to the tangles is the high degree of phosphorylation caused by an overactive *microtubule affinity regulating kinase* (MARK). A specific inhibitor against MARK that downregulates the hyperactivity would be able to stabilize axonal transport in neurons. This could lead to a new class of drug for the treatment of Alzheimer's disease.

The first part of this work deals with SPR-experiments which should reveal the optimal sequence for MARK to bind. The peptides were based on different targets of MARK and showed binding constants between 1.37 (**1**, KSR1) and 3.09 mM (**3**, PTPH1). The analysis of the data by their kinetics revealed constants between 0.013 (**4**, *repeat 1*) and 0.057 mM (**2**, Cdc25C). A closer look at the repeats showed that the outer repeats benefit from an *N*-terminal elongation of three amino acids while this effect is near zero concerning the inner ones (**9**, **10**). The first and the fourth repeat showed affinities of 0.14 (**8**, *repeat 1*) and 0.29 mM (**11**, *repeat 4*). To have a closer look at the effect of phosphorylation two phosphopeptides have been synthesized. The phosphorylated analogues of **4** (*repeat 1*) and **5** (*repeat 2*; **6** and **7**) showed a twofold decrease in affinity. This proves that the products are easily replaced by new educts.

Every available crystal structures of MARK showed inactive conformations. During the event of chrySTALLISATION the kinases dimerized with the regulatory loop as main dimerization area. This event positions the loop in front of the cavity and therefore no substrate can enter the active site. A comparison between the structures 2HAK and 1Y8G revealed that the amino acids Lys<sup>190</sup> to Pro<sup>214</sup> were the main part of the regulatory loop. In the structure 1Y8G they were so flexible that their positions could not be extrapolated from the crystallographic data. The structure without the loop was used to dock nucleotide and peptide one after the other into the cavity after the nucleotide binding site has been enlightened by the routine *siteID find pockets* using other kinase-structures for comparison. The resulting geometry showed the space where the loop has to go through. Subsequently the missing amino acids have been filled in manually. This technique was used to create three different models of MARK which

## Summary

simulate the process of the loop folding outwards and clearing the entry to the binding site. Inbetween the cavity, the models are very similar. But in the peripheral area where very little contact between loop and the rest of the protein is given differences show up. The comparison of the models with native crystal structures revealed that the artificial kinases show a different energetic behavior. Instead of reaching lower energy values with every additional amino acid the models exhibit a slight increase which becomes bigger when the loop reaches the outer area of the protein.

The theoretical progression of the artificial loops harmonises with the ones seen in native structures of other kinases. Therefore the models can be considered as best possible functional model of MARK. The geometry of the binding site was used to create different linkers between the backbone of the substrate and N9 of Adenine. The organic synthesis leads to two different amino acid analogues (**17**, **23**) which were successfully used in solid phase peptide synthesis.

The chosen length of the peptides was 13 amino acids because this length fits perfectly with the complete forefront of MARK. Most of the substances didn't show noteworthy affinities in SPR-studies. In contrast the peptides **55** (*repeat 1*, **23**), **63** (Palladin, **17**) and **64** (Palladin, **23**) showed a relatively high affinity between 230 (**64**) and 650 (**55**)  $\mu\text{M}$  towards the kinase. An *in vitro* assay with radioactive dotated ATP was used as second method to characterise the potential inhibitors. The results differed from the ones of the SPR-experiments. **63** (Palladin, **17**) and **66** (Cdc25C V1, **23**) showed the ability to reduce the metabolic rate of MARK by 30 %. Though the homologue to **63** (Palladin, **17**; **64**), which had an even higher affinity in the Biacore-experiments (**63**: 350 respectively **64**: 230  $\mu\text{M}$ ) than **63** (Palladin, **17**) didn't show any inhibition here. **66** (Cdc25C V1, **23**) as most effective *in vitro* inhibitor showed no SPR-activity.

To get another look on the inhibitory effect a second version of the assay has been conducted. A special recombinant substrate allowed the photometric monitoring of the kinase performance. The effective inhibitors **63** (Palladin, **17**) and **66** (Cdc25C V1, **23**) showed  $K_D$ -Values of 49 (**66**) respectively 340  $\mu\text{M}$  (**63**). But the other peptides which were supposed to show inferior affinities gave constants between 4.9 (**64**) and 9.4 (**60**)  $\mu\text{M}$ .

The data of three different test procedures led to divergent results. While the SPR-experiment worked with a constant flow and another buffer-system the assays just differed in their substrates. The peptides which had been synthesized with the amino acid analogues **17** and **23**

## Summary

showed definitely inhibitory potential even it differs between the varying tests. Especially the Palladin-based peptides seemed to be effective inhibitors.

To get data concerning the specificity of the inhibitory effects which are difficult to characterize a comparison with GSK3 $\beta$  has been conducted. This choice was made because both, MARK and GSK3 $\beta$ , share Tau as target but recognize different phosphorylation-sites. The results were not as promising as anticipated. The effects on GSK3 $\beta$  seemed to be even more intense than the ones on MARK.

In summary the concept of design and synthesis of inhibitory peptides could be carried out successfully. Besides different results in the applied test procedures have been observed. The verification of the specificity indicated that the used peptide-sequences did not show the estimated effect of specific binding.

## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Verwendete Chemikalien

Hersteller	Chemikalien
ABCR	3-Brompropansäure 4-Brombutansäure 5-Brompentansäure
Acros Organics	Acetonitril (HPLC-Grade) Tri- <i>iso</i> -propylsilan
Amersham Pharmacia Biotech Applied Biosystems	ATP ( $\gamma$ -[ <sup>32</sup> P], 7.4 Mbq/mol) DIPEA Piperidin
Biacore	Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz <i>Biadesorb Solution 1</i> <i>Biadesorb Solution 2</i> <i>Bia Normalize Solution</i> EDC Ethanol Na-Acetatpuffer NHS
Deutero	CDCl <sub>3</sub> (99,8 %) D <sub>2</sub> O (99,9 %) DMSO-d <sub>6</sub> (99,8 %)
Fluka	Ethylacetat (abs.) Dimethylformamid (abs.) n-Hexan (abs.) Methanol (abs.) Tetrahydrofuran (abs.)
Hewlett Packard IRIS Biotech	<i>ES Tuning Mix</i> Di- <i>iso</i> -propylethylamin Dimethylaformamid Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz Fmoc-L-Ala-OH Fmoc-L-Arg-OH Fmoc-L-Asn-OH Fmoc-L-Asp-OH Fmoc-L-Cys-OH Fmoc-L Gln-OH Fmoc-L Glu-OH Fmoc-L-Gly-OH Fmoc-L-His-OH Fmoc-L-Ile-OH

## Experimenteller Teil

Merck KG

Sigma-Aldrich

Fmoc-L-Leu-OH  
Fmoc-L-Lys-OH  
Fmoc-L-Phe-OH  
Fmoc-L-Pro-OH  
Fmoc-L-Ser-OH  
Fmoc-L-Thr-OH  
Fmoc-L-Tyr-OH  
Fmoc-L-Val-OH  
HATU  
TBTU  
Acetanhydrid  
Aceton  
Ammoniumhydrogencarbonat  
Calciumchlorid  
Chloroform  
 $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure  
Dichlormethan  
Diethylether  
Dinatriumhydrogenphosphat  
Dithranol  
Ethanol  
Ethylacetat  
Hydrazinhydrat  
Kaliumdihydrogenphosphat  
Kupferspäne  
Magnesiumsulfat  
Methanol  
Natriumacetat  
Natriumchlorid  
Natriumhydrid  
2-Propanol  
Pyridin  
Toluol  
Trichloressigsäure  
Trifluoressigsäure  
Tris-HCl  
2,5-Dihydroxybenzoesäure  
Benzylalkohol

## 7.2 Verwendete Geräte und Materialien

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Fraktionssammler	FC205 <i>Fraction Collector</i>	Gilson
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2, Alpha 1-4	Christ
HPLC	Biocad 700E Perfusion	BioCAD
	Merck/Hitachi LaChrom L-7000-Serie	VWR International
MALDI-TOF-MS	Biflex III	Bruker Daltonics
Mikrowellen-Reaktor	<i>Discover</i>	CEM
Mikrowellen-Synthesizer	<i>Liberty</i>	CEM
NanoDrop	ND-1000	Peqlab
NMR 500	DRX500, $\nu_L (^1\text{H}) = 499.87 \text{ MHz}$	Bruker Biospin
	Inverser 5 mm	
	Tripleresonanzprobenkopf	
NMR 700	Avance 700, $\nu_L (^1\text{H}) = 700.13 \text{ MHz}$	Bruker Biospin
	Inverser 5 mm Tripleresonanz- <i>cryoprobe</i>	
NMR-Probenröhrchen	3 mm , 5 mm Typ 502 & Typ 507	Hilgenberg, Norell
Parallelsyntheseroboter	ACT MOS $\Omega$ 469	Advanced Chem Tech
Photometer	UV-160 A	Shimadzu
	Safire	Tecan
Reinstwasseranlage	SG Ultra Clear UV 18.2 M $\Omega$	SGwater
Rotationsverdampfer	Laborata 4000 - efficient	Heidolph
RP-Säule (analytisch)	EC 250/4 Nucleodur C18 Pyramid	Macherey und Nagel
RP-Säule (präparativ)	VP 250/21 Nucleodur C18 Pyramid	Macherey und Nagel
RP-Säule (semi-präparativ)	218TP510	Vydac
Sensorchip	CM5	Biacore
SpeedVac	Savant SC110	Thermo Electron
Software	ISIS Draw	Symyx Solutions
	Illustrator CS2	Adobe
	Office 2003	Microsoft
	Origin Pro 7.5	Origin Labs
Software (MS)	Xmass 4.1, flexControl 3.0	Bruker Daltonics
Software (MMO)	SYBYL 7, SYBYL 8	Tripos
Software (NMR)	Topspin 1.3, Topspin 2.1	Bruker Biospin
Software (Safire)	XFluor4 V 4.40	Tecan
Software (SPR)	BIA-Eval 3.0	Biacore
Spin Tubes	Spin-X (0.22 $\mu\text{m}$ Celluloseacetat)	CoStar
	Spin-X (0.22 $\mu\text{m}$ Nylon)	
SPR	T100	Biacore
Szintillationszähler	BAS3000	Raytest
Ultraschallbad	Sonorex Super, RK512H	Bandelin
UNIX-Workstations	Octane, Octane 2	Silicon Graphics
UV/Vis Spektrometer	UV-160A	Schimadzu Corp.
Zentrifugen	5084, 5417C, 5417R, Megafuge 1.0R	Eppendorf, Heraeus

## 7.3 Peptidsynthesen

### 7.3.1 Automatisierte Festphasenpeptidsynthese

Die automatisierte Peptidsynthese an festen Phasen wurde mit 2 verschiedenen Geräten durchgeführt. Die Grundprinzipien der Synthese sind in beiden Fällen identisch, jedoch unterscheiden sich die Geräte in der Art und Weise, wie die einzelnen Reaktionen durchgeführt werden.

An einem ACT MOS  $\Omega$  469 der Firma Advanced Chemtech lässt sich eine Vielzahl von Peptiden in einem Parallelsyntheseverfahren aufbauen. Hierzu werden der Ansatzgröße entsprechende Mengen Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz eingewogen und in die entsprechenden Kammern im Reaktionsblock gefüllt. Nach einer Quellprozedur, die dafür sorgt, dass das Harz eine maximale Oberfläche erreicht, beginnt die eigentliche Synthese der Peptide. Fmoc-geschützte L-Aminosäuren, deren Seitenketten orthogonal zur Aminogruppe geschützt sind, wenn sie eine funktionelle Gruppe besitzen, werden in vierfachem Überschuss auf das Harz gegeben. Als Aktivator dient TBTU (0.5 M in DMF) in Gegenwart der Base DIPEA (1.0 M in DMF), beide Substanzen werden in fünffachem Überschuss eingesetzt. Die Kupplungen der einzelnen Aminosäuren werden jeweils dreimal mit Kupplungszeiten von 30, 60 bzw. 90 Minuten durchgeführt. Aminogruppen, die nicht reagiert haben, werden durch Acetanhydrid (10 % in DMF) acetyliert, wodurch die Entstehung von Deletionspeptiden unterbunden wird. Um den nächsten Reaktionszyklus einleiten zu können, wird anschließend die Fmoc-Gruppe der neu eingeführten Aminosäure mittels Piperidin (20 % in DMF) abgespalten.

Die Kombination des Mikrowellenreaktors *Discovery* mit dem Syntheseaufsatz *Liberty* der Firma CEM ermöglicht den zeitsparenden Aufbau einzelner Peptide nacheinander. Das Syntheseprinzip ist identisch mit dem oben erläuterten, nur werden hier nicht viele Peptide gleichzeitig, sondern einzelne Sequenzen sehr schnell nacheinander synthetisiert. Die Verwendung der Mikrowellenstrahlung beschleunigt alle an den Reaktionszyklen beteiligten Schritte und verringert Zeitaufwand und Chemikalienbedarf deutlich. Die Reagenzien, Lösungsmittel und Konzentrationen sind identisch mit den oben erwähnten Parametern, jedoch liefert eine einzelne Kupplung eine ausreichende Ausbeute. Lediglich das sterisch sehr anspruchsvolle Arginin wird über eine Zweifachkupplung an das Harz geknüpft. Hierfür werden Aminosäure, Aktivator und Base auf das Harz gegeben und im Reaktorgefäß 300 Sekunden bei 75 °C mit einer Leistung von 25 Watt mit Mikrowellen bestrahlt. Die

Acetylierung wird innerhalb von 30 Sekunden bei 65 °C und einer Einstrahlleistung von 65 Watt erreicht, die Abspaltung der Fmoc-Gruppe erfolgt in 30 Sekunden bei 75 °C und 35 Watt.

Die Synthese erfolgt vom C- zum N-Terminus, wobei die Fmoc-Gruppe der letzten Aminosäure nicht automatisch entfernt wird. Die manuelle Abspaltung der Schutzgruppe unter definierten Bedingungen ermöglicht eine photometrische Bestimmung der Gesamtkupplungsausbeute (siehe Abschnitt 7.3.4).

### 7.3.2 Manuelle Kupplung von Aminosäuren

Die Synthese sehr kurzer Peptide und einige Kupplungstests mit den synthetisierten inhibitorischen Aminosäurebausteinen wurden manuell durchgeführt.

Hierzu werden 20 µmol PAL-PEG-PS-Harz in DMF vorgequollen, die Fmoc-Gruppe mit Piperidin (20 % in DMF) abgespalten und anschließend eine Mischung aus Fmoc-Aminosäure (80 µmol in 150 µL DMF), TBTU (100 µmol in 250 µL DMF) und DIPEA (100 µmol, 18 µL) dazugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 90 Minuten wird die Reaktionslösung vom Harz gewaschen und mit Acetanhydrid (10 % in DMF, 500 µL) acetyliert. Anschließend erfolgt die photometrische Bestimmung der Kupplungsausbeute (siehe Abschnitt 7.3.3) und gegebenenfalls ein erneuter Reaktionszyklus. Sind bei Peptiden andere Mengen angegeben, sind die hier genannten Mengen den Verhältnissen entsprechend variiert.

### 7.3.3 Photometrische Bestimmung der Kupplungsausbeute

Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe in definierter Verdünnung ermöglicht die photometrische Bestimmung der Kupplungsausbeute. Hierzu werden unter Lichtausschluss 2 mL Piperidin (10 % in DMF) auf das Harz gegeben, nach 15-minütigem Schütteln in einen Kolben überführt und mit 8 mL DMF nachgespült. Dieser Vorgang wird wiederholt. Für jede der 3 Messungen werden 100 µL dieser Lösung zu 1900 µL DMF gegeben. Anschließend wird in einer Glasküvette die Extinktion bei 301 nm vermessen. Die theoretische Ausbeute lässt sich aus dem Mittelwert der 3 einzelnen Messungen bestimmen und wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Stoffmenge } [\mu\text{mol}] = \frac{\text{Extinktion} * \text{Verdünnung} * \text{Volumen}}{\text{Extinktionskoeffizient}_{\text{Methylenfluoren}}} \left[ \frac{\mu\text{L}}{\text{L/mol}} \right]$$

*Gleichung 7.1: Aus Extinktion, Verdünnung und dem Extinktionskoeffizienten lässt sich die Anzahl der freien Aminogruppen am Harz nach der Abspaltung berechnen.*

### 7.3.4 Abspaltung der Peptide von der Festphase

Nach dem Waschen des Harzes mit Isopropanol und Dichlormethan wird das synthetisierte Peptid abgespalten. Hierzu wird das Harz mit der Abspalllösung bedeckt, welche aus TFA, TIPS und Wasser im Verhältnis 95:5:2 besteht. Nach 60-minütigem Schütteln wird die Lösung im Wasserstrahlvakuum abgesaugt und das Harz fünfmal mit TFA nachgespült. Dieser Vorgang wird wiederholt und die vereinigten Fraktionen werden im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der verbliebene Rückstand wird in bidestilliertem Wasser mit Hilfe von Ultraschall suspendiert und gefriergetrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt wird anschließend mittels HPLC gereinigt.

### 7.3.5 Reinigung der Peptide mittels RP-HPLC

Zur Aufreinigung der lyophyllisierten Rohprodukte wurde eine *BioCad Sprint 700E*-HPLC-Anlage der Firma *Applied Biosystems* verwendet, die mit einer *VP 250/21 Nucleodur C18 Pyramid*-Säule als fester Phase bei einer Flussrate von 20 ml/min betrieben wurde. Als Laufmittel dienten Wasser und Acetonitril, welche zwecks gleichmäßiger Protonierung der Substanzen 1 % TFA enthielt. Das Wasser wurde mit einer *SG Ultra Clear UV 18.2 MΩ*-Anlage der Firma *SGwater* entmineralisiert und ebenso wie das verwendete Acetonitril (*HPLC-Grade*) im Ultraschallbad entgast. Das Laufmittelsystem bestand aus Eluent A (Wasser + 5 % Acetonitril + 0,1 % TFA) und Eluent B (Acetonitril + 5 % Wasser + 0,1 % TFA), die zur Erzeugung der Trennungsgradienten verwendet wurden. Je 40 mg des zu reinigenden Rohproduktes werden unter Zuhilfenahme von Ultraschall in 1000 µL Laufmittel suspendiert, dessen Zusammensetzung dem Anfangsgradienten der jeweiligen Trennung entspricht. Unlösliche Bestandteile werden durch eine zehnmünütige Zentrifugation bei 14.000 U/min durch Verwendung eines *Spin-Tubes* (Filter aus Celluloseacetat oder Nylon, Porengröße: 0.22 µm) abfiltriert. Für analytische Läufe wurde jeweils 1 mg Substanz in 100 µL Laufmittel über eine *EC 250/4 Nucleodur C18 Pyramid*-Säule bei einer Flussrate von 1 ml/min eluiert.

## Experimenteller Teil

*Tabelle 7.3-1: Syntheseparameter der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten und untersuchten Peptide.*

Substanz	Molare Masse [u]	Ansatzgröße [μmol]	Harzmenge [mg]	Rohausbeute [mg]	Ausbeute nach Fmoc-Wert [%]	Ausbeute nach HPLC [mg]*
<b>1</b>	815.98	28	150	76	81	7.9 (35 %)
<b>2</b>	852.03	28	150	49	80	9.2 (39 %)
<b>3</b>	847.06	28	150	41	80	8.3 (35 %)
<b>4</b>	718.86	28	150	21	69	6.6 (32 %)
<b>5</b>	708.84	28	150	27	65	12.6 (56 %)
<b>6</b>	800.85	50	268	18	58	2.4 (5 %)
<b>7</b>	790.84	50	268	16	52	2.1 (5 %)
<b>8</b>	1060.27	20	32	44	65	5.0 (23 %)
<b>9</b>	1036.18	20	32	29	90	3.2 (15 %)
<b>10</b>	996.16	20	32	26	71	2.8 (14 %)
<b>11</b>	1101.28	20	32	46	77	4.6 (21 %)
<b>46</b>	1416.65	50	69	154	76	4.1 (22 %)
<b>47</b>	1523.79	50	69	155	85	8.6 (44 %)
<b>48</b>	1449.66	50	69	195	100	4.8 (32 %)
<b>49</b>	1498.72	50	69	187	100	11.7 (3 %)
<b>50</b>	1429.65	50	69	191	98	3.1 (21 %)
<b>51</b>	1520.19	50	69	176	98	11.6 (67 %)
<b>52</b>	1465.64	50	69	228	100	8.3 (65 %)
<b>53</b>	1506.74	50	69	146	96	16.7 (81 %)
<b>42</b>	733.88	50	69	122	40	14.0 (46 %)
<b>43</b>	747.91	50	69	116	31	14.9 (50 %)
<b>44</b>	851.97	50	69	98	40	11.9 (40 %)
<b>45</b>	866.00	50	69	91	43	12.1 (40 %)
<b>54</b>	1660.95	50	69	200	75	3.2 (19 %)
<b>56</b>	1978.09	50	69	201	48	6.0 (30 %)
<b>58</b>	1693.96	50	69	100	57	7.4 (22 %)
<b>60</b>	1743.02	50	69	189	77	3.1 (17 %)
<b>62</b>	1673.95	50	69	174	65	1.5 (78 %)
<b>63</b>	1765.20	50	69	178	58	7.0 (35 %)
<b>65</b>	1709.94	50	69	226	42	13.1 (87 %)
<b>67</b>	1751.04	50	69	155	46	8.6 (38 %)
<b>55</b>	1674.98	50	69	218	26	2.8 (18 %)
<b>57</b>	1782.12	50	69	164	35	5.7 (26 %)
<b>59</b>	1707.99	50	69	211	27	4.5 (28 %)
<b>61</b>	1757.05	50	69	199	31	10.6 (60 %)
<b>64</b>	1779.23	50	69	181	12	1.8 (9 %)
<b>66</b>	1723.97	50	69	148	37	9.4 (40 %)
<b>68</b>	1765.07	50	69	143	32	7.4 (30 %)

\* bezogen auf 40 mg Rohprodukt

## Experimenteller Teil

Von den Peptiden **46** bis **68** wurde durch einen analytischen Lauf die Reinheit der erhaltenen Produkte bestimmt. Tabelle 7.3-2 listet die ermittelten Werte auf.

*Tabelle 7.3-2: Übersicht über die ermittelten Reinheiten der inhibitorischen Peptide und der zugehörigen Referenzsubstanzen.*

Substanz	Reinheit nach HPLC [%]
<b>46</b>	98
<b>47</b>	94
<b>48</b>	93
<b>49</b>	93
<b>50</b>	93
<b>51</b>	91
<b>52</b>	96
<b>53</b>	93
<b>54</b>	95
<b>56</b>	90
<b>58</b>	91
<b>60</b>	90
<b>62</b>	99
<b>63</b>	92
<b>65</b>	97
<b>67</b>	91
<b>55</b>	94
<b>57</b>	97
<b>59</b>	91
<b>61</b>	92
<b>64</b>	88
<b>66</b>	98
<b>68</b>	77

### 7.3.6 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

MALDI-TOF-Spektren wurden an einem Bruker Biflex III Gerät im Positivionenmodus gemessen. Je nach Substanz wurde der Massenbereich unterhalb von  $m/z = 500$  bis  $m/z = 1000$  unterdrückt, um Matrixsignale auszublenden. Vor jeder Messung erfolgte die exakte Kalibrierung des Gerätes mit einem ES Tuning Mix der Firma Hewlett Packard. Dieser enthielt definierte Massen mit Molgewichten zwischen 118 und 2712 g/mol.

Als Matrices wurden  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (CCA), 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) und Dithranol (DTR) verwendet.

Table 7.3-3: Liste der verwendeten Matrices.

	Bezeichnung	Lösung	Substanzen
CCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure	ges. Lsg H <sub>2</sub> O/MeCN (1:2) 0.1 % TFA	Peptide, modifizierte Peptide
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure	20 mg/mL H <sub>2</sub> O/MeCN (1:2) 0.1 % TFA	Peptide
DTR	Dithranol	ges. Lsg H <sub>2</sub> O/MeCN (1:9) 0.1 % TFA	Syntheseprodukte

Während CCA und DHB für die Vermessung von Peptiden verwendet wurden, diente DTR in erster Linie dazu, niedermolekulare Syntheseprodukte zu charakterisieren, da diese Matrix nur sehr wenige Signale im Niedrigmassenbereich zeigt. Für jede Messung wurden 0.5  $\mu$ L der Matrixlösung auf die entsprechende Fläche des Proben Tellers gegeben und entweder nach dem Trocknen mit der gleichen Menge Analytlösung überschichtet oder vor dem Auskristallisieren mit dem Analyten vermischt.

## Experimenteller Teil

*Tabelle 7.3-4: Auflistung der synthetisierten Peptide mit berechneten Massen und der dazugehörigen Messergebnisse.*

Substanz	Zusammensetzung	Exakte Masse (berechnet) [u]	Masse (gefunden) [u]
<b>1</b>	C35H65N11O11	815.49	816.8
<b>2</b>	C37H61N11O10S	851.43	852.2
<b>3</b>	C34H66N14O9S	846.49	847.9
<b>4</b>	C30H58N10O10	718.43	719.4
<b>5</b>	C27H52N10O10S	708.36	709.1
<b>6</b>	C30H61N10O13P	800.42	801.7
<b>7</b>	C27H55N10O13PS	790.34	791.4
<b>8</b>	C45H85N15O14	1059.64	1060.8
<b>9</b>	C40H73N15O15S	1035.51	1036.7
<b>10</b>	C39H73N13O15S	995.51	996.6
<b>11</b>	C46H48N16O15	1100.63	1001.5
<b>42</b>	C32H55N13O7	733.43	773.8
<b>43</b>	C33H57N13O7	747.45	748.9
<b>44</b>	C38H57N15O8	851.45	852.6
<b>45</b>	C39H59N15O8	865.47	865.7
<b>46</b>	C60H109N19O20	1415.81	1417.1
<b>47</b>	C64H110N22O19S	1522.80	1523.5
<b>48</b>	C62H100N18O20S	1448.71	1449.5
<b>49</b>	C62H111N23O20	1497.84	1498.3
<b>50</b>	C60H108N20O20	1428.80	1429.5
<b>51</b>	C67H125N25O15	1519.98	1521.4
<b>52</b>	C66H100N18O20	1463.74	1464.2
<b>53</b>	C69H107N19O19	1505.79	1507.0
<b>54</b>	C72H125N25O20	1659.95	1660.9
<b>55</b>	C73H127N25O20	1673.97	1675.0
<b>56</b>	C76H126N28O19S	1766.94	1768.4
<b>57</b>	C77H128N28O19S	1781.96	1782.8
<b>58</b>	C74H116N24O20S	1692.85	1693.7
<b>59</b>	C75H118N24O20S	1706.87	1707.8
<b>60</b>	C74H127N29O20	1741.98	1742.5
<b>61</b>	C75H129N29O20	1756.00	1756.9
<b>62</b>	C72H124N26O20	1672.95	1674.4
<b>63</b>	C79H141N31O15	1764.12	1765.7
<b>64</b>	C80H143N31O15	1778.14	1779.1
<b>65</b>	C78H116N24O20	1708.88	1710.8
<b>66</b>	C79H118N24O20	1722.89	1723.8
<b>67</b>	C81H123N25O19	1750.94	1751.8
<b>68</b>	C82H125N25O19	1764.96	1766.1

### 7.3.7 Charakterisierung der Peptide durch NMR

Die Charakterisierung der synthetisierten und aufgereinigten Peptide erfolgte bei 285 K in einem Bruker DRX500-Spektrometer mit inversem 5 mm Tripleresonanzprobenkopf. Die Substanzen wurden in Mengen von 1.5 bis 16 mg in 650  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1, pH 3) gelöst und in 5 mm Röhren pipettiert. Um die Signale der Peptide trotz des intensiven Wassersignals messen zu können, wurden NOESY und ROESY unter Zuhilfenahme eines *watergate*-Verfahrens (w5-Sequenz) vermessen. Dadurch wird das Signal/Rausch-Verhältnis der Peptidprotonen drastisch verbessert und sie werden detektierbar. Die einzelnen chemischen Verschiebungen wurden unter Verwendung von 2D-TOCSY (Pulsprogramm mlevgpqh5) und 2D-ROESY-Experimenten (Pulsprogramm roesygpqh19) den entsprechenden Protonen zugeordnet.

Wenn nicht anders erwähnt, wurden die Spektren mit 128 Inkrementen in F1 und mit 2048 Datenpunkten pro Inkrement aufgezeichnet. Pro Datenpunkt erfolgten 64 *Scans*, die bei einer Spektrenweite von 10 ppm mittels phasensensitivem TPPI-Verfahren aufgenommen wurden. Im Anschluss an die Fouriertransformation der Rohdaten erfolgten Phasen- und Basislinienkorrektur. Eine quadratische Sinusfunktion diente als *window*-Funktion mit einem *shift* von  $2\pi$  und einer Linienverbreiterung von je 0.3 in F1 und F2.

*Tabelle 7.3-5: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von I.*

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Leu	-	3.935	1.586	1.586	1.586	-	0.855	8.855			
Leu	8.565	4.362	1.528	1.582	1.528	-	0.826	0.826			
Arg	8.466	4.348	1.720	1.720	1.551	1.551	3.138	3.138	7.122		
Thr	8.092	4.255	-	-	1.113						
Glu	8.441	4.088	1.887	1.887	2.025	2.025					
Ser	8.311	4.385	3.785	3.785							
Val	8.083	4.087	2.013	-	0.868	0.868					

Experimenteller Teil

Tabelle 7.3-6: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von 2.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Leu	-	3.886	1.512	1.647	1.512	-	0.838	0.838			
Tyr	8.656	4.488	2.952	2.856	-	-	7.280	7.280	7.482	7.482	
Arg	7.981	4.197	1.611	1.611	1.427	1.427	3.058	3.058	7.074		
Ser	8.212	4.520	3.805	3.805							
Pro	-	4.371	2.488	2.488	1.915	2.053	3.788	3.788			
Ser	8.184	4.332	3.778	3.778							
Met	8.319	4.418	2.052	2.052	2.864	2.864	-	-	2.226		

Tabelle 7.3.7: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von 3.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Met	-	4.066	2.025	2.025	2.505	2.505	-	-	0.869		
Arg	8.497	4.289	1.711	1.711	1.568	1.568	3.129	3.129	7.124		
Arg	8.697	4.311	1.720	1.720	1.558	1.558	3.121	3.121	7.195		
Ser	8.368	4.377	3.772	3.723							
Leu	8.323	4.353	1.558	1.622	1.558	-	0.819	0.819			
Ser	8.231	4.408	3.762	3.762							
Val	8.017	4.066	2.021	-	0.871	0.871					

Tabelle 7.3-8: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von 4.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Lys	-	4.273	1.723	1.723	1.617	1.617	1.354	1.354	2.920	2.920	
Ser	8.207	4.451	3.828	3.828							
Lys	8.514	4.236	1.727	1.727	1.634	1.634	1.361	1.361	2.917	2.917	
Ile	8.143	4.269	1.765	-	1.135	1.405	0.847				$\gamma'=0.847$
Gly	8.459	3.933	3.933								
Ser	8.695	4.419	3.787	3.787							
Thr	8.145	4.276	4.105	-	1.130						

Experimenteller Teil

Tabelle 7.3-9: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von 5.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Lys	-	4.291	1.776	1.776	1.625	1.625	1.385	1.385	2.922	2.922	
Ser	8.238	4.473	3.831	3.831							
Lys	8.559	4.248	1.767	1.767	1.645	1.645	1.387	1.387	2.935	2.925	
Cys	8.374	4.448	2.868	2.872	3.301						
Gly	8.441	4.643	3.955	3.955							
Ser	8.706	4.452	3.821	3.821							
Thr	8.137	4.270	4.271	-	1.161						

Tabelle 7.3-10: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von 6.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Lys	-	4.287	1.736	1.736	1.620	1.620	1.366	1.366	2.934	2.934	
Ser	8.220	4.352	3.780	3.780							
Lys	8.423	4.288	1.733	1.733	1.631	1.631	1.379	1.379	2.934	2.934	
Ile	8.018	4.097	1.753	-	1.104	1.374	0.826				$\gamma' = 0.826$
Gly	8.294	4.222									
Ser(PO <sub>4</sub> )	8.966	4.647	4.095	4.095							
Thr	8.220	4.341	4.341	-	0.872						

Tabelle 7.3-11: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von 7.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Lys	-	4.311	1.785	1.785	1.593	1.593	1.342	1.342	2.958	2.958	
Ser	8.214	4.287	3.791	3.791							
Lys	8.438	4.307	1.726	1.726	1.637	1.637	1.385	1.385	2.920	2.920	
Cys	8.382	4.468	2.915	2.861	3.314						
Gly	8.315	4.173									
Ser(PO <sub>4</sub> )	8.941	4.637	4.083	4.083							
Thr	8.348	4.287	4.352	-	0.865						

Experimenteller Teil

Tabelle 7.3-12: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von **46**.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Asn	-	4.306	2.946	2.946	-	-	7.502				
Val	8.520	4.116	2.043	-	0.887	0.887					
Lys	8.153	4.252	1.757	1.757	1.582	1.582	1.396	1.396	2.942	2.942	
Ser	8.160	4.495	3.855	3.855							
Lys	8.3665	4.291	1.791	1.791	1.651	1.651	1.371	1.371	2.951	2.951	
Ile	8.091	4.095	1.802	-	1.147	1.436	0.858				$\gamma''=0.858$
Gly	8.422	3.947	3.947								
Ser	8.193	4.308	3.798	3.798							
Thr	8.196	4.309	4.266	-	1.157						
Glu	8.238	4.287	1.924	2.035	2.403	2.403					
Asn	8.385	4.655	2.784	2.678	-	-	7.460				
Leu	8.152	4.230	1.373	1.583	1.373	-	0.841	0.841			
Lys	8.389	4.267	1.752	1.752	1.646	1.646	1.391	1.391	2.924	2.924	

Tabelle 7.3-13: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von **47**.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Pro	-	4.372	2.487	2.487	1.973	1.973	3.785	3.785			
Ala	8.618	4.280	1.328								
Met	8.278	4.301	1.924	1.924	2.413	2.413	-	-	2.084		
Arg	8.363	4.291	1.756	1.756	1.608	1.608	3.149	3.149	7.167		
Arg	8.381	4.293	1.759	1.758	1.611	1.610	3.152	3.151	7.196		
Ser	8.302	4.388	3.813	3.813							
Leu	8.276	4.305	1.516	1.632	1.517		0.838	0.838			
Ser	8.205	4.401	3.803	3.803							
Val	7.983	4.060	2.031	-	0.845	0.845					
Glu	8.403	4.372	2.021	1.905	2.509	2.509					
His	8.648	4.640	3.102	3.234	-	-	7.212	-	8.612	-	
Leu	8.243	4.271	1.503	1.608	1.503	-	0.844	0.844			
Glu	8.196	4.273	1.852	1.971	2.364	2.364					

Experimenteller Teil

Tabelle 7.3-14: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von **48**.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Ser	-	4.369	3.776	3.776							
Gly	8.634	3.951	3.951								
Leu	8.177	4.245	1.375	1.477	1.375	-	0.807	0.807			
Tyr	8.410	4.635	2.707	2.759			7.349	7.349	9.809	6.809	
Arg	8.020	4.259	1.668	1.668	1.483	1.483	3.096	3.096	7.076		
Ser	8.185	4.370	3.774	3.774							
Pro	-	4.297	2.017	2.017	1.874	1.874	2.430	2.430			
Ser	8.244	4.590	3.809	3.809							
Met	8.152	4.776	1.911	1.911	2.561	2.561	-	-	2.017		
Pro	-	4.297	2.017	2.017	1.874	1.874	2.430	2.430			
Glu	8.578	4.266	1.990	1.981	2.472	2.472					
Asn	8.463	4.639	2.739	2.739	-	-	7.110				
Leu	8.179	4.393	1.564	1.645	1.564	-	0.825	0.825			

Tabelle 7.3-15: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von **49**.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Ala	-	4.067	1.334								
Arg	8.565	4.298	1.725	1.725	1.575	1.575	3.147	3.147	7.107		
Leu	8.342	4.374	1.513	1.592	1.510	-	0.843	0.843			
Arg	8.387	4.377	1.727	1.727	1.556	1.556	3.145	3.145	7.118		
Arg	8.382	4.311	1.791	1.791	1.641	1.641	3.146	3.146	7.147		
Thr	8.190	4.295	4.171	-	1.146						
Glu	8.334	4.402	2.081	1.932	2.407	2.407					
Ser	8.334	4.398	3.778	3.778							
Val	8.103	4.436	2.047	-	0.899	0.899					
Pro	-	4.362	2.351	2.351	1.946	1.946	3.778	3.778			
Ser	8.291	4.364	3.819	3.819							
Asp	8.387	4.712	2.898	2.812							
Ile	7.888	4.119	1.823	-	1.131	1.397	0.827				$\gamma''=0.878$

Experimenteller Teil

Tabelle 7.3-16: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von 50.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Arg	-	4.025	1.855	1.855	1.577	1.553	3.160	3.160	7.187		
Val	8.596	4.102	1.985	-	0.899	0.899					
Gln	8.584	4.337	1.932	1.986	2.304	2.304	-	-	7.664	7.664	
Ser	8.339	4.378	3.788	3.788							
Lys	8.405	4.329	1.779	1.779	1.651	1.651	1.363	1.363	2.916	2.916	
Ile	8.122	4.134	1.798	-	1.146	1.425	0.856				$\gamma'=0.856$
Gly	8.426	3.925	3.925								
Ser	8.103	4.397	3.817	3.817							
Leu	8.261	4.302	1.522	1.625	1.514	-	0.835	0.835			
Asp	8.306	4.630	2.867	2.746							
Asn	8.269	4.661	2.723	2.723	-	-	7.079				
Ile	8.022	4.186	1.877	-	1.141	1.392	0.844				$\gamma'=0.844$
Thr	8.094	4.376	4.161	-	1.138						

Tabelle 7.3-17: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von 51.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Leu	-	3.878	1.157	1.677	1.157	-	0.889	0.889			
Leu	8.591	4.360	1.499	1.582	1.499	-	0.847	0.847			
Asn	8.503	4.620	2.712	2.712	-	-	7.338	7.338			
Lys	8.280	4.231	1.786	1.786	1.569	1.569	1.365	1.365	2.931	2.931	
Arg	8.261	4.356	1.701	1.701	1.508	1.508	3.162	3.162	7.128		
Arg	8.283	4.236	1.734	1.734	1.571	1.571	3.141	3.141	7.112		
Gly	8.400	4.256	3.936								
Ser	8.189	4.449	3.772	3.772							
Val	8.098	4.352	2.037	-	0.898	0.898					
Pro	-	4.271	1.837	1.837	1.719	1.719	3.129	3.129			
Ile	8.136	4.056	1.746	-	1.124	1.465	0.827				$\gamma'=0.872$
Leu	8.260	4.503	1.632	1.739	1.632	-	0.958	0.958			
Arg	8.379	4.414	1.872	1.872	1.727	1.727	3.288	3.288	7.249		

Experimenteller Teil

Tabelle 7.3-18: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von 52.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Ser	-	4.143	3.919	3.919							
Gly	8.603	3.932	3.932								
Leu	8.160	4.240	1.524	1.673	1.524	-	0.824	0.824			
Tyr	8.407	4.639	2.663	2.848	-	-	6.763	-	5.932		
Arg	8.051	4.869	1.646	1.646	1.452	1.452	3.022	3.022	7.286		
Ser	8.161	4.241	3.702	3.702							
Pro	-	4.244	1.651	1.651	1.506	1.506	3.747	3.747			
Ser	8.213	4.593	3.806	3.806							
Phe	8.179	4.450	2.904	2.904	-	-	7.255	7.255	7.255	7.255	$\zeta=7.255$
Pro	-	4.242	1.649	1.649	1.502	1.502	3.745	3.745			
Glu	8.310	8.274	1.875	1.875	2.071	2.071	2.445	2.445			
Asn	8.037	4.525	2.893	3.046	-	-	7.038	7.038			
Leu	8.161	4.241	1.525	1.674	1.525	-	0.822	0.822			

Tabelle 7.3-19: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von 53.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Ser	-	4.156	3.954	3.954							
Gly	8.627	3.950	3.950								
Leu	8.145	4.243	1.531	1.604	1.531		0.811	0.811			
Tyr	8.428	4.636	2.703	2.818	-	-	6.942	-	5.993	-	
Lys	8.226	4.421	1.811	1.811	1.712	1.712	1.584	1.584	3.163	3.163	
Arg	8.168	4.480	1.645	1.645	1.528	1.528	2.908	2.908	7.118		
Pro	-	4.484	1.635	1.635	1.455	1.455	3.692	3.692			
Ser	8.270	4.346	3.753	3.753							
Phe	8.169	4.477	2.909	2.909			7.362	7.362	7.362	7.362	$\zeta=7.362$
Pro	-	4.480	1.632	1.632	1.458	1.458	3.689	3.689			
Glu	8.329	4.285	1.931	1.931	2.049	2.049	2.439	2.439			
Asn	8.085	4.865	2.861	3.108	-	-	7.158	7.158			
Leu	8.188	4.257	1.539	1.652	1.538	-	0.824	0.824			

## Experimenteller Teil

*Tabelle 7.3-20: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von 42.*

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	a. P.
Ser	-	4.124	3.917	3.917							
Lys	8.685	1.739	1.739	1.647	1.647	1.352	1.352	2.908	2.908		
Ile	8.200	4.112	1.769	-	1.123	1.769	0.847				$\gamma'=0.847$
Gly	8.395	3.886	3.886								
Lys(X4)	8.096	4.173	1.739	1.729	1.635	1.635	1.321	1.321	2.907	2.907	$\zeta=1.222$

*Tabelle 7.3-21: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von 43.*

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	a. P.
Ser	-	4.112	3.921	3.921							
Lys	8.661	4.347	1.734	1.734	1.637	1.637	1.356	1.356			
Ile	8.205	4.098	1.775		1.142	1.428	0.839				$\gamma'=0.839$
Gly	8.398	3.894	3.894								
Lys(X5)	8.092	4.168	1.746	1.746	1.645	1.645	1.415	1.415	3.078	3.078	$\zeta=1.275$

*Tabelle 7.3-22: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von 44.*

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	a. P.
Tyr	-	4.143	2.897	2.897	-	-	7.093	7.093	7.093		
Arg	8.299	4.283	1.642	1.642	1.486	1.486	3.092	3.092	7.067		
Ser	8.365	4.628	3.829	3.829							
Pro	-	4.158	1.724	1.724	1.294	1.622	3.716	3.716			
Lys(X4)	8.109	4.137	1.718	1.718	1.603	1.603	1.318	1.318	2.926	2.926	$\zeta=1.238$

*Tabelle 7.3-23: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von 45.*

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	a. P.
Tyr	-	4.135	3.046	3.046	-	-	6.847	6.847	6.847		
Arg	8.294	4.283	1.648	1.648	1.485	1.485	3.085	3.085	7.081		
Ser	8.372	4.627	3.834	3.834							
Pro	-	4.142	1.726	1.726	1.606	1.606	3.723	3.723			
Lys(X5)	8.082	4.119	1.715	1.715	1.606	1.606	1.394	1.394	3.073	3.073	$\zeta=1.285$

Experimenteller Teil

Tabelle 7.3-24: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von 54.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Asn	-	4.317	2.910	2.910	-	-	7.471				
Val	8.522	4.125	2.033	-	0.881	0.881					
Lys	8.363	4.291	1.801	1.801	1.646	1.646	1.359	1.359	2.953	2.953	
Ser	8.181	4.375	3.798	3.798							
Lys	8.388	4.274	1.783	1.783	1.645	1.645	1.392	1.392	2.942	2.942	
Ile	8.022	4.080	1.777	-	1.132	1.406	0.845				$\gamma'=0.845$
Gly	8.415	4.273	4.273								
Lys(X4)	8.066	4.269	1.740	1.740	1.654	1.654	1.348	1.348	2.946	2.946	$\zeta=1.258$
Thr	8.118	4.287	4.167	-	1.138						
Glu	8.257	4.309	1.911	2.045	2.383	2.383					
Asn	8.414	4.631	2.779	2.671	-	-	7.402				
Leu	8.172	4.276	1.501	1.624	1.501	-	0.828	0.828			
Lys	8.153	4.205	1.739	1.739	1.646	1.646	1.372	1.372	2.955	2.955	

Tabelle 7.3-25: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von 56.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Pro	-	4.388	2.518	2.518	1.949	1.949	3.791	3.791			
Ala	8.617	4.285	1.307								
Met	8.303	4.247	1.919	1.919	2.390	2.390			2.062		
Arg	8.386	4.275	1.728	1.728	1.565	1.565	3.129	3.129	7.111		
Arg	8.395	4.277	1.732	1.731	1.567	1.568	3.132	3.131	7.113		
Ser	8.322	4.386	3.794	3.794							
Leu	8.294	4.275	1.479	1.576	1.479	-	0.814	0.814			
Lys(X4)	8.123	4.198	1.712	1.712	1.608	1.608	1.289	1.289	2.881	2.881	$\zeta=1.206$
Val	8.011	3.981	1.952	-	0.812	0.812					
Glu	8.426	4.381	1.975	1.919	2.509	2.509					
His	8.495	4.653	3.102	3.203	-	-	-	7.241			
Leu	8.250	4.271	1.503	1.595	1.503	-	0.811	0.811			
Glu	8.269	4.277	1.847	1.957	2.346	2.346					

Experimenteller Teil

Tabelle 7.3-26: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von **58**.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Ser	-	4.385	3.687	3.687							
Gly	8.623	3.932									
Leu	8.153	4.216	1.463	1.605	1.515		0.812	0.812			
Tyr	8.446	4.632	2.664	2.786							
Arg	8.391	4.194	1.672	1.672	1.458	1.458	3.089	3.089	7.114		
Ser	8.153	4.459	3.788	3.788							
Pro	-	4.271	2.018	2.018	1.863	1.863	2.443	2.443			
Lys(X4)	8.119	4.151	1.704	1.704	1.544	1.544	1.139	1.239	2.901	2.901	$\zeta=1.148$
Met	8.169	4.719	1.868	1.868	2.512	2.512	-	-	2.004		
Pro	-	4.271	2.018	2.018	1.863	1.863	2.443	2.443			
Glu	8.713	4.290	1.955	1.879	2.484	2.484					
Asn	8.513	4.635	2.724	2.724	-	-	7.630				
Leu	8.198	4.227	1.497	1.625	1.498	-	-	0.811	0.811		

Tabelle 7.3-27: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von **60**.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Ala	-	1.306									
Arg	8.565	4.301	1.718	1.718	1.569	1.569	3.144	3.144	7.213		
Leu	8.340	4.285	1.501	1.579	1.501	-	0.837	0.837			
Arg	8.387	4.305	1.729	1.729	1.569	1.569	3.126	3.126	7.532		
Arg	8.386	4.303	1.723	1.723	1.576	1.576	3.107	3.107	7.444		
Thr	8.179	4.290	4.127	-	1.134						
Glu	8.279	4.299	2.032	1.898	2.371	2.371					
Lys(X4)	8.288	4.235	1.705	1.705	1.569	1.569	1.292	1.292	2.924	2.924	$\zeta=1.169$
Val	8.098	4.382	2.021	-	0.887	0.887					
Pro	-	4.215	2.342	2.342	1.898	1.898	3.806	3.806			
Ser	8.251	4.345	3.809	3.809							
Asp	8.383	4.700	2.875	2.815							
Ile	7.869	4.095	1.792	-	1.108	1.386	0.809				$\gamma'=0.871$

Experimenteller Teil

Tabelle 7.3-28: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von **62**.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Arg	-	4.044	1.847	1.869	1.569	1.588	3.154	3.154	7.144		
Val	8.560	4.102	1.992	-	0.891	0.891					
Gln	8.586	4.347	1.918	1.996	2.304	2.304	7.637	7.637			
Ser	8.346	4.382	3.809	3.809							
Lys	8.414	4.286	1.754	1.754	1.645	1.645	1.359	1.359	2.875	2.875	
Ile	8.092	4.203	1.844	-	1.147	1.395	0.872				$\gamma'=0.872$
Gly	8.360	3.869	3.869								
Lys(X4)	8.032	4.185	1.704	1.704	6.605	1.605	1.293	1.293	2.929	2.929	$\zeta=1.218$
Leu	8.199	4.281	1.503	1.612	1.503	-	0.899	0.899			
Asp	8.285	4.658	2.726	2.655							
Asn	8.277	4.586	2.848	2.671	-	-	7.264				
Ile	8.004	4.193	1.734	-	1.138	1.349	0.844				$\gamma'=0.844$
Thr	8.085	4.303	4.156	-	1.138						

Tabelle 7.3-29: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von **63**.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Leu	-	4.035	1.580	1.692	1.580	-	0.889	0.889			
Leu	8.589	4.333	1.509	1.564	1.509	-	0.823	0.823			
Asn	8.507	4.622	2.715	2.715	-	-	7.360	7.360			
Lys	8.288	4.248	1.748	1.748	1.637	1.637	1.341	1.341	2.923	2.923	
Arg	8.267	4.348	1.706	1.706	1.536	1.536	3.140	3.140	7.161		
Arg	8.343	4.251	1.722	1.722	1.588	1.588	3.143	3.143	1.159		
Gly	8.327	4.264	3.871								
Lys(X4)	8.110	4.356	1.692	1.692	1.588	1.588	1.217	1.217	2.877	2.877	$\zeta=1.093$
Val	8.099	4.341	2.010	-	0.806	0.806					
Pro	-	4.286	1.818	1.818	1.709	1.709	3.124	3.124			
Ile	8.121	4.230	1.354	-	1.094	1.428	0.795				$\gamma'=0.795$
Leu	8.260	4.293	1.512	1.707	1.512	-	0.835	0.835			
Arg	8.342	4.293	1.735	1.735	1.505	1.505	3.129	3.129	7.129		

Experimenteller Teil

Tabelle 7.3-30: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von 65.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Ser	-	4.157	3.927	3.927							
Gly	8.620	3.934	3.934								
Leu	8.124	4.201	1.387	1.511	1.387		0.786	0.786			
Tyr	8.401	4.637	2.692	2.825	-	-	6.883	-	6.329		
Arg	8.064	4.225	1.589	1.682	1.488	1.488	3.062	3.062	7.128		
Ser	8.145	4.576	3.776	3.776							
Pro	-	4.610	1.663	1.663	1.525	1.525	3.791	3.791			
Lys(X4)	8.066	4.213	1.696	1.696	1.537	1.537	1.389	1.389	3.050	3.050	$\zeta=1.370$
Phe	8.162	4.465	2.874	2.874	-	-	7.088	7.088	7.088	7.088	$\zeta=7.088$
Pro	-	4.617	1.672	1.672	1.521	1.521	3.801	3.801			
Glu	8.314	4.255	1.853	2.014	2.402	2.402					
Asn	7.932	4.842	2.844	3.042	-	-	7.094	7.094			
Leu	8.169	4.460	1.495	1.671	1.495	-	0.807	0.807			

Tabelle 7.3-31: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von 67.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Ser	-	4.151	3.948	3.948							
Gly	8.626	3.941	3.941								
Leu	8.133	4.223	1.371	1.450	1.371		0.788	0.788			
Tyr	8.430	4.649	2.683	2.814	-	-	6.125	-	5.992		
Lys	8.115	4.449	1.744	1.744	1.618	1.618	1.453	1.453	3.141	3.141	
Arg	8.152	4.477	1.644	1.644	1.501	1.501	2.886	2.886	7.108		
Pro	-	4.478	1.626	1.626	1.533	1.533	3.788	3.788			
Lys(X4)	8.065	4.176	1.674	1.674	1.565	1.565	1.326	1.326	2.904	2.904	$\zeta=1.268$
Phe	8.152	4.471	2.892	2.892	-	-	7.093	7.093	7.093	7.093	7.09
Pro	-	4.466	1.614	1.614	1.521	1.521	3.776	3.776			
Glu	8.326	4.281	1.906	1.906	2.027	2.027	2.416	2.416			
Asn	8.005	4.839	2.828	3.082	-	-	7.446	7.446			
Leu	8.186	4.238	1.521	1.657	1.521	-	0.829	0.829			

Experimenteller Teil

Tabelle 7.3-32: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von 55.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Asn	-	4.319	2.914	2.914	-	-	7.472				
Val	8.530	4.127	2.035	-	0.885	0.885					
Lys	8.365	4.293	1.804	1.804	1.650	1.650	1.362	1.362	2.956	2.956	
Ser	8.181	4.375	3.801	3.801							
Lys	8.388	4.274	1.785	1.785	1.648	1.648	1.389	1.389	2.945	2.945	
Ile	8.021	4.084	1.774	-	1.136	1.408	0.847				$\gamma'=0.847$
Gly	8.416	4.275									
Lys(X5)	8.068	4.271	1.738	1.738	1.652	1.652	1.351	1.351	2.948	2.948	$\zeta=1.261$
Thr	8.120	4.287	4.165	-	1.140						
Glu	8.259	4.311	1.909	2.047	2.385	2.385					
Asn	8.417	4.628	2.782	2.668	-	-	7.405				
Leu	8.170	4.278	1.498	1.623	1.498	-	0.831	0.831			
Lys	8.154	4.202	1.741	1.741	1.648	1.648	1.369	1.369	2.952	2.952	

Tabelle 7.3-33: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von 57.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Pro	-	4.390	2.512	2.512	1.954	1.954	3.787	3.787			
Ala	8.618	4.322	1.309								
Met	8.354	4.317	1.901	1.901	2.388	2.388	-	-	2.075		
Arg	8.387	4.293	1.723	1.723	1.568	1.568	3.127	3.127	7.092		
Arg	8.394	4.293	1.723	1.723	1.568	1.568	3.127	3.127	7.092		
Ser	8.317	4.383	3.791	3.791							
Leu	8.292	4.278	1.505	1.587	1.506	-	0.806	0.806			
Lys(X5)	8.103	4.194	1.704	1.704	1.626	1.626	1.387	1.387	3.030	3.030	$\zeta=1.238$
Val	8.002	4.011	1.962	-	0.827	0.827					
Glu	8.427	4.373	1.995	1.914	2.521	2.521					
His	8.488	4.639	3.104	3.204	-	-	7.530	-	8.465		
Leu	8.253	4.263	1.505	1.586	1.505	-	0.817	0.817			
Glu	8.262	4.237	1.862	1.926	2.325	2.325					

Experimenteller Teil

Tabelle 7.3-34: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von **59**.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Ser	-	4.389	3.722	3.722							
Gly	8.627	3.933									
Leu	8.159	4.214	1.504	1.601	1.532	-	0.804	0.804			
Tyr	8.455	4.619	2.668	2.771							
Arg	8.101	4.229	1.679	1.679	1.582	1.582	3.075	3.075	7.311		
Ser	8.165	4.458	3.802	3.802							
Pro	-	4.240	2.007	2.007	1.879	1.879	2.431	2.431			
Lys(X5)	8.097	4.141	1.676	1.676	1.566	1.566	1.368	1.368	3.052	3.052	$\zeta=1.218$
Met	8.159	4.733	1.882	1.882	2.535	2.535	-	-	2.005		
Pro	-	4.215	2.006	2.006	1.882	1.882	2.384	2.384			
Glu	8.717	4.293	2.033	1.895	2.457	2.457					
Asn	8.517	4.646	2.733	2.694	-	-	7.806				
Leu	8.229	4.744	1.517	1.641	1.517	-	0.814	0.814			

Tabelle 7.3-35: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von **61**.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Ala	-	1.115									
Arg	8.561	4.298	1.711	1.711	1.569	1.569	3.144	3.144	7.504		
Leu	8.337	4.363	1.501	1.552	1.472		0.839	0.839			
Arg	8.382	4.331	1.726	1.726	1.549	1.549	3.136	3.136			
Arg	8.380	4.331	1.731	1.731	1.557	1.557	3.138	3.138			
Thr	8.171	4.255	4.106	-	1.125						
Glu	8.276	4.331	2.046	1.881	2.378	2.378					
Lys(X5)	8.272	4.230	1.651	1.651	1.407	1.407	1.245	1.245	2.924	2.924	$\zeta=1.197$
Val	8.087	4.373	2.042	-	0.895	0.895					
Pro	-	4.372	2.373	2.373	1.887	1.887	3.784	3.784			
Ser	8.245	4.343	3.807	3.807							
Asp	8.391	4.713	2.901	2.821							
Ile	7.890	4.096	1.811	-	1.114	1.389	0.807				$\gamma'=0.807$

Experimenteller Teil

Tabelle 7.3-36: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von **64**.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Leu	-	3.949	1.596	1.668	1.596	-	0.863	0.863			
Leu	8.586	4.336	1.502	1.558	1.502	-	0.826	0.826			
Asn	8.503	4.609	2.691	2.691	-	-	7.229	7.229			
Lys	8.286	4.241	1.754	1.754	1.606	1.606	1.332	1.332	3.103	3.103	
Arg	8.240	4.253	1.711	1.711	1.547	1.547	3.149	3.149	7.425		
Arg	8.320	4.255	1.708	1.708	1.574	1.574	3.135	3.135	7.422		
Gly	8.323	4.268	3.873	3.873							
Lys(X5)	7.871	4.370	1.667	1.667	1.575	1.575	1.382	1.382	3.046	3.046	$\zeta=1.225$
Val	8.033	3.997	1.733	-	0.831	0.831					
Pro	-	4.314	1.781	1.781	1.718	1.718	3.125	3.125			
Ile	8.109	4.226	1.674	-	1.222	1.375	0.814				$\gamma'=0.841$
Leu	8.250	4.333	1.551	1.731	1.551	-	0.812	0.812			
Arg	8.332	4.217	1.714	1.714	1.588	1.588	3.141	3.141	7.476		

Tabelle 7.3-37: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von **66**.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Ser	-	4.148	3.927	3.927							
Gly	8.622	3.931	3.931								
Leu	8.175	4.232	1.482	1.648	1.482	-	0.816	0.816			
Tyr	8.474	4.625	2.647	2.823	-	-	7.316	-	6.173		
Arg	8.054	4.246	1.628	1.628	1.456	1.456	3.059	3.059	6.541		
Ser	8.159	4.484	3.783	3.783							
Pro	-	4.550	1.685	1.685	1.491	1.491	3.785	3.785			
Lys(X5)	8.127	4.776	1.712	1.712	1.561	1.561	1.331	1.331	3.070	3.070	$\zeta=1.125$
Phe	8.170	4.485	2.885	2.885	-	-	7.471	7.471	7.471	7.471	7.471
Pro	-	4.781	1.622	1.622	1.461	1.461	3.782	3.782			
Glu	8.327	4.273	1.887	2.036	2.425	2.425					
Asn	8.130	4.775	2.843	3.058							
Leu	8.298	4.266	1.501	1.662	1.501	-	0.803	0.803			

Experimenteller Teil

Tabelle 7.3-38: Auflistung der chemischen Verschiebungen innerhalb der Spinsysteme der einzelnen Aminosäureseitenketten von 68.

AS	NH	$\alpha$	$\beta$	$\beta'$	$\gamma$	$\gamma'$	$\delta$	$\delta'$	$\epsilon$	$\epsilon'$	andere Protonen
Ser	-	4.152	3.815	3.815							
Gly	8.625	3.933	3.933								
Leu	8.133	4.224	1.522	1.619	1.522	-	0.787	0.787			
Tyr	8.431	4.637	2.696	2.781	-	-	6.264	-	5.758		
Lys	8.111	4.431	1.728	1.728	1.612	1.612	1.532	1.532	3.124	3.124	
Arg	8.149	4.473	1.612	1.612	1.503	1.503	2.889	2.889	7.195		
Pro	-	4.236	1.593	1.593	1.485	1.485	3.997	3.997			
Lys(X5)	8.051	4.163	1.672	1.672	1.563	1.563	1.309	1.309	2.884	2.884	$\zeta=1.186$
Phe	8.149	4.473	2.884	2.884	-	-	7.214	7.214	7.214	7.214	$\zeta=7.214$
Pro	-	4.232	1.589	1.589	1.482	1.482	3.994	3.994			
Glu	8.330	4.261	1.904	1.904	2.032	2.032	2.426	2.426			
Asn	7.985	4.853	2.819	3.076	-	-	7.203	7.203			
Leu	8.182	4.229	1.503	1.628	1.503	-	0.806	0.806			

## 7.4 Molecular modelling

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *molecular modelling*-Studien wurden mit der Software Sybyl 7.5 der Firma Tripos durchgeführt. Die technologische Basis hierfür stellten *workstations* der Firma HP mit Linux Red Hat als Betriebssystem dar. Als strukturelle Grundlage für diese Arbeiten dienten die von Mandelkow et al. veröffentlichten Kristallstrukturen der *microtubule affinity regulating kinase* 2HAK und 1Y8G. Die Strukturen wurden unter Zuhilfenahme des *structure-preparation-tools* und des *protein-composition-tools* überarbeitet, korrigiert und optimiert (siehe 4.3.1).

### 7.4.1 Docking-Experimente

Um die optimalen Positionen der Substrate innerhalb der Bindungskavität zu ermitteln, wurde die programminterne *docking*-Routine Flexidock verwendet. Da keine Kristallstruktur mit gebundenem Inhibitormolekül vorlag, wurden die Strukturen analog gebauter Kinasen mit der in Sybyl integrierten Routine *siteID find pockets* untersucht. Die Parameter der Such-Routine wurden so optimiert, dass in allen vorhandenen Strukturen der Kinasen AURORA, GSK3 und PKA der Ort des kokristallisierten ATP-Analogons richtig identifiziert wurde. Dieses Vorgehen führte zu einer eindeutigen Zuordnung der entsprechenden Bindungstasche innerhalb der Struktur von MARK.

*Tabelle 7.4-1: Parameter für die Identifizierung der ATP-Bindungstasche, die sowohl die eindeutige Position des gebundenen Moleküls in Kristallstrukturen analoger Kinasen korrekt vorhersagen als auch eine einzige Kavität in der MARK-Struktur als Nukleotid-Bindungstasche vorschlagen.*

Parameter	Wert
Minimale Konkavität	3 (0-10)
Minimale Größe der Tasche	8 Solvenssphären
Sphärengröße jedes Solvensmoleküls	8.0 Å
Minimale Zahl der benachbarten Schweratome	75
Distanz neben benachbarten Clusteratomen	3.0 Å
Van der Waals Skalierungsfaktor für Solvensmoleküle	0.8

Als Basis für das *docking* diente die Kristallstruktur 2HAK, aus der die Aminosäuren Lys<sup>190</sup> bis Pro<sup>214</sup> entfernt wurden. Dieser Abschnitt entspricht den Aminosäuren der regulatorischen Schleife, die in der Struktur 1Y8G aufgrund seiner Flexibilität nicht aufgelöst werden konnte (siehe 7.4.2). Anschließend wurde ATP in divergenten Ausrichtungen und unterschiedlichen Positionen in die entsprechende Kavität gedockt. Die energetisch günstigste resultierende Struktur wurde verwendet, um nach dem gleichen Schema das Peptid in die optimale Position zu bringen. Die Geometrie der Kinase schränkt dabei die Zahl der möglichen Ausrichtungen der Peptidkette ein. Eine weitere Restriktion ist die Tatsache, dass das  $\gamma$ -Phosphat des ATPs und das zu phosphorylierende Serin sich in räumlicher Nähe zueinander befinden müssen. Die Ergebnisse des *dockings* lassen ausreichend Raum in der Bindungstasche, um die Aminosäuren der regulatorischen Schleife aufzunehmen.

### 7.4.2 Modelle für die regulatorische Schleife

Es sind keine Daten über die Lokalisation der regulatorischen Schleife von MARK im aktiven Zustand vorhanden. Daher ist eine auf der Kristallstruktur beruhende exakte Beschreibung der Bindungskavität der *microtubule affinity regulating kinase* nicht möglich.

Die Röntgenkristallstrukturen von MARK bestehen aus Dimeren, deren Dimerisierungsdomäne in erster Linie aus dem regulatorischen *loop* besteht. Dies führt dazu, dass die Schleife vom Dimerisierungspartner in das aktive Zentrum zurückgefaltet wird und eine inaktive Form des Proteins in der Kristallstruktur vorliegt. Für die *docking*-Studien wurde der Bereich Lys<sup>190</sup> bis Pro<sup>214</sup> aus der Struktur 2HAK entfernt, um mit einer zugänglichen *binding site* arbeiten zu können.

Der umschlossene Hohlraum in der Kavität ist sehr groß, da die entsprechenden Aminosäuren der Schleife nicht vorhanden sind. Um ein Modell einer aktiven Kinase zu entwickeln, wurde die aus den *docking*-Studien resultierende Anordnung von Protein, ATP und Peptid verwendet. Die einzelnen Aminosäuren der regulatorischen Schleife (Lys<sup>190</sup> bis Pro<sup>214</sup>) wurden manuell nacheinander in das Modell eingefügt, ausgerichtet und optimiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass der so entstehende Verlauf der Schleife dem aus anderen Kinasen mit bekannter Struktur wie AURORA folgt. Die *docking*-Studien haben gezeigt, dass der dafür benötigte Freiraum im Inneren der Kavität gegeben ist. Auf diese Art und Weise wurden 3 verschiedene Modelle erzeugt, die einen Vorschlag darstellen, wie sich das inaktive Enzym öffnet und die regulatorische Schleife sich immer weiter aus dem Protein herausfaltet.

### 7.4.3 Design potentieller Inhibitoren

Die aus den in den Kapiteln 7.4.1 und 7.4.2 erläuterten Arbeiten hervorgegangene Geometrie der Bindungskavität wurde verwendet, um einen potenziellen Inhibitor zu entwerfen. Dieser soll eine optimierte Peptidsequenz, ein korrekt ausgerichtetes Adenin und einen beide Teile miteinander verbindenden *linker* besitzen. Neben der richtigen Länge des *linkers* spielt auch die Flexibilität der Struktur eine wichtige Rolle. Für 3 verschiedene Strukturen wurde ein Syntheseplan erarbeitet und umgesetzt (siehe 4.3.4 und 4.4).

Die in Abbildung 7.4-1 dargestellten Aminosäureseitenketten wurden in das MARK-Modell 1 eingepflegt und die dazugehörigen Bindungsenergien berechnet.

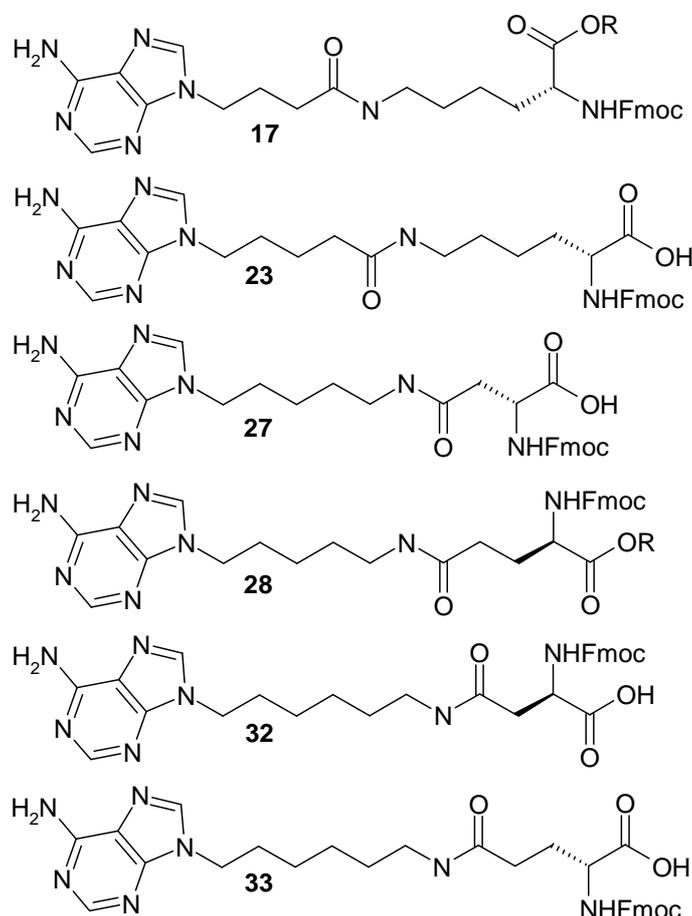


Abbildung 7.4-1: Strukturformeln der unterschiedlichen Aminosäureanaloge, die über verschiedene linker mit unterschiedlicher Länge den Abstand zwischen Peptid und dem N9 von Adenin überbrücken. Die Nummerierung basiert auf den in den nächsten Abschnitten erläuterten Syntheserouten.

## Experimenteller Teil

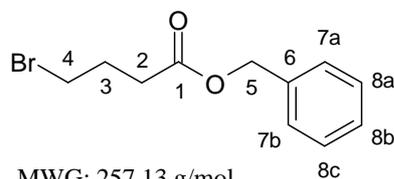
Tabelle 7.4.2 gibt resultierenden Bindungsenergien der sechs unterschiedlichen in die Sequenz SKIGX eingefügten inhibitorischen Aminosäuren an, die Ser<sup>262</sup> in den inhibitorischen Peptiden substituieren (die entsprechenden Strukturen sind in Abbildung 7.4-1 dargestellt). Die Divergenz der Werte ist gering, daher passen alle Strukturen zu den modellierten Kinasemodellen. Lediglich **16** scheint zu kurz zu sein, um den Abstand zwischen den beiden Teilen des Pharmakophors zu überbrücken.

*Tabelle 7.4-2: Liste der unterschiedlichen Bindungsenergien in Modell 1 von MARK. Die direkten Abstände zwischen C $\alpha$  der theoretisch zu phosphorylierenden Aminosäure und dem N9 des Adenins variieren nach dem Optimieren in der Bindungstasche geringfügig.*

Molekül	Energie [kcal/mol]	Distanz [Å]
<b>6</b>	-44.8	12.3
<b>12</b>	-47.6	13.1
<b>16</b>	-46.2	10.6
<b>17</b>	-44.2	12.3
<b>21</b>	-46.6	12.2
<b>22</b>	-47.7	12.9

## 7.5 Synthese der inhibitorischen Bausteine

### 7.5.1 Synthese von 4-Brombutansäurebenzylester (12)



MWG: 257.13 g/mol  
C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>BrO<sub>2</sub>

Die Synthese wurde in einer leicht modifizierten Variante zu einer literaturbekannten Synthese durchgeführt.<sup>179</sup> 4-Brombutansäure (8.9 g, 53 mmol) und DMAP (0,77 g, 6.2 mmol) wurden in THF (35 mL) gelöst. Bei 0 °C wurden Benzylalkohol (7.2 ml, 66 mmol) und DIC (8.4 mL, 54 mmol) in THF unter Schutzgas dazugegeben. Die klare Lösung wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht gerührt. Nach Zugabe von 25 mL dest. H<sub>2</sub>O wurden die Lösungsmittel entfernt und der verbliebene Rückstand in EE/H<sub>2</sub>O 1:1 (je 100 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit je 50 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden vom Lösungsmittel befreit und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (EE/Hexan 1:3).

#### Charakterisierung:

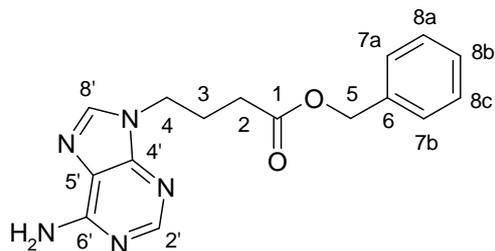
farbloses Öl

R<sub>f</sub>-Wert: 0.85 (EE/Hexan 1:1)

Ausbeute: 6.5 g (25 mmol, 47 % bezogen auf 4-Brombutansäure)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.41 - 7.36 (m, 5H, **H7**, **H8**); 5.12 (s, 2H, **H5**); 3.48 (t, <sup>3</sup>J<sub>H4H3</sub> = 6.8 Hz, 2H, **H4**); 2.58 (t, <sup>3</sup>J<sub>H2H3</sub> = 7.1 Hz, 2H, **H2**); 2.28 (tt, <sup>3</sup>J<sub>H3H4</sub> = 6.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3H2</sub> = 7.1 Hz, **H3**).

<sup>13</sup>C (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 144.1 (**C6**); 129.4 – 128.2 (**C7**, **C8**); 68.4 (**C6**); 47.5 (**C4**); 36.6 (**C2**); 34.0 (**C3**).

7.5.2 Synthese von 4-(6'-Aminopurin-9'-yl)-butansäurebenzylester (**13**)

MWG: 311.35 g/mol  
C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>

Analog zu einer literaturbekannten Vorschrift wurde die selektive Alkylierung von Adenin an N9 durchgeführt.<sup>160</sup> Adenin (3.0 g, 22.2 mmol) und Natriumhydrid (0,79 g einer 60 %igen Dispersion in Mineralöl, 21 mmol) wurden in 30 mL DMF suspendiert und 10 Minuten mit Ultraschall behandelt. Die farblose Suspension wurde für 2 Stunden bei 100 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde 4-Brombutansäurebenzylester (**12**, 6.5 g, 25.3 mmol) in 15 mL DMF hinzugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 48 Stunden bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt. Verbliebenes DMF wurde mittels Codestillation mit Toluol extrahiert. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH 4:1).

**Charakterisierung:**

farbloser Feststoff

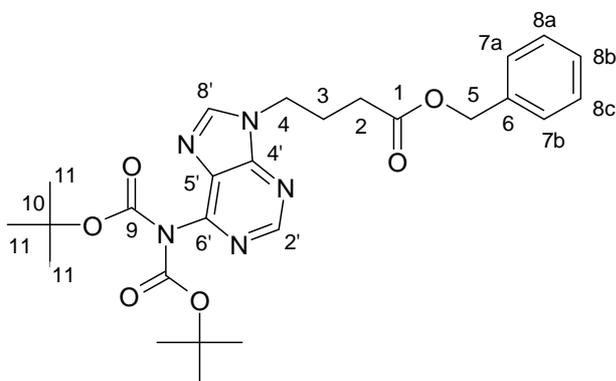
R<sub>f</sub>-Wert: 0.5 (DCM/EtOH 4:1)

Ausbeute: 4.14 g (13.3 mmol, 60 % bezogen auf 4-Brombutansäurebenzylester (**12**))

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.36 (s, 1H, **H2'**); 7.81 (s, 1H **H8'**); 7.43 - 7.32 (m, 5H, **H7**, **H8**); 5.98 (bs, 2H, **NH2**); 5.14 (s, 2H, **H5**); 4.30 (t, <sup>3</sup>J<sub>H4H3</sub> = 7.1 Hz, 1H, **H4**); 2.42 (t, <sup>3</sup>J<sub>H2H3</sub> = 6.9 Hz, 2H, **H2**); 2.27 (tt, <sup>3</sup>J<sub>H3H4</sub> = 7.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3H2</sub> = 6.9 Hz, 2H, **H3**).

<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 159.2 (**C6'**); 152.5 (**C2'**); 141.2 (**C4'**); 129.2 (**C8a**, **C8c**); 128.9 (**C7a**, **7b**, **C8b**); 128.7 (**C5'**); 67.1 (**C5**); 43.4 (**C4**); 31.3 (**C2**); 25.6 (**C3**).

### 7.5.3 Synthese von 4-[(*N,N*-Di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)]-butansäurebenzylester (**14**)



MWG: 497.56 g/mol  
C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>

5-(6'-Aminopurin-9'-yl)-butansäurebenzylester (**13**, 4.41 g, 13.3 mmol) und DMAP (181 mg, 1.36 mmol) wurden in THF (10 mL) gelöst und anschließend mit Di-*tert*-butyldicarbonat (6.4 mL, 30 mmol) versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 18 Stunden bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (EE/Hexan 1:1 – 1:0).

#### Charakterisierung:

farbloser Feststoff

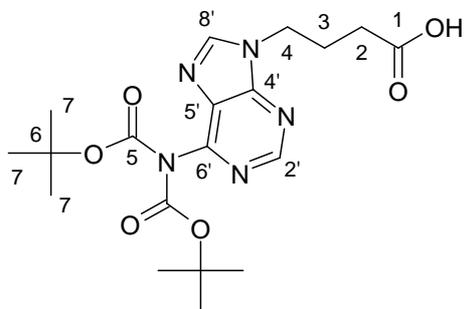
R<sub>f</sub>-Wert: 0.62 (EE)

Ausbeute: 6.2 g (12.5 mmol, 94 % bezogen auf 5-(6'-Aminopurin-9'-yl)-pentansäurebenzylester (**13**))

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.86 (s, 1H, **C2'**); 8.20 (s, 1H, **H8'**); 7.41 - 7.34 (m, 5H, **H7**, **H8**); 5.15 (s, 2H, **H5**); 4.39 (t, <sup>3</sup>J<sub>H4H3</sub> = 7.0 Hz, 2H, **H4**); 2.44 (t, <sup>3</sup>J<sub>H2H3</sub> = 6.8 Hz, 2H, **H2**); 2.30 (tt, <sup>3</sup>J<sub>H3H4</sub> = 7.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3H2</sub> = 6.8 Hz, **H3**); 1.48 (s, 18H, **H11**).

<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 172.5 (**C1**); 153.7 (**C6'**); 152.8 (**C2'**); 152.6 (**C9**); 150.8 (**C4'**); 150.5 (**C6**); 145.0 (**C8'**); 128.1 (**C8a**, **C8c**); 127.5 (**C7a**, **C7b**, **C8b**); 84.5 (**C10**); 67.1 (**C5**); 43.8 (**C4**); 31.2 (**C2**); 28.1 (**C11**); 25.8 (**C3**).

### 7.5.4 Synthese von 4-[(*N,N*-Di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)]-butansäure (**15**)



MWG: 421.46 g/mol  
C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>

4-[(*N,N*-Di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)]-butansäurebenzylester (**14**, 6.2 g, 12.5 mmol) wurden in 60 mL abs. Methanol gelöst und anschließend 150 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %ig) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 120 Stunden unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt und die Reaktion per TLC verfolgt. Das Produkt wurde über Kieselgel filtriert und säulenchromatographisch gereinigt (EE/PE 3:1).

#### Charakterisierung:

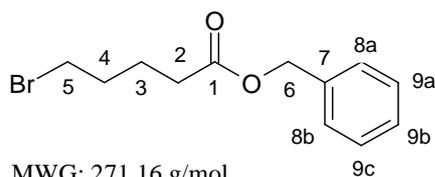
gelbliches Öl

R<sub>f</sub>-Wert: 0.62 (EE)

Ausbeute: 4.8 g (11.4 mmol, 91 % bezogen auf 4-[(*N,N*-Di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)]-butansäurebenzylester (**14**))

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.86 (s, 1H, **H2'**); 8.19 (s, 1H, **H8'**); 4.43 (t, <sup>3</sup>J<sub>H4H3</sub> = 7.1 Hz, **H4**); 2.46 (t, <sup>3</sup>J<sub>H2H3</sub> = 7.0 Hz, **H2**); 2.31 (tt, <sup>3</sup>J<sub>H3H4</sub> = 7.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3H2</sub> = 7.0 Hz, **H3**); 1.48 (s, 18H, **H7**).

<sup>13</sup>C (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 163.2 (**C1**); 156.6 (**C5**); 155.7 (**C6'**); 155.2 (**C2'**); 150.15 (**C4'**); 143.3 (**C8'**); 127.3 (**C5'**); 77.8 (**C7**); 44.1 (**C4**); 39.0 (**C2**); 36.9 (**C3**); 31.9 (**C7**).

7.5.5 Synthese von 5-Brompentansäurebenzylester (**18**)

MWG: 271.16 g/mol  
C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>BrO<sub>2</sub>

Die Synthese wurde in einer leicht modifizierten Variante zu einer literaturbekannten Synthese durchgeführt.<sup>180</sup> 5-Brompentansäure (5.0 g, 28 mmol) und DMAP (0,4 g, 3.2 mmol) wurden in THF gelöst. Bei 0 °C wurden Benzylalkohol (3.2 ml, 31.4 mmol) und DIC (4.3 mL, 26 mmol) in THF unter Schutzgas dazugegeben. Die klare Lösung wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht gerührt. Nach Zugabe von 10 mL dest. H<sub>2</sub>O wurden die Lösungsmittel entfernt und der verbliebene Rückstand in EE/H<sub>2</sub>O 1:1 (je 100 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit je 50 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden vom Lösungsmittel befreit und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (EE/Hexan 1:9).

**Charakterisierung:**

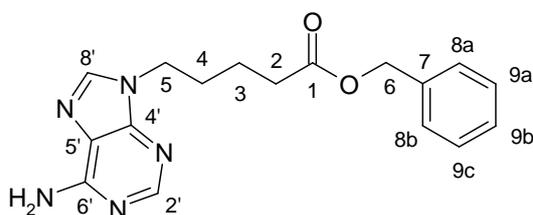
farbloses Öl

R<sub>f</sub>-Wert: 0.6 (EE/Hexan 1:9)

Ausbeute: 4.52 g (16.7 mmol, 60 % bezogen auf 5-Brompentansäure)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.39 - 7.32 (m, 5H **H8**, **H9**); 5.12 (s, 2H, **H6**); 3.40 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 2H, **H5**); 2.40 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = Hz, 2H, **H2**), 1.93 – 1.87 (m, 2H, **H4**); 1.84 – 1.78 (m, 2H, **H3**).

<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [pm] = 173.4 (**C1**); 136.5 (**C7**); 129.0 (**C9a**, **C9c**); 128.7 (**C9b**); 128.6 (**C8**); 66.7 (**C6**); 33.6 (**C5**); 33.4 (**C2**); 33.3 (**C4**); 23.9 (**C3**).

7.5.6 Synthese von 5-(6'-Aminopurin-9'-yl)-pentansäurebenzylester (**19**)

MWG: 325.37 g/mol  
C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>

Analog zu einer literaturbekannten Vorschrift wurde die selektive Alkylierung von Adenin an N9 durchgeführt.<sup>160</sup> Adenin (2.25 g, 16.7 mmol) und Natriumhydrid (0,64 g einer 60 %igen Dispersion in Mineralöl, 16 mmol) wurden in 40 mL DMF suspendiert und 10 Minuten mit Ultraschall behandelt. Die farblose Suspension wurde für 2 Stunden bei 100 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde 5-Brompentansäurebenzylester (**18**, 4.52 g, 16.7 mmol) in 20 mL DMF hinzugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 48 Stunden bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt. Verbliebenes DMF wurde mittels Codestillation mit Toluol extrahiert. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH 9:1).

**Charakterisierung:**

farbloser Feststoff

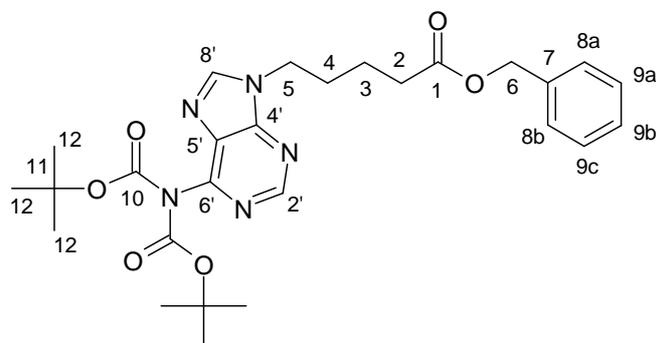
R<sub>f</sub>-Wert: 0.44 (DCM/MeOH 9:1)

Ausbeute: 3.25 g (9.99 mmol, 60 % bezogen auf 5-Brompentansäurebenzylester (**18**))

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.36 (s, 1H, **H2'**); 7.76 (s, 1H **H8'**); 7.38 - 7.30 (m, 5H, **H8,H9**); 5.68 (bs, 2H, **NH2**); 5.11 (s, 2H, **H6**); 4.20 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, 2H, **H5**); 2.42 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, 2H, **H2**); 1.97 - 1.91 (m, 2H, **H4**); 1.73 - 1.67 (m, 2H, **H3**).

<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 173.0 (**C1**); 155.9 (**C6'**); 155.3 (**C4'**); 153.4 (**C3'**); 140.7 (**C7**); 136.2 (**C8'**); 128.7 (**C9a, C9c**); 128.6 (**8a, 8b, 9b**); 113.8 (**C5'**); 66.8 (**C6**); 63.6 (**C5**); 43.9 (**C2**); 28.8 (**C4**); 22.4 (**C3**).

### 7.5.7 Synthese von 5-[(*N,N*-Di-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)]-pentansäurebenzylester (**20**)



MWG: 525.61 g/mol  
C<sub>27</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>

5-(6'-Aminopurin-9'-yl)-pentansäurebenzylester (**19**, 500 mg, 1.54 mmol) und DMAP (21 mg, 0.17 mmol) wurden in THF (10 mL) gelöst und anschließend mit Di-*tert*-butyldicarbonat (1.6 mL, 7.5 mmol) versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 18 Stunden bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (EE/Hexan 1:1 – 1:0).

#### Charakterisierung:

farbloser Feststoff

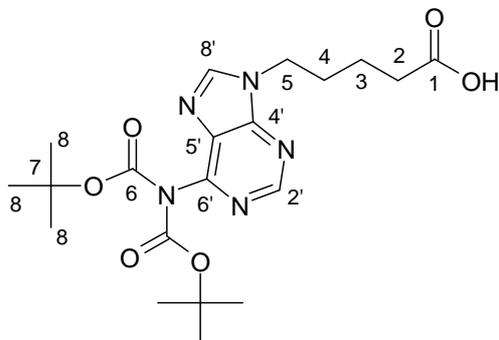
R<sub>f</sub>-Wert: 0.44 (DCM/MeOH 9:1)

Ausbeute: 780 mg (1.48 mmol, 96 % bezogen auf 5-(6'-Aminopurin-9'-yl)-pentansäurebenzylester (**19**))

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.85 (s, 1H, **H2'**); 8.04 (s, 1H, **H8'**); 7.38 – 7.30 (m, 5H, **H8, H9**); 5.11 (s, 2H, **H6**); 4.28 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, 2H, **H5**); 2.43 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, 2H, **H2**); 2.00 – 1.94 (m, 2H, **H4**); 1.74 – 1.68 (m, 2H, **H3**); 1.45 (s, 18H, **H12**).

<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 173.2 (**C1**); 156.2 (**C6'**); 152.5 (**C2'**); 150.8 (**C10**); 150.7 (**C4**); 144.9 (**C8'**); 129.0 (**C9a, C9c**); 128.7 (**8a, 8b, 9b**); 100.2 (**C5**); 84.2 (**C11**); 66.8 (**C7**); 44.3 (**C5**); 33.8 (**C2**); 29.7 (**C4**); 28.2 (**C12**); 22.3 (**C3**).

### 7.5.8 Synthese von 5-[(*N,N*-Di-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)]-pentansäure (21)



MWG: 435.48 g/mol  
C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>

5-[(*N,N*-Di-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)]-pentansäurebenzylester (**20**, 1.5 g 3.6 mmol) wurden in 60 mL abs. Methanol gelöst und anschließend 15 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %ig) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 120 Stunden unter einer Wasserstoffatmosphäre (1.5 bar) gerührt und die Reaktion per DLC verfolgt. Das Produkt wurde über Kieselgel filtriert und säulenchromatographisch gereinigt (EE/PE 3:1).

#### Charakterisierung:

gelbliches Öl

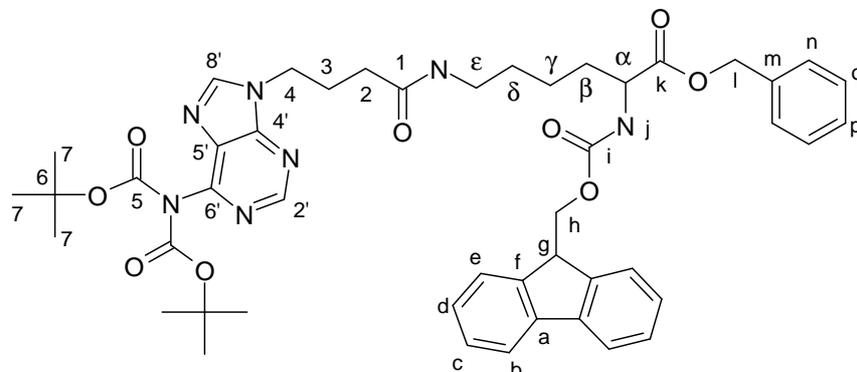
R<sub>f</sub>-Wert: 0.62 (EE)

Ausbeute: 1.41 g (3.2 mmol, 89 % bezogen auf 5-[(*N,N*-Di-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)]-pentansäurebenzylester (**20**))

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 8.89 (s, 1H, **H2'**); 8.28 (s, 1H, **H8'**); 4.35 (t, <sup>3</sup>J<sub>H5H4</sub> = 6.9 Hz, **H5**); 2.42 (t, <sup>3</sup>J<sub>H2H3</sub> = 6.8 Hz, **H2**); 2.09 - 2.01 (m, 2H, **H3**); 1.76 - 1.68 (m, 2H, **H4**); 1.47 (s, 18H, **H8**)

<sup>13</sup>C (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 177.8 (**C1**); 153.9 (**C6**); 153.6 (**C6'**); 152.6 (**C2'**); 150.8 (**C4'**); 145.2 (**C8**); 129.2 (**C5'**); 100.6 (**C5**); 84.5 (**C7**); 59.3 (**C5**); 44.3 (**C2**); 33.5 (**C4**); 22.3 (**C3**).

### 7.5.9 Synthese von $N_{\alpha}$ -Fluorenylmethyloxycarbonyl- $N_{\epsilon}$ -(4-[ $N,N$ -di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)]-butylcarbonyl)-L-lysinbenzylester (**16**)



MWG: 862.00 g/mol  
C<sub>47</sub>H<sub>55</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>

TBTU (2.26 g, 7.95 mmol) wurde in DMF gelöst und mit DIPEA (1320  $\mu$ L, 8.94 mmol) versetzt. Diese Lösung wurde umgehend zu Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-Lysin-benzylester (**35**, 2.25 g, 4.91 mmol) in DMF gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 4-[( $N,N$ -Di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)]-butansäurebenzylester (**15**, 1.4 g, 3.3 mmol). Nachdem die Reaktionslösung 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde, erfolgte die Entfernung des Lösungsmittels. Verbliebene Reste von DMF wurden mittels Codestillation mit Toluol entfernt. Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch (PE/EE 1:15 - 1:10).

#### Charakterisierung:

farbloser Feststoff

Zersetzungstemperatur: 96 – 99 °C

Drehwert (CHCl<sub>3</sub>):  $[\alpha]_{20}^D = -2.9^\circ$

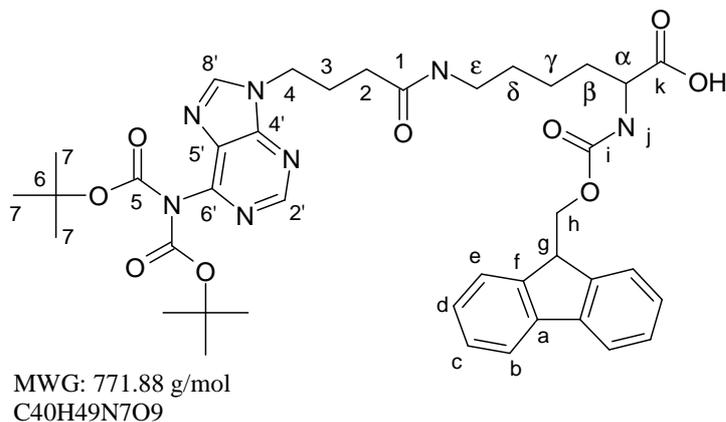
R<sub>f</sub>-Wert: 0.3 (EE)

Ausbeute: 1.78 g (2.1 mmol, 64 % bezogen auf 4-[( $N,N$ -Di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)]-butansäurebenzylester (**15**))

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8.83 (s, 1H, **H2'**); 8.18 (s, 1H, **H8'**); 7.75 (d,  $^3J_{\text{HaHb}} = 7.5$  Hz, 2H, **Ha**); 7.59 (d,  $^3J_{\text{HeHd}} = 6.0$  Hz, 2H, **He**); 7.38 (d,  $^3J_{\text{HCHB}} = 7.4$  Hz,  $^3J_{\text{HCHd}} = 7.4$  Hz, 2H, **Hc**); 7.34 - 7.28 (m, 7H, **Hd**, **Hn**, **Ho**, **Hp**); 6.03 (t,  $^3J_{\text{NHeHe}} = 5.0$  Hz, 1H, **NHe**); 5.51 (d,  $^3J_{\text{HjHk}} = 8.1$  Hz, 1H, **Hj**); 5.18 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 12.2$  Hz, 2H, **Hl**); 4.43 - 4.30 (m, 5H, **Hh**, **H $\alpha$** , **H4**); 4.21 (t,  $^3J_{\text{HgHh}} = 7.01$  Hz, 1H, **Hg**); 3.21 (dd,  $^3J_{\text{HeNHc}} = 5.9$ ,  $^3J_{\text{HeHd}} = 5.9$ , 2H, **He**); 2.23 - 2.14 (m, 2H, **H3**); 2.12 (t,  $^3J_{\text{H2H3}} = 6.3$  Hz, 2H, **H2**); 1.91 - 1.84 (m, 1H, **H $\beta$ a**); 1.76 - 1.65 (m, 1H, **H $\beta$ b**); 1.58 - 1.49 (m, 2H, **H $\delta$** ); 1.45 (s, 18H, **H7**); 1.41 1.33 (m, 2H, **H $\gamma$** ).

$^{13}\text{C}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 172.44 (**C1**); 171.5 (**Ck**), 156.4 (**Ci**); 153.6 (**C5**); 152.1 (**C2'**); 151.8 (**C6'**); 150.46 (**C4'**); 144.1 (**Cf**); 143.7 (**Ca**) 141.1 (**Cm**); 135.4 (**C8'**); 128.8 (**Co**); 128.7 (**Cb**); 128.5 (**Ce**); 127.9 (**Cc**); 127.3 (**Cd**); 125.3 (**Cn**); 125.2 (**Ce**); 120.1 (**C5'**); 84.1 (**C6**); 67.4 (**Cl**); 67.2 (**Ch**); 53.5 (**Cg**); 47.2 (**C $\alpha$** ); 43.5.0 (**C4**); 39.2 (**C $\epsilon$** ); 32.8 (**C2**); 32.3 (**C $\beta$** ); 29.0 (**C $\delta$** ); 27.9 (**C7**); 26.1 (**C3**); 22.6 (**C $\gamma$** ).

### 7.5.10 Synthese von $N_\alpha$ -Fluorenylmethyloxycarbonyl- $N_\epsilon$ -(4-[ $N$ , $N$ -di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)]-butylcarbonyl)-L-lysin (17)



$N_\alpha$ -Fluorenylmethyloxycarbonyl- $N_\epsilon$ -(4-[ $N$ ,  $N$ -di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)]-butylcarbonyl)-L-lysinbenzylester (**16**, 1.7 g, 2.0 mmol) wurde in 40 mL abs. Methanol gelöst und anschließend 150 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %ig) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 100 Stunden unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt und die Reaktion per DLC verfolgt. Das Produkt wurde über Kieselgel filtriert und säulenchromatographisch gereinigt (EE/PE 6:1).

**Charakterisierung:**

farbloser Feststoff

Zersetzungstemperatur: 96 – 99 °C

Drehwert (CHCl<sub>3</sub>):  $[\alpha]_{20}^D = -2.9^\circ$

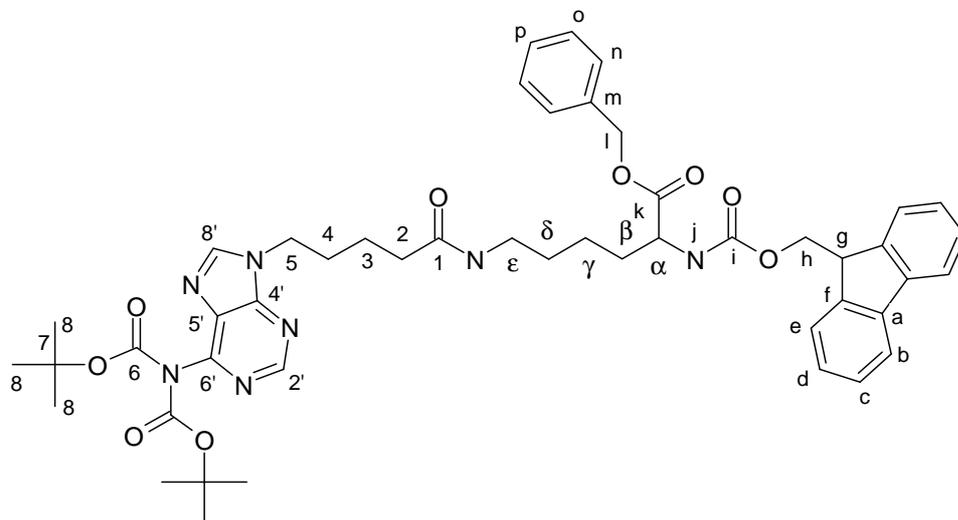
R<sub>f</sub>-Wert: 0.8 (MeOH)

Ausbeute: 1.4 g (1.9 mmol, 95 % bezogen auf N<sub>α</sub>-Fluorenylmethyloxycarbonyl-N<sub>ε</sub>-(4-(di-*tert*-butyloxy-carbonyl-aminopurin-9-yl)-butylcarbonyl-L-lysinbenzylester (**16**))

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): 8.95 (s, 1H, **H2'**); 8.64 (s, 1H, **H8'**); 7.9 (d, <sup>3</sup>J<sub>HbHc</sub> = 7.51 Hz, 2H, **Hb**); 7.78 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.7, 2H, **He**); 7.33 (t, <sup>3</sup>J<sub>HdHe</sub> = 7.45, <sup>3</sup>J<sub>HdHc</sub> = 7.45, 2H, **Hd**); 7.26 (t, <sup>3</sup>J<sub>HcHd</sub> = 7.45, <sup>3</sup>J<sub>HcHb</sub> = 7.45, 2H, **Hc**); 4.58 - 4.41 (m, 4H, **Hh**, **H4**); 4.34 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.92 Hz, 1H, **Hg**); 4.29 - 4.22 (m, 1H, **Hα**); 3.26 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6, 2H, **He**); 2.35 - 2.30 (m, 4H, **H2**, **H3**); 2.05 - 1.91 (m, 1H, **Hβa**); 1.83 - 1.74 (m, 1H, **Hβb**); 1.44 - 1.37 (m, 20H, **Hδ**, **H7**).

<sup>13</sup>C (126 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 177.8 (**Ck**); 168.5 (**C1**); 154.0 (**Ci**); 153.2 (**C5**); 152.76 (**C2'**); 151.3 (**C4'**); 145.9 (**Cf**); 143.7 (**C8'**); 139.9 (**Ca**); 129.8 (**Ce**); 129.2 (**Cb**); 127.3 (**Cd**); 127.2 (**Cc**); 122.0 (**C5'**); 86.3 (**C6**); 69.0 (**Ch**); 49.5 (**Cα**); 46.77 (**Cg**); 45.9 (**C4**); 41.2 (**Cε**); 34.7 (**C2**); 33.5 (**Cβ**); 30.9 (**Cδ**); 29.1 (**C7**); 27.9 (**C3**); 25.4 (**Cγ**).

### 7.5.11 Synthese von $N_{\alpha}$ -Fluorenylmethyloxycarbonyl- $N_{\epsilon}$ -(5-[ $N$ , $N$ -di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)-pentylcarboxonyl]-L-lysinbenzylester (**22**)



MWG: 876.03 g/mol  
C<sub>48</sub>H<sub>57</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>

TBTU (2.25 g, 7.95 mmol) wurde in DMF gelöst und mit DIPEA (1320  $\mu$ L, 8.94 mmol) versetzt. Diese Lösung wurde umgehend zu Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-Lysin-benzylester (**35**, 2.25 g, 4.91 mmol) in DMF gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5-[( $N$ ,  $N$ -Di-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)]-pentansäure (**21**, 1.5 g, 3.4 mmol). Nachdem die Reaktionslösung 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde, erfolgte die Entfernung des Lösungsmittels. Verbliebene Reste von DMF wurden mittels Codestillation mit Toluol entfernt. Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch (PE/EE 1:15 - 1:10).

#### Charakterisierung:

farbloser Feststoff

Zersetzungstemperatur: 92-96 °C

Drehwert (CHCl<sub>3</sub>):  $[\alpha]_{20}^D = -3.6^\circ$

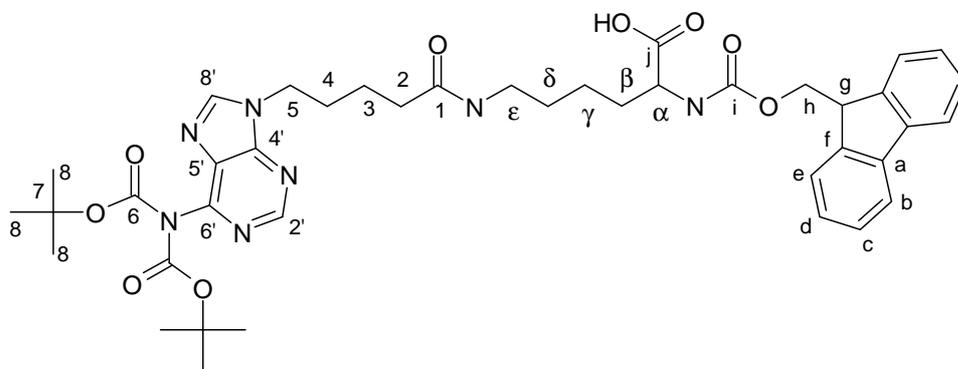
R<sub>f</sub>-Wert: 0.84 (MeOH/EE 1:1)

Ausbeute: 1.3 g (1.5 mmol, 44 % bezogen auf 5-[( $N$ ,  $N$ -Di-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)]-pentansäure (**21**))

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8.82 (s, 1H, **H2'**); 8.03 (s, 1H, **H8'**); 7.74 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 7.5$  Hz, 2H, **Ha**); 7.58 (m, 2H, **He**); 7.40 - 7.28 m, 9H, **Hc**, **Hd**, **Hn**, **Ho**, **Hp**); 5.65 (t,  $^3J_{\text{NH}\epsilon\text{H}\epsilon} = 5.0$  Hz, 1H, **NH\epsilon**); 5.55 (d,  $^3J_{\text{HjH}\alpha} = 8.1$  Hz, 1H, **Hj**); 5.22 - 5.13 (m, 2H, **Hi**); 4.44 - 4.32 (m, 3H, **H\alpha**, **Hh**); 4.23 - 4.19 (m, 3H, **Hg**, **H5**); 3.19 - 3.14 (m, 2H, **H\epsilon**); 2.12 (t,  $^3J_{\text{H2H3}} = 7.2$  Hz, 2H, **H2**); 1.93 - 1.82 (m, 2H, **H4**); 1.74 - 1.61 (m, 4H, **H3**, **H\beta**); 1.50 - 1.40 (m, 20H, **H\delta**, **H8**); 1.37 - 1.25 (m, 2H, **H\gamma**).

$^{13}\text{C}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 172.1 (**C1**); 172.0 (**Ck**); 156.0 (**Ci**); 153.3 (**C6**); 151.8 (**C2'**); 150.5 (**C4'**); 150.2 (); 143.7(**Cf**); 143.5 (**Ca**); 141.1 (**C8'**); 135.1 (**Cm**); 128.5 (**Co**); 128.4 (**Ce**); 128.2 (**Cb**); 127.6 (**Cd**); 129.9 (**Cp**); 125.0 (**Cn**); 124.9 (**Cc**); 119.9 (**C5'**); 83.6 (**C7**); 67.1 (**Cl**); 66.9 (**Ch**); 53.5 (**Cg**); 47.0 (**C\alpha**); 43.7 (**C5**); 38.8 (**C\epsilon**); 35.3 (**C2**); 32.0 (**C\beta**); 29.2 (**C\delta**); 28.7 (**C4**); 27.7 (**C8**); 22.4 (**C3**); 22.2 (**C\gamma**).

### 7.5.12 Synthese von $N_\alpha$ -Fluorenylmethyloxycarbonyl- $N_\epsilon$ -(5-[ $N$ , $N$ -di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)-pentylcarbonyl-L-lysin (23)



MWG: 785.91 g/mol  
C<sub>41</sub>H<sub>51</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>

$N_\alpha$ -Fluorenylmethyloxycarbonyl- $N_\epsilon$ -(5-[ $N$ ,  $N$ -di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-(6'-aminopurin-9'-yl)-pentylcarbonyl-L-lysinbenzylester (**22**, 1.3 g, 1.5 mmol) wurde in 40 mL abs. Methanol gelöst und anschließend 150 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %ig) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 100 Stunden unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt und die Reaktion per DLC verfolgt. Das Produkt wurde über Kieselgel filtriert und säulenchromatographisch gereinigt (EE/PE 5:1).

**Charakterisierung:**

farbloser Feststoff

Zersetzungstemperatur: 93 – 97 °C

Drehwert (CHCl<sub>3</sub>):  $[\alpha]_{20}^D = -2.9^\circ$

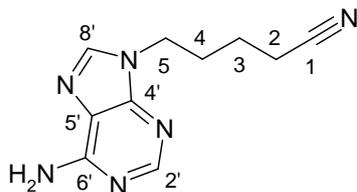
R<sub>f</sub>-Wert: 0.84 (MeOH/EE 1:1)

Ausbeute: 1.1 g (1.4 mmol, 95 % bezogen auf *N*<sub>α</sub>-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*N*<sub>ε</sub>-(4-(di-*tert*-butyloxy-carbonyl-aminopurin-9-yl)-pentyl-carbonyl-L-lysinbenzylester (**22**))

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): 8.94 (s, 1H, **H2'**); 8.64 (s, 1H, **H8'**); 7.89 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HbHc</sub> = 7.9 Hz, 2H, **Hb**); 7.79 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>HeHd</sub> = 7.5, 2H, **Ce**); 7.48 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, 2H, **Cd**); 7.41 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, 2H, **Cc**); 4.58 - 4.41 (m, 4H, **Hh**, **H5**); 4.34 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>HgHh</sub> = 7.0 Hz, 1H, **Hg**); 4.30 - 4.22 (m, 1H, **Hα**); 3.27 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6.6 Hz, 2H, **Hε**); 2.32 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = Hz, 2H **H2**); 2.12 - 1.91 (m, 3H, **H4**, **Hβa**); 1.88 - 1.76 (m, 1H **Hβb**); 1.76 - 1.66 (m, 2H, **H3**); 1.66 1.58 (m, 2H, **Hδ**); 1.58 1.52 (m, 2H, **Hγ**); 1.49 (s, 18H, **C8**).

<sup>13</sup>C (126 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 176.39 (**Cj**); 167.2 (**C1**); 156.0 (**ci**); 154.0 (**C2'**); 152.5 (**C6**); 151.9 (**C6'**); 149.28 (**C8'**); 146.4 (**C4'**); 146.15 (**Cf**); 143.6 (**Cf**); 131.1 (**Ca**); 129.8 (**Ce**); 129.2 (**Cb**); 127.3 (**Cd**); 127.2 (**Cc**); 121.9 (**C5'**); 86.3 (**C7**); 69.0 (**Ch**); 49.5 (**Cg**); 46.1 (**C5**); 41.1 (**Cε**); 37.3 (**C2**); 33.4 (**Cβ**); 31.3 (**Cδ**); 30.9 (**C4**); 29.0 (**C8**); 25.3 (**C3**); 25.0 (**Cγ**).

## 7.5.13 Synthese von 5-(6-Amino-purin-9-yl)-pentannitril (24)



MWG: 216.25 g/mol  
C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub>

Unter Stickstoff wurden Adenin (3.2 g, 24 mmol) und Natriumhydrid (0,92 g einer 60 %igen Dispersion in Mineralöl, 24 mmol) in 60 mL abs. DMF gelöst und 10 Minuten mit Ultraschall behandelt. Die dickflüssige Suspension wurde anschließend für 2 Stunden auf 100 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde 5-Bromvaleronitril (4.2 g, 26 mmol) in 6 mL DMF hinzugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 48 Stunden bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt. Verbliebenes DMF wurde mittels Codestillation mit Toluol extrahiert. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH 4:1).

**Charakterisierung:**

gelbliches Öl

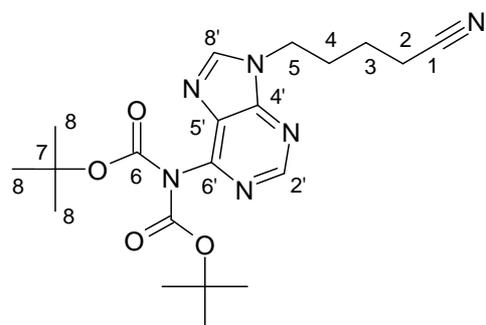
R<sub>f</sub>-Wert: 0.46 (DCM/EtOH 4:1)

Ausbeute: 2.9 g (14 mmol, 58 % bezogen auf Adenin)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 8.38 (s, 1H, **H2'**); 8.27 (s, 1H, **H8'**); 5.70 (bs, 2H, **NH<sub>2</sub>**); 4.29 (t, <sup>3</sup>J<sub>H5H4</sub> = 6.9 Hz, 2H, **H5**); 2.46 (t, <sup>3</sup>J<sub>H2H3</sub> = 7.1 Hz, 2H, **H2**); 2.15 - 2.08 (m, 2H, **H4**); 1.76 - 1.69 (m, 2H, **H3**).

<sup>13</sup>C (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 155.1 (**C2'**); 153.5 (**C6'**); 147.5 (**C4**); 140.1 (**C8'**); 124.9 (**C6'**); 111.4 (**C1**); 43.1 (**C5**); 29.6 (**C4**); 22.8 (**C3**); 16.7 (**C2**).

### 7.5.14 Synthese von 5-[*N*, *N*-Di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-(6'-amino-purin-9'-yl)]-pentannitril (**25**)



MWG: 416.48 g/mol  
C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>

5-(6-Amino-purin-9-yl)-pentannitril (**24**, 2.9 g, 14 mmol) und Dimethylaminopyridin (540 mg, 4.4 mmol) wurden in THF (100 mL) gelöst und anschließend mit Di-*tert*-butyldicarbonat (7.8 mL, 35 mmol) versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 18 Stunden bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (EE).

#### Charakterisierung:

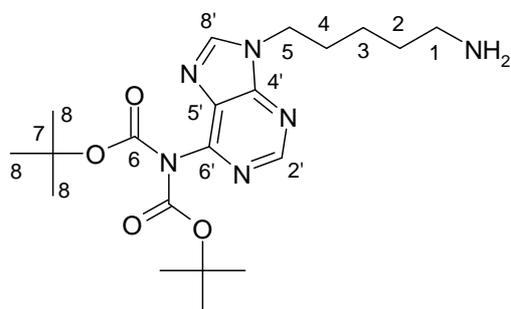
gelbliches Öl

R<sub>f</sub>-Wert: 0.6 (EE)

Ausbeute: 5.6 g (13.4 mmol, 96 % bezogen auf 5-(6-Amino-purin-9-yl)-pentannitril (**24**))

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.85 (s, 1H, **H2'**); 8.10 (s, 1H **H8'**); 4.35 (t, <sup>3</sup>J<sub>H5H4</sub> = 7.1 Hz, 2H, **H5**); 2.44 (t, <sup>3</sup>J<sub>H2H3</sub> = 7.0 Hz, 2H, **H2**); 2.15 - 2.09 (m, 2H, **H4**); 1.74 - 1.68 (m, 2H, **H3**); 1.46 (s, 18H, **H8**).

### 7.5.15 Synthese von 5-[*N, N*-Di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-(6'-amino-purin-9'-yl)]-pentanamin (26)



MWG: 420.52 g/mol  
C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>

5-[*N, N*-Di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-(6'-amino-purin-9'-yl)]-pentannitril (**25**, 2.0 g, 4.9 mmol) wurde in 200 mL Ethanol gelöst. Nickelchlorid(II)-Hexahydrat (2.4 g, 10 mmol) und Natriumborhydrid (1.8 g, 47.5 mmol) wurden hinzugegeben und 40 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde vom Niederschlag abfiltriert und das Filtrat nach dem Aufnehmen in Dichlormethan mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (EE/DCM 9:1).

#### Charakterisierung:

gelbliches Öl

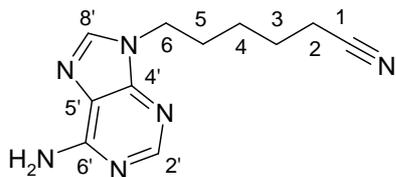
R<sub>f</sub>-Wert: 0.4 (EE)

Ausbeute: 300 mg (0.713 mmol, 15 % bezogen auf 5-[*N, N*-Di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-(6'-amino-purin-9'-yl)]-pentannitril (**25**))

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 8.58 (s, 1H, **H2'**); 8.32 (s, 1H, **H8'**); 4.33 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2, 2H, **H5**); 3.03 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 2H, **H1**); 1.95 (m, 2H, **H4**); 1.60 (s, 9H, **H8a**); 1.51 (m, 2H, **2H**); 1.42 (s, 9H, **H8b**); 1.35 (m, 2H, **H3**).

<sup>13</sup>C (126 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 154.1 (**C2'**); 153.5 (**C6**); 152.3 (**C6'**); 140.2 (**C4'**); 140.8 (**C8'**); 83.8 (**C7**); 46.1 (**C5**); 42.1 (**C1**); 31.7 (**C2**); 31.4 (**C4**); 29.8 (**C8a**); 29.5 (**C8b**); 25.8 (**C2**).

## 7.5.16 Synthese von 6-(6'-Amino-purin-9'-yl)-hexannitril (29)



MWG: 230.27 g/mol  
C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>6</sub>

Unter Stickstoff wurden Adenin (2.5 g, 18 mmol) und Natriumhydrid (0,7 g einer 60 %igen Dispersion in Mineralöl, 18 mmol) in 60 mL abs. DMF gelöst und 10 Minuten mit Ultraschall behandelt. Die dickflüssige Suspension wurde anschließend für 2 Stunden auf 100 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde 6-Bromhexannitril (3.5 mL, 20 mmol) in 6 mL DMF hinzugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 48 Stunden bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt. Verbliebenes DMF wurde mittels Codestillation mit Toluol extrahiert. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH 4:1).

**Charakterisierung:**

gelbliches Öl

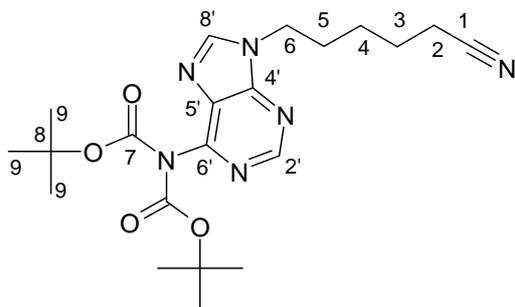
R<sub>f</sub>-Wert: 0.46 (DCM/EtOH 4:1)

Ausbeute: 2.3 g (11 mmol, 61 % bezogen auf Adenin)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): <sup>13</sup>C (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.39 (s, 1H, **H2'**); 7.83 (s, 1H, **H8'**); 5.70 (bs, 2H, **NH<sub>2</sub>**); 4.29 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9, 2H, **H6**); 2.46 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1, 2H, **H2**); 2.15 - 2.07 (m, 2H, **H5**); 1.76 - 1.68 (m, 2H, **H3**); 1.77 - 1.68 (m, 2H, **C4**).

<sup>13</sup>C (126 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 155.1 (**C2'**); 153.1 (**C6'**); 147.4 (**C4**); 141.2 (**C8'**); 124.8 (**C6'**); 111.4 (**C1**); 55.4 (**C6**); 43.1 (**C5**); 29.2 (**C4**); 22.4 (**C3**); 16.7 (**C2**).

### 7.5.17 Synthese von 6-[N, N-Di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-(6'-amino-purin-9'-yl)]-hexannitril (**30**)



MWG: 430.51 g/mol  
C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>

6-(6'-Amino-purin-9'-yl)-hexannitril (**29**, 2.2 g, 9.6 mmol) und Dimethylaminopyridin (360 mg, 2.9 mmol) wurden in THF (100 mL) gelöst und anschließend mit Di-*tert*-butyldicarbonat (5.2 mL, 23 mmol) versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 18 Stunden bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (EE).

#### Charakterisierung:

gelbliches Öl

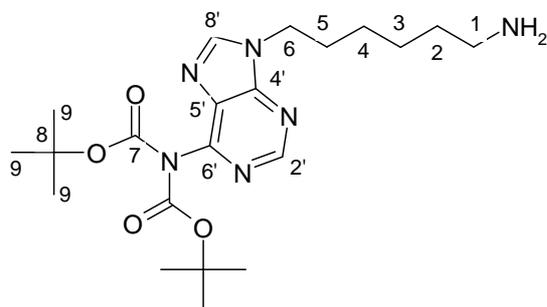
R<sub>f</sub>-Wert: 0.6 (EE)

Ausbeute: 3.9 g (9.2 mmol, 96 % bezogen auf 6-(6-Amino-purin-9-yl)-hexannitril (**29**))

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.89 (s, 1H, **H2'**); 8.40 (s, 1H, **H8'**); 4.37 (t, <sup>3</sup>J<sub>H6H5</sub> = 7.3, 2H, **H6**); 2.39 (t, <sup>3</sup>J<sub>H2H3</sub> = 6.9, 2H, **H2**); 2.01 - 1.99 (m, 2H, **H5**); 1.80 - 1.73 (m, 2H, **H3**); 1.59 - 1.53 (m, 2H **H4**); 1.50 (s, 18H, **H9**).

<sup>13</sup>C (126 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 153.6 (**C7**); 152.6 (**C2'**); 152.5 (**C6'**); 150.9 (**C4'**); 145.0 (**C8'**); 119.8 (**C5'**); 113.5 (**C1**); 84.5 (**C8**); 44.4 (**C6**); 29.7 (**C5**); 28.2 (**C9**); 26.2 (**C4**); 25.2 (**C3**); 17.6 (**C2**).

### 7.5.18 Synthese von 6-[*N*, *N*-Di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-(6'-amino-purin-9'-yl)]-hexanamin (31)



MWG: 434.54 g/mol  
C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>

6-[*N*, *N*-Di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-(6'-amino-purin-9'-yl)]-hexannitril (**30**, 2.0 g, 4.9 mmol) wurde in 200 mL Ethanol gelöst. Nickelchlorid(II)-Hexahydrat (2.4 g, 10 mmol) und Natriumborhydrid (1.8 g, 47.5 mmol) wurden hinzugegeben und 40 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde vom Niederschlag abfiltriert und das Filtrat nach dem Aufnehmen in Dichlormethan mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingeeignet. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (EE/DCM 9:1).

#### Charakterisierung:

gelbliches Öl

R<sub>f</sub>-Wert: 0.4 (EE)

Ausbeute: 300 mg (0.72 mmol, 15 % bezogen auf 6-[*N*, *N*-Di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-(6'-amino-purin-9'-yl)]-hexannitril)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.39 (s, 1H, **H2'**); 7.83 (s, 1H, **H8'**); 5.70 (bs, 2H, **NH<sub>2</sub>**); 4.29 (t, <sup>3</sup>J<sub>H6H5</sub> = 6.8, 2H, **H6**); 2.46 (t, <sup>3</sup>J<sub>H1H2</sub> = 7.1 Hz, 2H, **H1**); 1.16 - 1.07 (m, 2H, **H5**); 1.60 (s, 9H, **H9a**); 1.51 (m, 2H, **H2**); 1.42 (s, 9H, **H9b**); 1.35 (m, 2H, **H4**).

## 7.6 SPR-Mesungen

Alle Bindungsstudien wurden auf einem Biacore T100 Gerät durchgeführt. Um die Stabilität des Proteins zu gewährleisten, wurden die Konzentrationsreihen mit steril filtriertem und entgastem PBS-Puffer (50 mM PO<sub>4</sub>, 250 mM NaCl, pH 7.4) bei 298 K vermessen.

Vor der Immobilisierung musste das Protein umgepuffert werden, um das im Lagerpuffer vorhandene Tris(hydroxymethyl)-aminoethan zu entfernen. Andernfalls würde dieses mit dem deutlich niedriger konzentrierten Protein um die Bindungsstellen auf dem Chip konkurrieren, wodurch die Oberflächendichte von MARK negativ beeinflusst worden wäre. 20 µL der Stammlösung des Proteins (20 mg/mL) wurden in einem Zentricon (Ausschlussgröße: 10 kDa) mit PBS-Puffer auf 2 mL aufgefüllt und 45 Minuten bei 2000 U/pm und 4 °C zentrifugiert. Nach 8 Wiederholungen dieses Vorgangs wurde mittels eines Peqlab ND-100 NanoDrop-Gerätes die Proteinkonzentration auf 1.3 mg/mL bestimmt.

Zu Beginn jeder Messung wurden zur Stabilitätsprüfung des Gerätes 4 Injektionen mit reinem PBS-Puffer gemessen. Die eigentlichen Messreihen wurden in aufsteigender Konzentration und mit 2 Puffer-Messungen zum Nullabgleich durchgeführt. Es wurden 2 verschiedene ineinandergreifende Konzentrationsreihen vermessen, um Datenkonsistenz zu gewährleisten. Die Auswertung der Bindungskurven erfolgte sowohl durch die *Biacore T100 Evaluation Software* als auch mittels Origin, welches zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels des *one-site-binding*-Modells herangezogen wurde.

### 7.6.1 Immobilisierung von MARK

Als Messzelle diente ein Biacore CM5-Chip mit carboxylierter Dextranmatrix. Bei einer Flussrate von 10 µL/min wurden die Flusszellen Fc1 und Fc2 mit einer Mischung aus EDC (0.1 M) und NHS (0.1 M) über einen Zeitraum von 15 Minuten aktiviert, was zu einer RU-Antwort von etwa 200 führte.

Unmittelbar nach der Aktivierung wurden innerhalb von 900 Sekunden 285 µL Protein (0.4 mg/mL) über die aktivierte Oberfläche in Messzelle Fc2 geleitet. Zum Inaktivieren der freien Carboxylgruppen wurde im Anschluss an die Immobilisierung ein *capping* mit Ethanolamin-HCl (1 M, 7 Minuten) in beiden Messzellen durchgeführt. Auf diese Weise wurde eine RU-Differenz zwischen Fc2 und Fc1 von 2292 RU erzeugt, was einer Menge von 59 fmol und

einer maximal zu erwartenden RU-Antwort von  $RU_{\max} = 105$  (siehe Gleichung 2, Seite 29) entspricht.

### 7.6.2 Konzentrationsreihen

Die Vermessung der verschiedenen Konzentrationsreihen erfolgte bei 25 °C in steril filtriertem und entgastem PBS-Puffer (50 mM  $PO_4$ , 250 mM NaCl, pH 7.4).

Peptide aus verschiedenen Zielsequenzen von MARK wurden in den Konzentrationen 0, 62.5, 125, 250, 500 und 1000  $\mu$ M vermessen. Innerhalb einer Kontaktzeit von 11 Minuten und bei einer Flussrate von 30  $\mu$ L/min wurden die Bindungsereignisse vermessen, gefolgt von einer Dissoziationszeit von 180 Sekunden und einer Regenerationszeit von 25 Sekunden. Die Regeneration erfolgte über 24 Sekunden mit 0.1 M NaOH gefolgt von einer 20 Sekunden andauernden Stabilisierungsperiode.

Die mit modifizierten Aminosäurebausteinen ausgestatteten Peptide wurden in folgenden Konzentrationen vermessen: 0; 3.9; 5.2; 7.8; 10.4; 15.6; 20.8; 31.25; 41.6; 62.5; 83.3; 125.0; 166.6; 250.0 und 500.0  $\mu$ M. Bei einer Flussrate von 25  $\mu$ L/min wurde über 240 Sekunden Peptid in das Messsystem injiziert. Nach der Assoziationsphase erfolgte eine Dissoziationsphase von 180 Sekunden und anschließend die Regeneration mit NaOH (0.1 M) innerhalb von 20 Sekunden, gefolgt von einer Stabilisierungsperiode von 20 Sekunden. Die Verdünnungsreihen wurden auf einer 96-well-Mikrotiterplatte ausgehend von einer 500 und einer 166  $\mu$ molaren Stammlösung angefertigt.

Die erste und die letzte Konzentrationsreihe, die im Rahmen eines automatisierten Ansatzes ermesselt wurden, bestanden aus jeweils 3 Konzentrationen (500, 250 und 125  $\mu$ M) eines Testpeptids. Dies ermöglichte die Beurteilung, ob sich das Protein auf der Chipoberfläche im Laufe der Messung verändert hat.

## 7.7 Kinase-Assays

### 7.7.1 Kinase-Assay mit radioaktiv dotiertem ATP

Um die Aktivität der synthetisierten potenziellen Inhibitoren zu untersuchen wurde ein Assay verwendet, der auf der Verwendung von radioaktiv dotiertem ATP beruht. Vermessen wurde die innerhalb eines Zeitraums von 30 Minuten auf das Peptid TR1 übertragene Radioaktivität, deren Menge in der Gegenwart von inhibitorisch wirkenden Substanzen variiert.

Der Messpuffer bestand aus NaPO<sub>4</sub> (25 mM), NaCl (100 mM), MgCl<sub>2</sub> (5 mM), EGTA (2 mM), DTT (1 mM), Benzamidin (1 mM) und PMSF (0.5 mM). Die inhibitorischen Substanzen wurden in einer Konzentration von 50 µM eingesetzt und mit Kinase (0.1 µg pro Ansatz bzw. 0.29 µM) über einen Zeitraum von 30 Minuten bei 30 °C vorinkubiert. Anschließend wurden das TR1-Peptid (100 µM) und ATP (100 µM) hinzugegeben. Durch die femtomolare Dotierung des ATPs mit [<sup>32</sup>P] in γ-Position (7.4\*10<sup>7</sup> MBq/mol) trägt ein Teil des von MARK phosphorylierten TR1-Peptides eine radioaktive Markierung.

*Tabelle 7.6-1: Zusammensetzung des Puffers für den Kinaseassay mit radioaktiv dotiertem ATP. Sowohl ATP als auch das auf dem ersten repeat basierende Substratpeptid und der potenzielle Inhibitor wurden in einer Konzentration von 50 µM eingesetzt.*

Substanz	Konzentration [mM]
Tris-HCl (pH 8.0)	50
NaCl	100
MgCl <sub>2</sub>	5
EDTA	2
DTT	1
Benzamidin	1
PMSF	0.5
ATP	0.05
TR1	0.05

Nach 30 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe des gleichen Volumens 20 %iger TCA gestoppt, und die Reaktionsansätze wurden einzeln auf Phosphozellulosefilter aufgetragen. Anschließend erfolgte das Waschen der Zellulose mit 0.1 M Phosphorsäure bis zur Konstanz der Radioaktivität. Der Zerfall des [<sup>32</sup>P]-markierten TR1-Peptides erfolgte im Szintillationszähler.

Um zu überprüfen, inwiefern andere Kinasen durch die auf MARK zugeschnittenen Peptide beeinflusst werden, wurde GSK3 als Modellkinase gewählt. Als Substrat wurde in diesem

Vergleich das deutlich größere Konstrukt hTau40 gewählt. Die Durchführung entsprach den oben genannten Parametern, jedoch wurde das Reaktionsgemisch durch Gelelektrophorese aufgetrennt, und die Radioaktivität der hTau40-Bande mit Hilfe eines Szintillationszählers der Firma Raytest (BAS3000) gemessen.

### 7.7.2 FRET-Assay

Um effizient Konzentrationsreihen der erfolgversprechenden Substanzen vermessen zu können wurde ein auf Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) basierendes Verfahren verwendet. Durch Phosphorylierung wird im Substrat eine Konformationsänderung induziert, die zwei Chromophore in räumliche Nähe zueinander bringt. Der dadurch ermöglichte FRET zwischen den Chromophoren erlaubt eine Echtzeitbeobachtung der Entstehung des Produktes. Die Substanzen **54**, **55**, **58**, **63**, **64** und **66** wurden in den Konzentrationen 0, 10, 50, 100, 200, 500 und 1000  $\mu\text{M}$  vermessen. Jeder Ansatz enthielt 0.01  $\mu\text{g}$  MARK, was einer Konzentration von 10 nM entspricht. ATP und das Substratkonstrukt lagen in Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  vor, als Negativkontrolle diente BSA. Über einen Zeitraum von 100 Minuten wurde alle 10 Minuten die Emission in einem Wellenlängenbereich von 460 nm bis 540 nm vermessen. Durch die Konformationsänderung im Substratkonstrukt verschiebt sich wie in Abschnitt 2.5 und 4.7 beschrieben die Emission von 480 nm auf 528 nm. Der Quotient der beiden Intensitäten ist ein Maß für den Umsatz der Reaktion.

$$\frac{\text{Intensität } [\lambda_{528}]}{\text{Intensität } [\lambda_{480}]} \approx \frac{\text{Produkt}}{\text{Edukt}}$$

Die Software XFluor4 V 4.40 wurde zum Messen und Aufzeichnen der Daten verwendet. Die Quotientenbildung und Auswertung erfolgte mit Excel und Origin.

## 8 Toxikologie

Substanz	Gefahrsymbole	R-Sätze	S-Sätze
Adenin	Xn	22	22-24/25
Acetanhydrid	C	10-20/22-34	26-36/37/39-45
Aceton	F	11	16-23.2-33
Acetonitril	F, T	11-23/24/25	16-27-45
2-Aminoethanol	Xn	20-36/37/38	-
Ammoniumhydrogencarbonat	Xn	22	-
<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N,N</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat	Xi	36/37/38	26
<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N,N</i> -tetramethyluronium-tetrafluoroborat	Xi	5/36/37/38	26-36
Ammoniumchlorid	Xn	22-36	(2-)22
4-Brombutansäure	C	22-34	20-23-26-36/37/39-45
5-Brompropansäure	C	22-34	20-23-26-36/37/39-45
5-Bromvaleronitril	Xn	20/21/22-36/37/38	26-36
6-Bromhexannitril	Xn	20/21/22-36/37/38	26-36
Butan-1-ol	Xn	10-22-37/38-41-67	9-13-26-37/39-46
Calciumchlorid	Xi	36	22-24
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycimtsäure	Xn	20/21/22-36/37/38	26-36
Deuteriumoxid	-	-	-
Dichlormethan**	Xn	40	23.2-24/25-36/37
Diethylether	F+, Xn	12-19-22-66-67	2-9-16-29-33
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Xn	22-36/37/38	26-36
4-(Dimethylamino)-pyridin	T	24/25-36/38	22-36/37-45
Dinatriumhydrogenphosphat	Xi	36/37/38	-
<i>N,N'</i> -Diisopropylethylamin	F, C	11-22-34-52/53	16-26-36/37/39-45-61
<i>N,N'</i> -Dimethylformamid*	T	61-20/21-36	53-45
Dimethylsulfoxid	Xi	36/38	26
Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat	T, Xi	26-36/38-43	26-28-36/37/39-45
Essigsäure	C	10-35	23.2-26-45
Ethanol	F	11	7-16
Fmoc-Aminosäuren	-	-	22-24/25
Hexan**	F, Xn, N	11-38-48/20-62-65-67-51/53	(2)-9-16-29-33-36/37-61-62

## Toxikologie

Substanz	Gefahrsymbole	R-Sätze	S-Sätze
N-Hydroxysuccinimid	-	-	24/25
Iod	Xn, N	20/21-	50 (2-)23-25-61
Kieselgel G60	-	-	-
Kupfer(I)-Chlorid	Xn, N	22-50/53	(2)-22-60-61
Magnesium	F	11-15	7/8-43.6
Methanol	F, T	11-23/24/25- 39/23/24/25	7-16-36/37-45
Natriumborhydrid	T, C, F	15-25-364	22-26/36/37/39- 43-45
Natriumcarbonat	Xi	36	(2-)20-26
Natriumhydrid	F	15	(2)-7/8-24/25- 43
Natriumhydrogencarbonat	-	-	-
Natriumhydroxid	C	35	26-37/39-45
Natriumsulfat	-	-	-
Petrolether 50-70	F, Xn, N	11-38-48/20-51/53- 62-65-67	16-23.2-24-33- 36/37-61-62
Palladium/Kohle	-	-	14-22
Piperidin	F, T	11-23/24-34	16-26-27-45
2-Propanol	F, Xi	11-36-67	(2)-7-16-24/25- 26
Pyridin	F, Xn	11-20/21/22	26-28.1
Salzsäure 37 %	C	34-37	26-36/37/39-45
Tetrahydrofuran	F, Xi	11-19-36/37	(2)-16-29-33
Toluol	F, Xn	11-38-48/20-63-65- 67	36/37-46-62
Triethylamin	F, C	11-20/21/22-35	3-16-26-29- 36/37/39-45
Trifluoressigsäure	C	20-35-52/53	9-26-27-28.1- 45-61
Triisopropylsilan	Xi	10-36/37/38	26-36

\* CMR-Stoff Kategorie 1: aus Erfahrung beim Menschen nachgewiesen

\*\* CMR-Stoff Kategorie 2: bei Tieren nachgewiesen, wird beim Menschen vermutet

\*\*\* CMR-Stoff Kategorie 3: die Wirkung beim Menschen wird angenommen

## 9 Literatur

1. A. Alzheimer, *Allg Z f Psychiatrie & Psychisch-gerichtl Med*, 1907, **64**, 146-148.
2. WHO, Alzheimer's Disease: The Brain Killer.
3. Alzheimer-Forschung-Initiative.
4. Netdokter.
5. NIA/NIH, 2005, 1-82.
6. D. Galasko, *Eur J Neurol*, 1998, **5**, 9-17.
7. P. Formichi, C. Battisti, E. Radi and A. Federico, *J Cell Physiol*, 2006, **208**, 39-46.
8. B. Ibach, H. Binder, M. Dragon, S. Poljansky, E. Haen, E. Schmitz, H. Koch, A. Putzhammer, H. Klunemann, W. Wieland and G. Hajak, *Neurobiol Aging*, 2006, **27**, 1202-1211.
9. C. Laske, E. Stransky, A. Fritsche, G. W. Eschweiler and T. Leyhe, *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2009, **259**, 80-85.
10. A. K. Wallin, K. Blennow, N. Andreasen and L. Minthon, *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2006, **21**, 131-138.
11. J. W. Lee, H. Namkoong, H. K. Kim, S. Kim, D. W. Hwang, H. R. Na, S. A. Ha, J. R. Kim and J. W. Kim, *BMC Neurol*, 2007, **7**, 14.
12. A. Hye, S. Lynham, M. Thambisetty, M. Causevic, J. Campbell, H. L. Byers, C. Hooper, F. Rijdsdijk, S. J. Tabrizi, S. Banner, C. E. Shaw, C. Foy, M. Poppe, N. Archer, G. Hamilton, J. Powell, R. G. Brown, P. Sham, M. Ward and S. Lovestone, *Brain*, 2006, **129**, 3042-3050.
13. D. A. Drachman, *Neurology*, 2006, **67**, 1340-1352.
14. journalMED, Volkswirtschaftliche Aspekte der Alzheimer-Therapie, <http://www.journalmed.de/newsview.php?id=9926>, Accessed 29.03.2006.
15. K. Urakami, *Nippon Ronen Igakkai Zasshi*, 2001, **38**, 117-120.
16. A. Kern and C. Behl, *Biochim Biophys Acta*, 2009, **10**, 1124-1132.
17. H. Braak, *Acta Neuropathol*, 1991, **82**, 239-259.
18. H. Braak and E. Braak, *Neurobiol Aging*, 1997, **18**, 351-357.
19. K. Aterman, *Histochemistry*, 1976, **49**, 131-143.
20. J. Kang and B. Muller-Hill, *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, **166**, 1192-1200.
21. D. J. Selkoe, *Trends Cell Biol*, 1998, **8**, 447-453.
22. Y. M. Li, *Mol Interv*, 2001, **1**, 198-207.
23. S. A. Small and S. Gandy, *Neuron*, 2006, **52**, 15-31.
24. X. He, K. Cooley, C. H. Chung, N. Dashti and J. Tang, *J Neurosci*, 2007, **27**, 4052-4060.
25. L. Rajendran, A. Schneider, G. Schlechtingen, S. Weidlich, J. Ries, T. Braxmeier, P. Schwille, J. B. Schulz, C. Schroeder, M. Simons, G. Jennings, H. J. Knolker and K. Simons, *Science*, 2008, **320**, 520-523.
26. NIA/NIH, 2002, 1-64.
27. D. Iacono, W. R. Markesbery, M. Gross, O. Pletnikova, G. Rudow, P. Zandi and J. C. Troncoso, *Neurology*, 2009, **73**, 665-673.
28. G. Schulz, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, 1998.
29. D. Giulian, L. Haverkamp, J. Yu, W. Karshin, D. Tom, J. Kirkpatrick, Y. Kuo and A. Roher, *J Neurosci*, 1996, **16**, 6021-6037.
30. T. Gomez-Isla, R. Hollister, H. West, S. Mui, J. H. Growdon, R. C. Petersen, J. E. Parisi and B. T. Hyman, *Ann Neurol*, 1997, **41**, 17-24.

31. H. G. Lee, X. Zhu, R. J. Castellani, A. Nunomura, G. Perry and M. A. Smith, *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, **321**, 823-829.
32. D. Morgan, *J Alzheimers Dis*, 2006, **9**, 425-432.
33. R. Lal, H. Lin and A. P. Quist, *Biochim Biophys Acta*, 2007, **1768**, 1966-1975.
34. H. Jang, J. Zheng and R. Nussinov, *Biophys J*, 2007, **93**, 1938-1949.
35. D. W. Cleveland and K. F. Sullivan, *Annu Rev Biochem*, 1985, **54**, 331-365.
36. M. D. Weingarten, A. H. Lockwood, S. Y. Hwo and M. W. Kirschner, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975, **72**, 1858-1862.
37. Klaus Werner Wolf and Konrad Joachim Böhm, *Biologie in unserer Zeit*, 1997, **27**, 87-95.
38. J. Al-Bassam, R. S. Ozer, D. Safer, S. Halpain and R. A. Milligan, *J Cell Biol*, 2002, **157**, 1187-1196.
39. G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter and S. Sudarsanam, *Science*, 2002, **298**, 1912-1934.
40. E. M. Mandelkow, E. Thies, B. Trinczek, J. Biernat and E. Mandelkow, *J Cell Biol*, 2004, **167**, 99-110.
41. G. Drewes, A. Ebnet, U. Preuss, E. M. Mandelkow and E. Mandelkow, *Cell*, 1997, **89**, 297-308.
42. T. Timm, X. Y. Li, J. Biernat, J. Jiao, E. Mandelkow, J. Vandekerckhove and E. M. Mandelkow, *EMBO J*, 2003, **22**, 5090-5101.
43. T. Timm, A. Marx, S. Panneerselvam, E. Mandelkow and E. M. Mandelkow, *BMC Neurosci*, 2008, **9** S9.
44. T. Timm, D. Matenia, X. Y. Li, B. Griesshaber and E. M. Mandelkow, *Neurodegener Dis*, 2006, **3**, 207-217.
45. T. Tanoue and E. Nishida, *Cell Signal*, 2003, **15**, 455-462.
46. S. Illenberger, G. Drewes, B. Trinczek, J. Biernat, H. E. Meyer, J. B. Olmsted, E. M. Mandelkow and E. Mandelkow, *J Biol Chem*, 1996, **271**, 10834-10843.
47. G. Drewes, B. Trinczek, S. Illenberger, J. Biernat, G. Schmitt-Ulms, H. E. Meyer, E. M. Mandelkow and E. Mandelkow, *J Biol Chem*, 1995, **270**, 7679-7688.
48. A. Ebnet, R. Godemann, K. Stamer, S. Illenberger, B. Trinczek and E. Mandelkow, *J Cell Biol*, 1998, **143**, 777-794.
49. M. Goedert, M. G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford and R. A. Crowther, *Neuron*, 1989, **3**, 519-526.
50. M. Goedert, M. G. Spillantini, M. C. Potier, J. Ulrich and R. A. Crowther, *Embo J*, 1989, **8**, 393-399.
51. M. Goedert, C. M. Wischik, R. A. Crowther, J. E. Walker and A. Klug, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**, 4051-4055.
52. A. Andreadis, W. M. Brown and K. S. Kosik, *Biochemistry*, 1992, **31**, 10626-10633.
53. K. A. Butner and M. W. Kirschner, *J Cell Biol*, 1991, **115**, 717-730.
54. N. Gustke, B. Trinczek, J. Biernat, E. M. Mandelkow and E. Mandelkow, *Biochemistry*, 1994, **33**, 9511-9522.
55. M. Goedert, M. G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford and R. A. Crowther, *Neuron*, 1989, **3**, 519-526.
56. D. W. Cleveland, S. Y. Hwo and M. W. Kirschner, *J Mol Biol*, 1977, **116**, 227-247.
57. E. M. Mandelkow and E. Mandelkow, *Trends Cell Biol*, 1998, **8**, 425-427.
58. J. E. Rickard and T. E. Kreis, *Trends Cell Biol*, 1996, **6**, 178-183.
59. M. Nangaku, R. Sato-Yoshitake, Y. Okada, Y. Noda, R. Takemura, H. Yamazaki and N. Hirokawa, *Cell*, 1994, **79**, 1209-1220.
60. P. J. Hollenbeck and J. A. Swanson, *Nature*, 1990, **346**, 864-866.

61. R. L. Morris and P. J. Hollenbeck, *J Cell Biol*, 1995, **131**, 1315-1326.
62. N. Hirokawa, *Curr Opin Struct Biol*, 1994, **6**, 74-81.
63. E. Mandelkow and E. M. Mandelkow, *Curr Opin Struct Biol*, 1995, **7**, 72-81.
64. B. Li, M. O. Chohan, I. Grundke-Iqbal and K. Iqbal, *Acta Neuropathol*, 2007, **113**, 501-511.
65. M. von Bergen, S. Barghorn, L. Li, A. Marx, J. Biernat, E. M. Mandelkow and E. Mandelkow, *J Biol Chem*, 2001, **276**, 48165-48174.
66. O. Schweers, E. M. Mandelkow, J. Biernat and E. Mandelkow, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**, 8463-8467.
67. J. Biernat, N. Gustke, G. Drewes, E. M. Mandelkow and E. Mandelkow, *Neuron*, 1993, **11**, 153-163.
68. A. Ebnet, G. Drewes, E. M. Mandelkow and E. Mandelkow, *Cell Motil Cytoskeleton*, 1999, **44**, 209-224.
69. H. Wille, G. Drewes, J. Biernat, E. M. Mandelkow and E. Mandelkow, *J Cell Biol*, 1992, **118**, 573-584.
70. J. Biernat, Y. Z. Wu, T. Timm, Q. Zheng-Fischhofer, E. Mandelkow, L. Meijer and E. M. Mandelkow, *Mol Biol Cell*, 2002, **13**, 4013-4028.
71. B. Lenz, C. Sidiropoulos, S. Bleich and J. Kornhuber, *Fortschr Neurol Psychiatr*, 2009, **77**, 289-294.
72. C. Lang, *Fortschr Med*, 1990, **108**, 678.
73. W. Poppe, H. Lauter and A. U. Tibilowna, *Psychiatr Neurol Med Psychol (Leipz)*, 1985, **37**, 518-528.
74. M. Wolfersdorf, C. Mauerer, M. Schuler, M. Purucker, F. J. Groenewald and P. Keller, *Psychiatr Prax*, 2003, **30** S75-77.
75. F. Hentschel, D. F. Braus, R. Zerfass and H. Forstl, *Rofo*, 1995, **163**, 88-90.
76. S. Anhaus, G. Niederwieser, R. M. Bonelli, P. Lind, F. Reisecker and P. Koltringer, *Nervenarzt*, 2000, **71**, 311-315.
77. P. I. Moreira, M. S. Santos and C. R. Oliveira, *Antioxid Redox Signal*, 2007, **9**, 1621-1630.
78. G. Aliev, H. H. Palacios, B. Walrafen, A. E. Lipsitt, M. E. Obrenovich and L. Morales, *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, **41**, 1989-2004.
79. Q. L. Ma, F. Yang, E. R. Rosario, O. J. Ubeda, W. Beech, D. J. Gant, P. P. Chen, B. Hudspeth, C. Chen, Y. Zhao, H. V. Vinters, S. A. Frautschy and G. M. Cole, *J Neurosci*, 2009, **29**, 9078-9089.
80. X. Zhu, H. G. Lee, G. Perry and M. A. Smith, *Biochim Biophys Acta*, 2007, **1772**, 494-502.
81. Y. Deschaintre, F. Richard, D. Leys and F. Pasquier, *Neurology*, 2009, **73**, 674-680.
82. F. Trinchese, M. Fa, S. Liu, H. Zhang, A. Hidalgo, S. D. Schmidt, H. Yamaguchi, N. Yoshii, P. M. Mathews, R. A. Nixon and O. Arancio, *J Clin Invest*, 2008, **118**, 2796-2807.
83. M. V. Kolev, M. M. Ruseva, C. L. Harris, B. P. Morgan and R. M. Donev, *Curr Neuropharmacol*, 2009, **7**, 1-8.
84. A. J. Mitchell, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2009, **80**, 966-975.
85. F. H. Bouwman, W. M. van der Flier, N. S. Schoonenboom, E. J. van Elk, A. Kok, F. Rijmen, M. A. Blankenstein and P. Scheltens, *Neurology*, 2007, **69**, 1006-1011.
86. J. Brettschneider, K. Widl, H. Ehrenreich, M. Riepe and H. Tumani, *Neurosci Lett*, 2006, **404**, 347-351.
87. M. Ewers, K. Buerger, S. J. Teipel, P. Scheltens, J. Schroder, R. P. Zinkowski, F. H. Bouwman, P. Schonknecht, N. S. Schoonenboom, N. Andreasen, A. Wallin, J. F.

- DeBernardis, D. J. Kerkman, B. Heindl, K. Blennow and H. Hampel, *Neurology*, 2007, **69**, 2205-2212.
88. L. Gerhardsson, K. Blennow, T. Lundh, E. Londos and L. Minthon, *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2009, **28**, 88-94.
89. E. D. Huey, N. Mirza, K. T. Putnam, H. Soares, G. Csako, J. A. Levy, B. Copenhaver, R. M. Cohen and T. Sunderland, *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2006, **22**, 48-53.
90. J. S. Jacobsen, P. Reinhart and M. N. Pangalos, *NeuroRx*, 2005, **2**, 612-626.
91. V. Burov Iu, E. M. Peganov and L. M. Shapovalova, *Biull Eksp Biol Med*, 1993, **116**, 397-400.
92. J. Bajgar, J. Fusek and F. Skopec, *Neurochem Int*, 1994, **24**, 555-558.
93. A. Shah and M. C. Royston, *J R Soc Med*, 1997, **90**, 531-532.
94. E. F. Pereira, Y. Aracava, M. Alkondon, M. Akkerman, I. Merchenthaler and E. X. Albuquerque, *J Mol Neurosci*, 2009, **40**, 196-203.
95. V. Senanarong, N. Pongvarin, K. Phanthumchinda, N. Thavichachart, S. Chankrachang, R. Praditsuwan and S. Nidhinandana, *J Med Assoc Thai*, 2009, **92** 12-18.
96. M. Heinze, D. Andreae and R. Grohmann, *Pharmacopsychiatry*, 2002, **35**, 79-80.
97. P. Johannsen, *Ugeskr Laeger*, 2006, **168**, 3424-3429.
98. K. A. Jellinger, *J Neural Transm*, 2006, **113**, 1603-1623.
99. M. M. Ishchenko and S. I. Shkrobot, *Lik Sprava*, 1992, **10**, 100-102.
100. H. Bienmuller and E. Betz, *Arzneimittelforschung*, 1972, **22**, 1367-1372.
101. H. Resch, G. Weigert, K. Karl, B. Pemp, G. Garhofer and L. Schmetterer, *Acta Ophthalmol*, 2008, **87**, 731-735.
102. R. Mannhold, *Arzneimittelforschung*, 1988, **38**, 1806-1808.
103. L. Pantoni, *J Neurol Sci*, 2004, **226**, 67-70.
104. D. Schenk, R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, Z. Liao, I. Lieberburg, R. Motter, L. Mutter, F. Soriano, G. Shopp, N. Vasquez, C. Vandeventer, S. Walker, M. Wogulis, T. Yednock, D. Games and P. Seubert, *Nature*, 1999, **400**, 173-177.
105. I. Ferrer, M. Boada Rovira, M. L. Sanchez Guerra, M. J. Rey and F. Costa-Jussa, *Brain Pathol*, 2004, **14**, 11-20.
106. J. A. Nicoll, D. Wilkinson, C. Holmes, P. Steart, H. Markham and R. O. Weller, *Nat Med*, 2003, **9**, 448-452.
107. J. M. Orgogozo, S. Gilman, J. F. Dartigues, B. Laurent, M. Puel, L. C. Kirby, P. Jouanny, B. Dubois, L. Eisner, S. Flitman, B. F. Michel, M. Boada, A. Frank and C. Hock, *Neurology*, 2003, **61**, 46-54.
108. Y. Matsuoka, L. Shao, M. Debnath, J. Lafrancois, A. Becker, A. Gray, P. Aisen, C. Mathis, W. Klunk and K. Duff, *Curr Alzheimer Res*, 2005, **2**, 265-268.
109. S. Oddo, V. Vasilevko, A. Caccamo, M. Kitazawa, D. H. Cribbs and F. M. LaFerla, *J Biol Chem*, 2006, **281**, 39413-39423.
110. R. B. Merrifield, *Science*, 1965, **150**, 178-185.
111. R. C. Sheppard, ed., *Peptides "Solid phase peptide synthesis: assessment of the present position"*, North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1971.
112. W. Kullmann, ed., *Enzymatic Peptide Synthesis*, CRC Press Inc., Boca Raton, 1987.
113. K. Itakura, T. Hirose, R. Crea, A. D. Riggs, H. L. Heyneker, F. Bolivar and H. W. Boyer, *Science*, 1977, **198**, 1056-1063.
114. G. E. Reid and R. J. Simpson, *Anal Biochem*, 1992, **200**, 301-309.
115. L. A. Carpino, *J Am Chem Soc*, 1993, **115**, 4397-4398.
116. P. D.A., B. M, B. M.L. and G. C.A., *Tetrahedron Lett*, 1989, **30**, 2739-2742.

117. L. A. Carpino and G. Y. Han, *J Org Chem*, 1972, **37**, 3404-3409.
118. J. T. Du, Y. M. Li, Q. F. Ma, W. Qiang, Y. F. Zhao, H. Abe, K. Kanazawa, X. R. Qin, R. Aoyagi, Y. Ishizuka, T. Nemoto and H. Nakanishi, *Regul Pept*, 2005, **130**, 48-56.
119. J. T. Du, Y. M. Li, W. Wei, G. S. Wu, Y. F. Zhao, K. Kanazawa, T. Nemoto and H. Nakanishi, *J Am Chem Soc*, 2005, **127**, 16350-16351.
120. C. Saxinger, T. P. Conrads, D. J. Goldstein and T. D. Veenstra, *BMC Immunol*, 2005, **6**, 1.
121. D. M. Andrews, J. Kitchin and P. W. Seale, *Int J Pept Protein Res*, 1991, **38**, 469-475.
122. Z. Kupihar, Z. Kele and G. K. Toth, *Org Lett*, 2001, **3**, 1033-1035.
123. T. Turbadar, *Proceedings of the Physical Society*, 1959, **73**, 40-44.
124. A. Otto, *Phys Stat Solidi*, 1968, **26**, K99-K101.
125. E. Kretschmann and H. Rather, *Z Naturf*, 1968, **230**, 2135-2136.
126. U. Jonsson, L. Fagerstam, B. Ivarsson, B. Johnsson, R. Karlsson, K. Lundh, S. Lofas, B. Persson, H. Roos, I. Ronnberg and a. l. et, *Biotechniques*, 1991, **11**, 620-627.
127. L. Xing, K. Tjarnlund, B. Lindqvist, G. G. Kaplan, D. Feigelstock, R. H. Cheng and J. M. Casasnovas, *EMBO J*, 2000, **19**, 1207-1216.
128. J. G. Quinn, S. O'Neill, A. Doyle, C. McAtamney, D. Diamond, B. D. MacCraith and R. O'Kennedy, *Anal Biochem*, 2000, **281**, 135-143.
129. T. Weimar, *Angew Chem Int Ed Engl*, 2000, **39**, 1219-1221.
130. D. G. Myszka and R. L. Rich, *Pharm Sci Technolo Today*, 2000, **3**, 310-317.
131. E. M. Erb, X. Chen, S. Allen, C. J. Roberts, S. J. Tendler, M. C. Davies and S. Forsen, *Anal Biochem*, 2000, **280**, 29-35.
132. R. L. Rich and D. G. Myszka, *Curr Opin Biotechnol*, 2000, **11**, 54-61.
133. R. Karlsson and R. Stahlberg, *Anal Biochem*, 1995, **228**, 274-280.
134. A. S. Ivanov, O. V. Gnedenko, A. A. Molnar, Y. V. Mezentsev, A. V. Lisitsa and A. I. Archakov, *J Bioinform Comput Biol*, 2007, **5**, 579-592.
135. C. Wang, P. Bradley and D. Baker, *J Mol Biol*, 2007, **373**, 503-519.
136. *Tripos FlexiDock. Manual*, 2006.
137. H. Böhm, ed. S. A. V. Heidelberg-Berlin, 1996.
138. M. Oh, K. Joo and J. Lee, *Proteins*, 2009, **77**, 152-156.
139. A. May and M. Zacharias, *J Med Chem*, 2008, **51**, 3499-3506.
140. J. Zhang, Y. Ma, S. S. Taylor and R. Y. Tsien, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, **98**, 14997-15002.
141. C. Y. Peng, P. R. Graves, S. Ogg, R. S. Thoma, M. J. Byrnes, 3rd, Z. Wu, M. T. Stephenson and H. Piwnica-Worms, *Cell Growth Differ*, 1998, **9**, 197-208.
142. J. Zhang, R. E. Campbell, A. Y. Ting and R. Y. Tsien, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, **3**, 906-918.
143. M. Zhao, L. R. Bi, W. Wang, C. Wang, M. Baudy-Floc'h, J. F. Ju and S. Q. Peng, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2006, **14**, 6998-7010.
144. R. Brookmeyer, S. Gray and C. Kawas, *Am J Public Health*, 1998, **88**, 1337-1342.
145. L. E. Hebert, L. A. Beckett, P. A. Scherr and D. A. Evans, *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 2001, **15**, 169-173.
146. M. Ozen and M. Ittmann, *Clin Cancer Res*, 2005, **11**, 4701-4706.
147. N. Davezac, V. Baldin, J. Blot, B. Ducommun and J. P. Tassan, *Oncogene*, 2002, **21**, 7630-7641.
148. M. S. Sozio, M. A. Mathis, J. A. Young, S. Walchli, L. A. Pitcher, P. C. Wrage, B. Bartok, A. Campbell, J. D. Watts, R. Aebersold, R. Hooft van Huijsduijnen and N. S. van Oers, *J Biol Chem*, 2004, **279**, 7760-7769.

## Literatur

149. O. Spiga, A. Bernini, M. Scarselli, A. Ciutti, L. Bracci, L. Lozzi, B. Lelli, D. Di Maro, D. Calamandrei and N. Niccolai, *FEBS Letters*, 2002, **511**, 33-35.
150. J. P. Tassan and X. Le Goff, *Biol Cell*, 2004, **96**, 193-199.
151. V. M. Bolanos-Garcia, *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, **37**, 1572-1577.
152. D. Nestic, M. C. Miller, Z. T. Quinkert, M. Stein, B. T. Chait and C. E. Stebbins, *Nat Struct Mol Biol*, **17**, 130-132.
153. R. Tsutsumi, H. Higashi, M. Higuchi, M. Okada and M. Hatakeyama, *J Biol Chem*, 2003, **278**, 3664-3670.
154. B. G. Tuo, Z. M. Sellers, A. J. Smith, K. E. Barrett, J. I. Isenberg and H. Dong, *Dig Dis Sci*, 2004, **49**, 1845-1852.
155. B. Paziak-Domanska, M. Chmiela, A. Jarosinska and W. Rudnicka, *Cellular Immunology*, 2000, **202**, 136-139.
156. I. Hamachi, Y. Yamada, T. Matsugi and S. Shinkai, *Chemistry-a European Journal*, 1999, **5**, 1503-1511.
157. C. A. Dyke and T. A. Bryson, *Tetrahedron Letters*, 2001, **42**, 3959-3961.
158. D. H. Rich, J. Singh and J. H. Gardner, *The Journal of Organic Chemistry*, 1983, **48**, 432-434.
159. P. A. Reddy, O. F. Schall, J. R. Wheatley, L. O. Rosik, J. P. McClurg, G. R. Marshall and U. Slomczynska, *Synthesis-Stuttgart*, 2001, **7**, 1086-1092.
160. D. Hockova, M. Budesinsky, R. Marek, J. Marek and A. Holy, *European Journal of Organic Chemistry*, 1999, **10**, 2675-2682.
161. B. K. Sarmah and N. C. Barua, *Tetrahedron*, 1991, **47**, 8587-8600.
162. A. Giannis and K. Sandhoff, *Angewandte Chemie*, 1989, **101**, 220-222.
163. B. Liang and E. Negishi, *Org Lett*, 2008, **10**, 193-195.
164. J. Thiem and B. Meyer, *Chemische Berichte*, 1980, **113**, 3067-3074.
165. B. Alcaide, P. Almendros, G. Cabrero and M. P. Ruiz, *J Org Chem*, 2007, **72**, 7980-7991.
166. S. Hong, A. M. Kawaoka and T. J. Marks, *J Am Chem Soc*, 2003, **125**, 15878-15892.
167. N. A. Grigorenko, A. R. Khomutov, T. A. Keinänen, A. Järvinen, L. Alhonen, J. Jänne and J. Vepsäläinen, *Tetrahedron*, 2007, **63**, 2257-2262.
168. A. J. Jarvinen, M. Cerrada-Gimenez, N. A. Grigorenko, A. R. Khomutov, J. J. Vepsäläinen, R. M. Sinervirta, T. A. Keinänen, L. I. Alhonen and J. E. Janne, *J Med Chem*, 2006, **49**, 399-406.
169. M. Boukhelifa, M. M. Parast, J. G. Valtschanoff, A. S. LaMantia, R. B. Meeker and C. A. Otey, *Mol Biol Cell*, 2001, **12**, 2721-2729.
170. O. M. Mykkanen, M. Gronholm, M. Ronty, M. Lalowski, P. Salmikangas, H. Suila and O. Carpen, *Mol Biol Cell*, 2001, **12**, 3060-3073.
171. M. Boukhelifa, M. Moza, T. Johansson, A. Rachlin, M. Parast, S. Huttelmaier, P. Roy, B. M. Jockusch, O. Carpen, R. Karlsson and C. A. Otey, *FEBS J*, 2006, **273**, 26-33.
172. P. I. Kitov and D. R. Bundle, *Journal of the American Chemical Society*, 2003, **125**, 16271-16284.
173. L. Meijer, A. M. Thunnissen, A. W. White, M. Garnier, M. Nikolic, L. H. Tsai, J. Walter, K. E. Cleverley, P. C. Salinas, Y. Z. Wu, J. Biernat, E. M. Mandelkow, S. H. Kim and G. R. Pettit, *Chem Biol*, 2000, **7**, 51-63.
174. R. Mallon, L. Feldberg, S. Kim, K. Collins, D. Wojciechowicz, C. Kohler, D. Kovacs, C. Discafani, N. Zhang, B. Wu, B. Floyd, D. Powell and D. Berger, *Mol Cancer Ther*, 2004, **3**, 755-762.
175. T. Timm, University of Hamburg, Hamburg, 1997.
176. G. Schmidt-Ulms, University of Hamburg, Hamburg, 1998.

## Literatur

177. T. Engel, G. Drobny and P. Reid, *Physical Chemistry for the Life Sciences*, Prentice Hall, 2008.
178. H. C. Huang and P. S. Klein, *Curr Drug Targets*, 2006, **7**, 1389-1397.
179. S. Isomura, P. Wirsching and K. D. Janda, *The Journal of Organic Chemistry*, 2001, **66**, 4115-4121.
180. H. Seki, T. Kawaguchi and T. Higuchi, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1988, **77**, 855-860.

## 10 Anhang

### 10.1 Proteinsequenzen

#### 10.1.1 MARK (2HAK)

<sup>1</sup>GNSITSATDE QPHIGNYRLQ KTIGKGNFAK VKLARHVLTG REVAVKIIDK TQLNPTSLQK  
 LFREVRIMKI LNHPNIVKLF EVIETEKTLY LVMEYASGGE VFDYLVAHGR MKEKEARAKF  
 RQIVSAVQYC HQKYIVHRDL KAENLLLDGD MNIKIADFGF SNEFTVGNKL DTFCGSPPYA  
 APELFQGGKY DGPEVDVWSL GVILYTLVSG SLPFDGQNLK ELRERVLRGK YRIPFYMSTD  
 CENLLKLLV LNPIKRGSLQ QIMKDRWMNV GHEEEELKPY TEPDPDFNDT KRIDIMVTMG  
 FARDEINDAL INQKYDEVMA TYILLGRK<sup>328</sup>

#### 10.1.2 Tau (fetal)

<sup>1</sup>LRALQQRKRE AGIGDTPSLE DEAAGHVTQA RMVSKSKDGT GSDDKKAKGA DGKTKIATPR  
 GAAPPGQKGQ ANATRIPAKT PPAPKTPSS GEPPKSGDRS GYSSPGSPGT PGSRSRTPSL  
 PTPPTREPCK VAVVRTPPKS PSSAKSRLQT APVMPDLKN VKSKIGSTEN LKHQPGGGKV  
 QIVYKPDLS KVTSKCGSLG NIHHKPGGGQ VEVKSEKLDK KDRVQSKIGS LDNITHVPGG  
 GNKKIETHKL TFRENAKAKT DHGAEIVYKS PVVSGDTSR HLSNVSSSTGS IDMVDSPQLA  
 TLADEVASL AKQGL<sup>315</sup>

#### 10.1.3 Tau (A)

<sup>1</sup>AEPRQEFVEM EDHAGTYGLG DRKDQGGYTM HQDQEGDTDA GLKAEAEAGIG DTPSLEDEAA  
 GHVTQARMVS KSKDGTGSDD KKAKGADGKT KIATPRGAAP PGQKGQANAT RIPAKTPPAP  
 KTPPSSGEPP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR SRTPSLPTPP TREPCKVAVV RTPPKSPSSA  
 KSRLQTAPVP MPDLKNVSK IGSTENLKHQ PGGGKVQIIN KKLDSLNVQS KCGSKDNIKH  
 VPGGGSVQIV YKPDLSKVT SKCGSLGNIH HKPGGGQVEV KSEKLDKDRV VQSKIGSLDN  
 ITHVPGGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG AEIVYKSPVV SGGDTSRHLN NVSSSTGSIDM  
 VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL<sup>382</sup>

#### 10.1.4 Tau (B)

<sup>1</sup>AEPRQEFVEM EDHAGTYGLG DRKDQGGYTM HQDQEGDTDA GLKESPLQTP TEDGSEEPGS  
 ETSDAKSTPT AEAEAEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK  
 IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSR  
 RTPSLPTPPT REPCKVAVVR TPPKSPSSAK SRLQTAPVPM PDLKNVSKI GSTENLKHQP  
 GGGKVQIVYK PVDLSKVT SKCGSLGNIH HKPGGGQVEV EKLDFKDRVQ SKIGSLDNIT  
 HVPGGGNKKI ETHKLTFREN AKAKTDHGAE IVYKSPVVSG DTSRHLNSV SSTGSIDMVD  
 SPQLATLADEVASLAKQGL<sup>380</sup>

#### 10.1.5 Tau (C)

<sup>1</sup>AEPRQEFVEM EDHAGTYGLG DRKDQGGYTM HQDQEGDTDA GLKESPLQTP TEDGSEEPGS  
 ETSDAKSTPT AEDVTAPLVD EGAPGKQAAA QPHEIPEGT TAEAEAGIGD PSLEDEAAGH  
 VTQARMVSKS KDGTSDDK AKGADGKTKI ATRGAAPP GQKGQANATRI PAKTPPAPKT  
 PPSSGEPPKS GDRSGYSSPG SPGTPGSRSR TPSLPTPPTR EPKAVAVVRT PPKSPSSAKS  
 RLQTAPVPMP DLKNVSKIG STENLKHQPG GGGKVQIVYK PVDLSKVT SKC GSLGNIHHPK

## Anhang

GGGQVEVKSE KLDKFDKRVQS KIGSLDNITH VPGGGNKKIE THKLTFRENA KAKTDHGAEI  
VYKSPVSGD TSPRHLSNVS STGSIDMVDS PQLATLADEV SASLAKQGL<sup>379</sup>

### 10.1.6 Tau (D)

<sup>1</sup>AEPRQEFVEM EDHAGTYGLG DRKDQGGYTM HQDQEGDTDA GLKAE EAGIG DTPSLEDEAA  
GHVTQARMVS KSKDGTGSDD KKAKGADGKT KIATPRGAAP PGQKGQANAT RIPAKTPPAP  
KTPSSGEPP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR SRTPSLPTPP TREP KKVAVV RTPPKSPSSA  
KSRLQTAPVP MPDLKNVSK IGSTENLKHQ PGGGKVQIIN KKLDSLNVQS KCGSKDNIKH  
VPGGGSVQIV YKPVDSLKVT SKCGSLGNIH HKPGGGQVEV KSEKLDKDR VQSKIGSLDN  
ITHVPGGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG AEIVYKSPVV SGGTSPRHLS NVSSTGSIDM  
VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL<sup>312</sup>

### 10.1.7 Tau (E)

<sup>1</sup>AEPRQEFVEM EDHAGTYGLG DRKDQGGYTM HQDQEGDTDA GLKESPLQTP TEDGSEEPGS  
ETSDAKSTPT AEAE EAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK  
IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSR  
RTPSLPTPPT REP KKVAVVR TPPKSPSSAK SRLQTAPVPM PDLKNVSKSI GSTENLKHQP  
GGGKVQIINK KLDLNLVQSK CGSKDNIKHV PGGGSVQIVY KPVDSLKVT KCGSLGNIHH  
KPGGGQVEVK SEKLDKDRV QSKIGSLDNI THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA  
EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV DSPQLATLAD EVSASLAKQG L<sup>341</sup>

### 10.1.8 Tau (F)

<sup>1</sup>AEPRQEFVEM EDHAGTYGLG DRKDQGGYTM HQDQEGDTDA GLKESPLQTP TEDGSEEPGS  
ETSDAKSTPT AEDVTAPLVD EGAPGKQAAA QPHTEIPEGT TAE EAGIGDT PSLEDEAAGH  
VTQARMVSKS KDGTSDDKK AKGADGKTKI ATPRGAAPPQ QKGQANATRI PAKTPPAPKT  
PPSSGEPPKS GDRSGYSSPG SPGTPGSRSR TPSLPTPPTR EPKKVAVVRT PPKSPSSAKS  
RLQTAPVPM DLKNVSKIG STENLKHQPG GGGVQIINKK LDLSNVQSKC GSKDNIKHVP  
GGGSVQIVYK PVDL SKVTSK CGSLGNIHHK PGGGQVEVKS EKLDKDRVQ SKIGSLDNIT  
HVPGGGNKKI ETHKLTFREN AKAKTDHGAE IVYKSPVVS DTSPRHLSNV SSTGSIDMVD  
SPQLATLADE VSASLAKQGL<sup>370</sup>

### 10.1.9 KSR1

<sup>1</sup>MDRAALRAAA MGEKKEGGG GAAADGGAGA AVSRALQQCG QLQKLIDISI GSLRGLRTKC  
SVSNDLTQQE IRTLEAKLVK YICKQQSKL SVTPSDRTAE LNSYPRFSDW LYIFNVRPEV  
VQEIPQELTL DALLEMDEAK AKEMLRRWGA STEECSRLQQ ALTCLRKVTG LGGEHKMDSG  
WSSTDARDSS LGPPMDLSS LGRAGASTQG PRSISVSALP ASDSPVGLS EGLSDSCIPL  
HTSGRLTPRA LHSFITPPTT PQLRRHAKLK PPRTPPPSR KVFQLLPSFP TLTRSKSHES  
QLGNRIDDVT PMKFELPHGS PQLVRRDIGL SVTHRFSTKS WLSQVCNVCQ KSMIFGVKCH  
CRLKCHNKCT KEAPACRITF LPLARLRTE SVPSDINNPV DRAAEPHFGT LPKALTKKEH  
PPAMNLDSS NPSSTSSSTP SSPAPFLTSS NPSSATTPN PSPGQRDSRF SFPDISACSQ  
AAPLSSTADS TRLDQPKTD VLGVEAEAE EPEAGKSEAE DDEEDEVDDL PSSRRPWRGP  
ISRKASQTSV YLQEWIPFE QVELGEPGQ GRWGRVHRGR WHGEVAIRLL EMDGHNQDHL  
KLFKKEVMNY RQTRHENVVL FMGACMNPPH LAIITSFCKG RTLHSFVRDP KTSLDINKTR  
QIAQEIIKGM GYLHAKGIVH KDLKSKNVFY DNGKVVITDF GLFGISGVVR EERRENQLKL  
SHDWLCY LAP EIVREMIPGR DEDQLPFSKA ADVYAFGTW YELQARDWPF KHQPAEALIW  
QIGSGEGVRR VLASVSLGKE VGEILSACWA FDLQERPSFS LLMDMLERLP KLNRRLSHPG  
HFWKSADINS SKVMPRFERF GLGTLESNP KM<sup>372</sup>

**10.1.10 Cdc25C**

<sup>1</sup>MSTELFSSTR EEGSSGSGPS FRSNQRKMLN LLLERDTSFT VCPDVPRTPV GKFLGDSANL  
 SILSGGTPKR CLDLSNLSSG EITATQLTTS ADLDETGHL D SSSLQEVHLA GMNHDQHLMK  
 CSPAQLLCST PNGLDGRHRK RDAMCSSSAN KENDNGNLVD SEMKYLGSPI TTVPKL DKNP  
 NLGEDQAEEI SDELMEFSLK DQEAQVSRSG LYRSPSPMPEN LNRPRLKQVE KFKDNTIPDK  
 VKKKYFSGQG KLRKGLCLKK TVSLCDITIT QMLEEDSNQG HLI GDFSKVC ALPTVSGKHQ  
 DLKYVNPETV AALLSGKFQG LIEKFYVIDC RYPYEYLG GH IQGALNLYSQ EELFNFFLKK  
 PIVPLDTQKR I IIVFHCEFS SERGPRMCRC LREEDRSLN Q YPALYYPELY ILKGGYRDFE  
 PEYMELCEPQ SYCPMHQDH KTELLRCRSQ SKVQEGERQL REQIALLVKD MSP<sup>473</sup>

**10.1.11 PTPH1**

<sup>1</sup>MSRLRALGG RINNIRTSSEL PKEKTRSEVI CSIHFLDGVV QTFKVTQDT GQVLLDMVHN  
 HLGVTEKEYF GLQHDDDSVD SPRWLEASKA IRKQLKGGFP CTLHFRVRF IPDPNTLQQE  
 QTRHLYFLQL KMDICEGRLT CPLNSAVVLA SYAVQSHFGD YNSSIHHPGY LSDSHFIPDQ  
 NEDFLTKVES LHEQHSGLKQ SEAESYINI ARTLDFYGV E LHSGRDLHNL DLMIGIASAG  
 VAVYRKYICT SFYPWVNILK ISFKRKKFFI HQRQKQAESR EHIVAFNMLN YRSCKNLWKS  
 CVEHHTFFQA KKLLPQEKV LSQYWTMGRS NTKKSVNNQY CKKVIGGMVW NPAMRRSLSV  
 EHLETKSLPS RSPPIPNWR SPRLRHEIRK PRHSSADNLA NEMTYITETE DVFYTYKGS L  
 APQSDSEVS QNRSPHQESL SENNPAQSYL TQKSSSSVSP SSNAPGSCSP DGVDQQLDD  
 FHRVTGGST EDASQYCDK NDNGDSYLV L IRITPDEDGK FGFNLKGGVD QKMPLVVSRI  
 NPESPADTCI PKLNEGQIV LINGRDISEH THDQVVMFIK ASRESHSREL ALVIRRRRAVR  
 SFADFKSEDE LNQLFPEAIF PMCPEGGDTL EGSMAQLKKG LESGTVLIQF EQLYRKKPGL  
 AITFAKLQPN LDKNRYKDV L PYDTRVLLQ GNEDYINASY VNMEIPAANL VNKYIATQGP  
 LPHTCAQFWQ VVWDQKLSLI VMLTTLTERG RTKCHQYWPD PPDVMNHGGF HIQCQSEDCT  
 IAYVSREMLV TNTQTGEEHT VTHLQYVAWP DHGVPDDSSD FLEFVNYVRS LRV DSEPVLV  
 HCSAGIGRTG VLVTMETAMC LTERNLPIYP LDIVRKM RDQ RAMMVQTSSQ YKFVCEAILR  
 VYEEGLVQML DPS<sup>913</sup>

**10.1.12 Palladin**

<sup>1</sup>MSGTSSHESF YDSLSDMQEE SKNTDFFPGL SAFLSQEEIN KSLDLARRAI ADSETEDFDS  
 EKEISQIFST SPASLCEHPS HKETKLGEHA SRRPQDNRST PVQPLAEKQT KSISSPVSKR  
 KPAMSPLLTR PSYIRSLRKA EKRGAKTPST NVKPKTPHQR KGGPQSQLCD KANLIEELT  
 SIFKAAKPRN RSPNGESSSP DSGYLSPKNQ PSALLSASAS QSPMEDQGEM EREVKSPGAR  
 HCYQDNQDLA VPHNRKSHQP PHSALHFPA A PRFIQKLSRQ EVAEGSRVYL ECRVTGNPTP  
 RVRWFCEGKE LHNTDPDIQH CEGDDLHTLI IAEAFEDDTG RYTCLATNPS GSDTTSAEVF  
 IEGASSTDSD SESLAFKSRA GAMPQAQKKT TSVSLTIGSS SPKTGVTTAV IQPLSVPVQQ  
 VHSPTSYL CR PDGTTTAYFP PVFTKELQNT AVAEGQVVVL ECRVRGAPPL QVQWFRQGSE  
 IQDSPDFRIL QKKPRSTAEP EEICTLVIAE TFPEDAGIFT CSARNDYGSA TSTAQLV VTS  
 ANTENCSYES MGESNNDHFQ HFPPPPPILE TSSLELASKK PSEIQVNNP ELGLSRAALQ  
 MQFNAAERET SGVHPSRGVN GLINGKANSN KSLPTPAVLL SPTKEPPPLL AKPKLDPLKL  
 QQLQNQIRLE QEAGARQPPP APRSAPPSP FPPPPAFPEL AACTPPASPE PMSALASRSA  
 PAMQSSGSFN YARPKQFIAA QNLGPASGHG TPASSPSSSS LPSPMSPTPR QFGRAPVPPF  
 AQPFGAEPEA PWGSSSPSP PPVPVDFVP LPPPPPLPS PGQASHCSSP  
 ATRFGHSQTP AAFLSALLPS QPPPAVNAL GLPKGVTPAG FPKKASRTAR IASDEEIQGT  
 KDAVIQDLER KLRFKEDLLN NGQPRLTYEE RMARRLLGAD SATVFNIQEP EEETANQEYK  
 VSSCEQRLIS EIEYRLERSP VDESGDEVQY GDVPVENGMA PFFEMKLKHY KIFEGMPVTF  
 TCRVAGNPKP KIYWFKDGKQ ISPKSDHYTI QRDL DGTCSL HTTASTLDDD GNYTIMAANP  
 QGRISCTGRL MVQAVNQRGR SPRSPSGHPH VRRPRSRSRD SGDENEPIQE RFFRPHFLQA  
 PGDLTVQEGK LCRMDCKVSG LPTPDL SWQL DGKVPVPDSA HKMLVRENGV HSLIIEPVTS  
 RDAGIYTCIA TNRAGQNSFS LELVVAKEA HKPPV FIEKL QNTGVADGYP VRLECRVLGV  
 PPPQIFWKKE NESLTHSTR VSMHQDNHGY ICLLIQGATK EDAGWYTVSA KNEAGIVSCT<sup>1360</sup>  
 ARLDVYTQWH QQSQSTKPKK VRPSASRYAA LSDQGLDIKA AFQPEANPSH LTLNTALVES

## 10.2 Substanzübersicht

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Vielzahl verschiedener Peptide und organischer Substanzen synthetisiert und untersucht, deren systematische Benennung im Folgenden nocheinmal vollständig aufgeführt wird. Die Liste beinhaltet die in dieser Arbeit verwendete Bezeichnung, die zugehörige Sequenz und die entsprechende Herkunft.

*Tabelle 10.2-1: Liste der Peptide und Phosphopeptide, die in SPR-Experimenten auf ihre Affinität zu MARK untersucht wurden. Die entsprechenden Untersuchungsergebnisse sind in Abschnitt 4.2 zu finden.*

Substanz	Bezeichnung	Sequenz	Herkunft
<b>1</b>	P1	<sup>387</sup> LLRTE <sup>393</sup> V	KSR1
<b>2</b>	P2	<sup>211</sup> LYRSP <sup>217</sup> M	Cdc25C
<b>3</b>	P3	<sup>354</sup> MRRSL <sup>360</sup> SV	PTPH1
<b>4</b>	P4	<sup>257</sup> KSKIG <sup>263</sup> ST	Tau, <i>repeat</i> 1
<b>5</b>	P5	<sup>288</sup> KSKCG <sup>294</sup> ST	Tau, <i>repeat</i> 2
<b>6</b>	P4p	<sup>257</sup> KSKIG-S(PO <sub>4</sub> )-T <sup>263</sup>	Tau, <i>repeat</i> 1
<b>7</b>	P5p	<sup>288</sup> KSKCG-S(PO <sub>4</sub> )-T <sup>294</sup>	Tau, <i>repeat</i> 2
<b>8</b>	R1	<sup>254</sup> KNVKSKIG <sup>263</sup> ST	Tau, <i>repeat</i> 1
<b>9</b>	R2	<sup>285</sup> SNVQSKCG <sup>294</sup> SK	Tau, <i>repeat</i> 2
<b>10</b>	R3	<sup>317</sup> SKVTSKCG <sup>326</sup> ST	Tau, <i>repeat</i> 3
<b>11</b>	R4	<sup>348</sup> DRVQSKIG <sup>357</sup> SL	Tau, <i>repeat</i> 4

Die folgenden Abbildungen zeigen die Syntheserouten, die zu den in dieser Arbeit verwendeten Aminosäureanaloge führen. Während die Synthese in Abschnitt 4.4 erläutert wird, beschreiben die darauf folgenden Kapitel, wie die auf **17** und **23** basierenden Peptide synthetisiert und untersucht wurden. Letztere sind in Tabelle 10.2-2 vollständig aufgeführt.

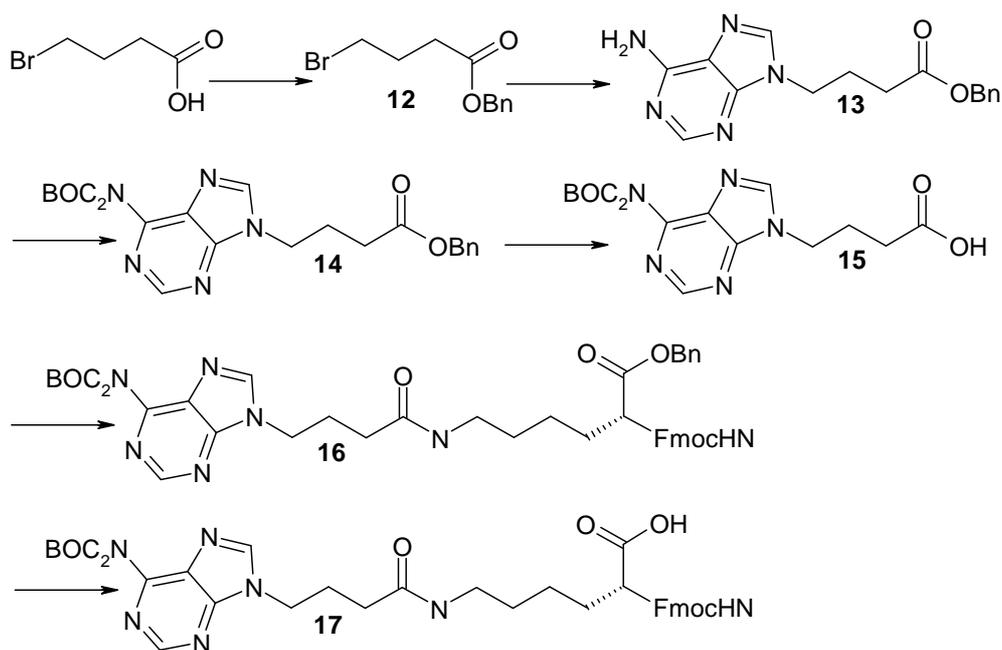


Abbildung 10.2-1: Übersicht der Syntheseroute, die zum ersten inhibitorischen Baustein für die Peptidsynthese nach der Fmoc-Strategie führt. Beim Schritt von 15 nach 16 wird die Carboxylgruppe mit der entschützten Amino-Funktion der Seitenkette von Lysin verknüpft.

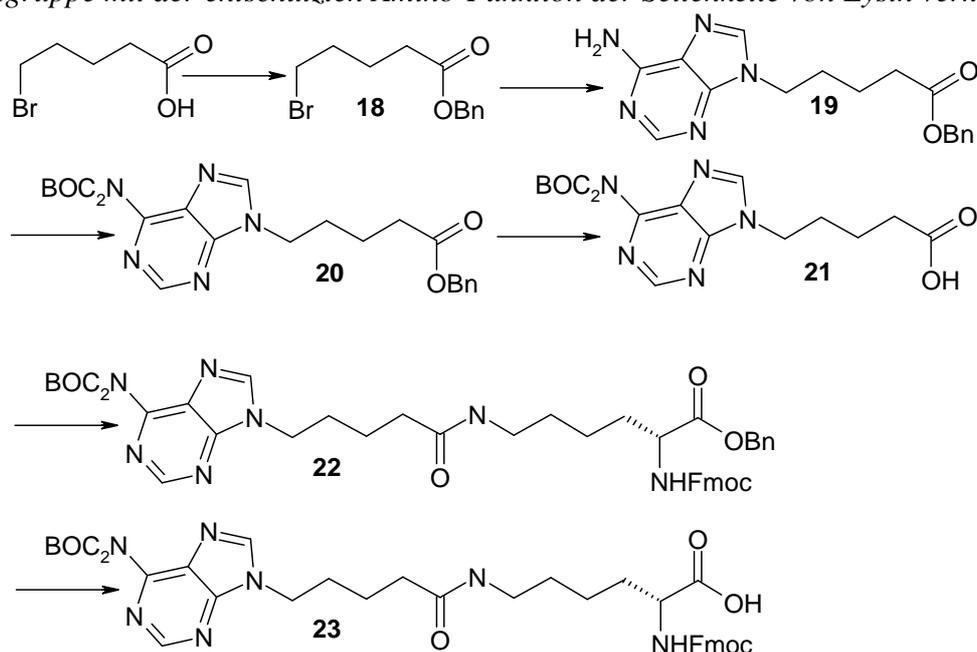


Abbildung 10.2-2: Zu Abbildung 4.4-1 analoge Reaktionsfolge, die eine zusätzliche CH<sub>2</sub>-Gruppe zwischen N9 des Adenins und der Amidbindung aufweist.

Anhang

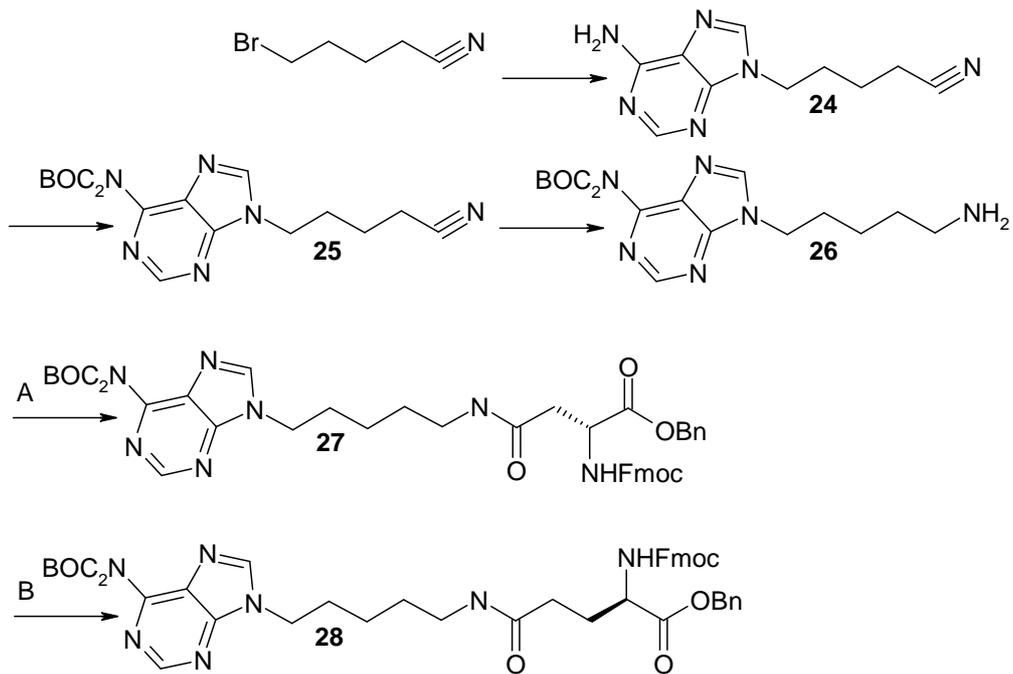


Abbildung 10.2-3: Schema der 2. Verknüpfungsvariante zwischen funktional alkyliertem Adenin und Aminosäure. Im Gegensatz zu der in Abbildung 4.1-1 bzw 4.1-2

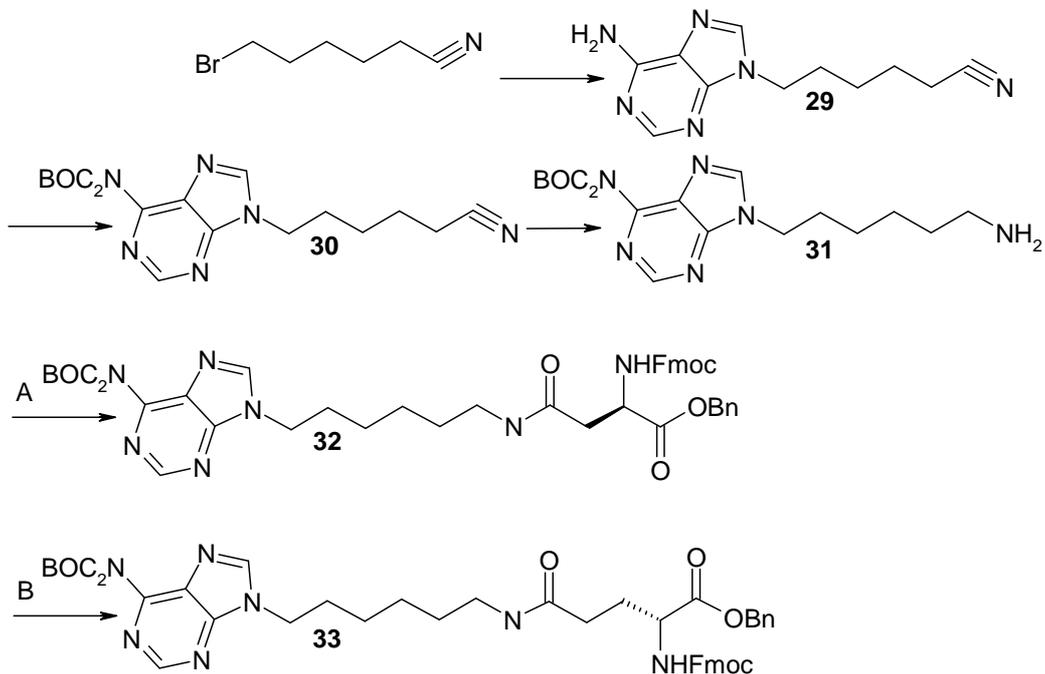


Abbildung 10.2-4: Reaktionsfolge, die eine zusätzliche  $CH_2$ -Gruppe zwischen der Seitenkette der Aminosäure und Adenin aufweist.

## Anhang

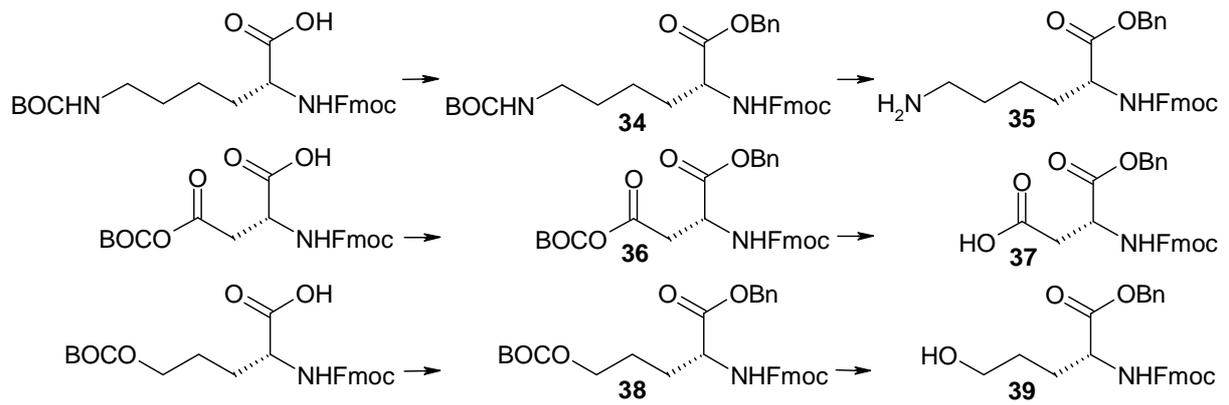


Abbildung 10.2-5: Reaktionsschema, welches die Umschüttung der kommerziell erhältlichen Aminosäuren Lysin, Asparaginsäure und Glutaminsäure zeigt. Im Anschluss an die Benzylierung der Carboxylgruppe wird die Boc-Gruppe der Seitenkette abgespalten.

## Anhang

*Tabelle 10.2.-2: Übersicht der inhibitorischen Peptide und der dazugehörigen Referenzsubstanzen. 42 bis 45 stehen für die Testpeptide, die zur Überprüfung der Funktionalität von 17 und 23 synthetisiert wurden. Anschließend sind die unmodifizierten 13 Aminosäuren langen Peptide aufgelistet gefolgt von den dazugehörigen Analoga, die die modifizierten Aminosäuren 17 und 23 an der Position der Phosphorylierungsstelle tragen.*

Substanz	Sequenz	Herkunft
<b>42</b>	<sup>258</sup> SKIG-X4 <sup>262</sup>	Tau, <i>repeat</i> 1
<b>43</b>	<sup>258</sup> SKIG-X5 <sup>262</sup>	Tau, <i>repeat</i> 1
<b>44</b>	<sup>212</sup> YRSP-X4 <sup>216</sup>	Cdc25C
<b>45</b>	<sup>212</sup> YRSP-X5 <sup>216</sup>	Cdc25C
<b>46</b>	<sup>255</sup> NVSKIGSTENLK <sup>267</sup>	Tau, <i>repeat</i> 1
<b>47</b>	<sup>352</sup> PAMRRSLSVEHLE <sup>364</sup>	PTPH1
<b>48</b>	<sup>209</sup> SGLYRSPSPENL <sup>221</sup>	Cdc25C
<b>49</b>	<sup>385</sup> ARLRTEVPSDI <sup>397</sup>	KSR1
<b>50</b>	<sup>318</sup> RVQSKIGSLDNIT <sup>330</sup>	Tau, <i>repeat</i> 2
<b>51</b>	<sup>505</sup> LLNKRRGSVPILR <sup>517</sup>	Palladin
<b>52</b>	<sup>209</sup> SGLYRSPFPENL <sup>221</sup>	Cdc25C V1
<b>53</b>	<sup>209</sup> SGLYKRSPFPENL <sup>221</sup>	Cdc25C V2
<b>54</b>	<sup>255</sup> NVSKIG-17-TENLK <sup>267</sup>	Tau, <i>repeat</i> 1
<b>55</b>	<sup>255</sup> NVSKIG-23-TENLK <sup>267</sup>	Tau, <i>repeat</i> 1
<b>56</b>	<sup>352</sup> PAMRRSL-17-VEHLE <sup>364</sup>	PTPH1
<b>57</b>	<sup>352</sup> PAMRRSL-23-VEHLE <sup>364</sup>	PTPH1
<b>58</b>	<sup>209</sup> SGLYRSP-17-MPENL <sup>221</sup>	Cdc25C
<b>59</b>	<sup>209</sup> SGLYRSP-23-MPENL <sup>221</sup>	Cdc25C
<b>60</b>	<sup>385</sup> ARLRTE-17-VPSDI <sup>397</sup>	KSR1
<b>61</b>	<sup>385</sup> ARLRTE-23-VPSDI <sup>397</sup>	KSR1
<b>62</b>	<sup>318</sup> RVQSKIG-17-LDNIT <sup>330</sup>	Tau, <i>repeat</i> 2
<b>63</b>	<sup>505</sup> LLNKRRG-17-VPILR <sup>517</sup>	Palladin
<b>64</b>	<sup>505</sup> LLNKRRG-23-VPILR <sup>517</sup>	Palladin
<b>65</b>	<sup>209</sup> SGLYRSP-17-FPENL <sup>221</sup>	Cdc25C V1
<b>66</b>	<sup>209</sup> SGLYRSP-23-FPENL <sup>221</sup>	Cdc25C V1
<b>67</b>	<sup>209</sup> SGLYKRP-17-FPENL <sup>221</sup>	Cdc25C V2
<b>68</b>	<sup>209</sup> SGLYKRP-23-FPENL <sup>221</sup>	Cdc25C V2

## 11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Menschen danken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Meinen Eltern Brigitte und Reinhard, meiner Schwester Ragna und der gesamten dazugehörigen Familie ohne deren bedingungslose Unterstützung ich nie so weit gekommen wäre.

Meiner besseren Hälfte Sandra, die mich all die Jahre begleitet, unterstützt und ausgehalten hat und die der wichtigste Mensch in meinem Leben ist. Und natürlich die Familie: Kurt, Edda, Melanie, Daniel und Pauline.

Meinen Freunden Philipp, Sven, Nils, Jan, Olli, Malte, Torsten und all den anderen dafür, dass ihr mein Leben über verdammt viele Jahre auf die unterschiedlichsten Arten bereichert habt.

Thomas Timm und der ganzen Arbeitsgruppe Mandelkow für die Unterstützung durch MARK, lange Diskussionen und noch längere Assays.

Meinen zahllosen Praktikanten, deren vollständige Aufzählung den Rahmen dieser Liste sprengen würde. Ohne euren unermüdlichen Einsatz würde ich jetzt immer noch säulen!

Mein Dank für das Auffinden diverser kleiner und großer Fehler auf all den Seiten dieser Arbeit gilt Bärbel Neumann, Anna-Winona Struck, Thomas Hackl, Martin Wienke, Dirk Rehders, Thomas Timm und natürlich Sandra Schäfer.

Besonderer Dank gilt dem gesamten AK Meyer, der mir über die Jahre eine zweite Heimat war. Die vielen gemeinsamen außerdienstlichen Aktivitäten werden mir fehlen. Ich danke euch allen für alles!

## Danksagung

Dennis Wilhelm für 11 Jahre gemeinsames Praktika durchstehen, Protokolle schreiben, Lernen, Leiden, Feiern, Diskutieren, Raiden und all die anderen Erlebnisse, die hier platztechnisch nicht mehr hinpassen.

Martin Wienke, tief in Tasten, Nullen und Einsen versunken. Danke für die vielen Diskussionen und kleinen Erleuchtungen rund um „unser“ MARK. Möge die Inhibition mit dir sein!

Dem heimgekehrten Thomas Hackl alias Dr. Magneto. Immer in Betrieb und dennoch die Ruhe selbst.

Meiner 17b. Anna-Winona Struck, eine der am meisten beschäftigten Personen dieses Planeten, die trotzdem immer Zeit zum Pferdestehlen hat. Und Henning Behnken, zu dem man gezwungenermaßen aufsehen muss, dessen Musikgeschmack ich allerdings nicht zum Positiven Verändern konnte. Bessere Labornachbarn sind praktisch nicht zu finden. Wenn das Problem mit den unterschiedlichen Auffassungen zum Thema Musik nicht wär'...

Nebenan in der 17a. Moritz Waldmann, immer in Action und kein Experiment ist zu abwegig (und wenige sind abwegig genug). Eigentlich grenzt es fast an ein Wunder, dass Ilona Grüneberg (die gute Seele) dadurch noch keine bleibenden Schäden davongetragen hat.

Gegenüber in der 11 wird von Kathrin Althof und Miriam Kötzler wie immer fleißig gekocht und an/unter der Unterdrückung von/durch Praktikanten gearbeitet/gelitten. Grüßt mir das T100!

Die wilde 13. Nach dem Abgang meines metallischen Genossen Dirk Rehders von den 3 Mädels übernommen: Beatrice Jührs (immer und für jeden ein Lächeln parat), Katrin Schaefer (Zucker!) und Katharina Wallach (gemeinsam meckert/lästert es sich am besten!). Und natürlich der dazugehörige „Untermieter“ Kolja Klein, danke für alles und Tschakka!!

Und die 20, der abseitige ruhige Pol. Der Wirkungsort von Meike Fellenberg (Bezwingerin und Hüterin des magnetischen Grals), Karsten Winkel (braucht keinen Glauben um Berge zu versetzen), Karolina Elsholz (Mama!) und Alexander Stark (Papa!).

## Danksagung

Und last but not least diejenigen, die den AK vor mir verlassen haben, von denen ich viel gelernt habe und die immer ein offenes Ohr für mich hatten:

Dr. Winrich Scherres, Dr. Christian Flügge, Dr. Svenja Scheid, Dr. Mirko Lindner, Dr. Boris Kröplien, Dipl. Chem. Lars Fischer, Dr. Atilâ Çoksezen, Dr. Jan-Christoph Westermann, Dr. Britta Hünnefeld, Dr. Birgit Claasen, Dr. Thomas Kühnemund, Dr. So-Young Shin, Dr. Jutta Tost.

## 12 Lebenslauf und Erklärungen

### Promotion

06.2005 - heute      Promotion an der Universität Hamburg  
Institut für Organische Chemie

**Thema:**

- Design und Synthese eines spezifischen Inhibitors für die *microtubule affinity-regulating kinase* (MARK)

**Angewandte Methoden:**

- Peptidsynthese, HPLC, NMR, Kinase-Essays, MALDI-TOF-MS, LC-ESI-MS, Biacore, IR, *molecular modelling*, organische Synthese, GE

### Tätigkeiten während der Promotion

- Betreuung von Studenten im Grundpraktikum für organische Chemie (Kontrolle von Präparaten, Protokollen und Arbeitsweise; Abnahme von Kolloquien; Ansprechpartner)
- Betreuung von Praktikanten im Rahmen freier Praktika (Einarbeitung in Geräte, Problemstellungen und Arbeitsabläufe)
- Lehrbeauftragter für Studenten der Medizin
- Administration des arbeitskreisinternen PC-Netzwerks (Account-, Hardware- und Softwareverwaltung; Problemlösungen)

### Studium

10.1998 - 03.2005      Chemiestudium an der Universität Hamburg

**Abschluss:**

07.2004 - 03.2005      Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie (Note: sehr gut)

**Thema:**

- Synthese und Untersuchung von Peptiden und N-Typ-Glycopeptiden aus dem V3-Bereich des HIV-1

**Angewandte Methoden:**

- Peptidsynthese, HPLC, NMR, MS, Biacore, organische Synthese, Zucht von Hi5-Zellen

## Lebenslauf und Erklärungen

### Tätigkeiten während des Studiums

06.1998 - 12.2000 Tätigkeit als Studentische Hilfskraft an der Universität Hamburg  
Institut für Physikalische Chemie

Versuchsvorbereitung und -durchführung im Rahmen einer  
Experimentalvorlesung in physikalischer Chemie

### Wehrdienst

09.1997 - 05.1998 Lüneburg, Munster

### Schule

1988 – 1997 Orientierungsstufe und Gymnasium Oedeme, Lüneburg  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, Robin Job, dass von mir keine weiteren Promotionsversuche unternommen worden sind, oder an anderer Stelle vorgelegt wurden.

Hamburg den 22.09.2010

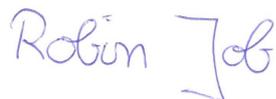


Robin Job

### Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und allein von mir angefertigt wurde. Sämtliche verwendete Quellen sind als solche gekennzeichnet worden.

Hamburg den 22.09.2010



Robin Job