

Aus dem Institut für Klinische Biochemie und
Pathobiochemie und Zentrallabor
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Ulrich Walter

**Bestimmung der Substrat- und Inhibitorspezifität
von Phosphodiesterasen mittels Mikrokalorimetrie**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Heiko Anton Poppe
aus Würzburg

Würzburg, Juni 2008

Referentin: Priv.-Doz. Dr. Elke Butt-Dörje

Koreferent: Prof. Dr. Manfred Scharl

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.02.2009

Der Promovend ist Arzt.

Für meine Eltern, in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Historische Entwicklung des Forschungsfeldes der Phosphodiesterasen.....	1
1.2.	Proteinstruktur, Vorkommen und Funktion von Phosphodiesterasen	2
1.3.	Zielsetzung des Cyclonukleotidprojekts	5
1.4.	Zielsetzung der Arbeit	7
2.	Material.....	8
2.1.	Bakterien	8
2.1.1.	Bakterienstämme (E. coli)	8
2.1.2.	Medien und Agarplatten	8
2.2.	Kulturzellen (Insect Cells)	8
2.3.	Lösungen und Medien für die Zellkultur	8
2.4.	Vektoren	9
2.5.	Proteinkonstrukte	9
2.6.	Cyclonukleotide und Cyclonukleotid-Analoga (BIOLOG).....	10
2.7.	Chemikalien und Reagenzien.....	11
2.8.	Enzyme	11
2.9.	Proteine	11
2.10.	Größenstandard.....	11
2.11.	Kits.....	11
2.12.	Transfektionsreagenz.....	11
2.13.	Antikörper	12
2.14.	Verbrauchsmaterialien	12
2.15.	Geräte	12
2.16.	Software	13
3.	Mikrokalorimetrische Methoden.....	14
3.1.	Anwendung, Aufbau und Funktionsprinzip des Mikrokalorimeters.....	14
3.2.	Allgemeine Vorbereitungen der ITC-Assays.....	17
3.3.	Bestimmung kinetischer Daten von Substraten	22
3.4.	Untersuchung des Inhibitionsverhaltens nicht hydrolysierbarer Derivate.....	25
4.	Proteinbiochemische Methoden	29
4.1.	Überexpression in Insektenzellen	29
4.2.	Transformation in E. coli	29
4.3.	Reinigung überexprimierter Phosphodiesterase.....	30
4.4.	Reinigung von PDE 6 aus Retinagewebe von Hühneraugen (Beavo 2004)	31
4.4.1.	Materialgewinnung und erster Reinigungsschritt der PDE 6.....	32
4.4.2.	Reinigung von PDE 6 auf einer cGMP-Affinitätssäule.....	33

4.4.3.	Konzentrierung und Aufbewahrung der gereinigten PDE 6.....	33
4.5.	Photometrischer Aktivitätsnachweis durch Phosphate-Release-Assay.....	33
4.6.	Photometrische Gesamtproteinbestimmung nach Bradford (1976).....	34
4.7.	Quantifizierung der Phosphodiesterase	34
4.7.1.	Denaturierende Gelelektrophorese (Lämmli 1970)	34
4.7.2.	Proteinfärbung mit Coomassie blau.....	36
4.7.3.	Trocknen von Polyacrylamidgelen	36
4.7.4.	Digitale Analyse getrockneter Polyacrylamidgele.....	36
4.8.	Radioaktiver Phosphodiesterase-Assay nach Beavo (1970).....	38
4.9.	Western Blot (Towbin et al., 1979) nach Stimulation von gereinigten Thrombozyten mit Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS	40
4.9.1.	Gewinnung und Präparation von Thrombozyten.....	40
4.9.2.	Stimulation gereinigter Thrombozyten.....	40
4.9.3.	Gelelektrophorese und Transfer auf die Nitrocellulosemembran.....	41
4.9.4.	Anfärben von Proteinen auf der Nitrocellulose.....	41
4.9.5.	Detektion spezifischer Proteine durch Antikörper	42
5.	Ergebnisse	43
5.1.	Bestimmung kinetischer Daten von PDEs mittels Mikrokalorimetrie	43
5.1.1.	Verwendung und Zweck der Analogsubstanzen von cAMP und cGMP	43
5.1.2.	Versuchsprotokoll der mikrokalorimetrischen Experimente	43
5.1.3.	Schwächen und Limitationen der mikrokalorimetrischen Methode	45
5.1.4.	Vorteile der Mikrokalorimetrie gegenüber dem radioaktiven Standardversuch nach Beavo	46
5.2.	Hydrolysestabilität und Inhibitionsverhalten Epac-relevanter Analoga	47
5.2.1.	Vorkommen und Funktionen von Epac	47
5.2.2.	Ergebnisse der Experimente mit den Epac-Modulatoren 8-pCPT-2'-O-Me- cAMP und Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS.....	47
5.3.	Hydrolysestabilität und Inhibitionsverhalten PKA-relevanter Analoga	48
5.3.1.	Struktur und Funktion von PKA.....	48
5.3.2.	Ergebnisse der Experimente mit den PKA-Aktivatoren 8-Br-cAMP, 6-Bnz- cAMP und Sp-5,6-DCI-cBIMPS	49
5.3.3.	Ergebnisse der Experimente mit dem PKA-Inhibitor Rp-8-Br-cAMPS	49
5.4.	Hydrolysestabilität und Inhibitionsverhalten PKG-relevanter Analoga	50
5.4.1.	Struktur und Funktionen von PKG.....	50
5.4.2.	Ergebnisse der Experimente mit den PKG-Aktivatoren 8-Br-cGMP, 8-Br-PET- cGMP und 8-pCPT-cGMP.....	50

5.4.3.	Ergebnisse der Experimente mit den PKG-Inhibitoren Rp-8-pCPT-cGMPS und Rp-8-Br-Pet-cGMPS	52
5.5.	Ergebnisse der Thrombozytenstimulation mit Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS	52
6.	Diskussion	55
6.1.	Literaturvergleich der mikrokalorimetrisch ermittelten Hydrolysedaten	55
6.2.	Entscheidungskriterien und Vorschläge für die Auswahl eines Analogons	56
6.3.	Möglicher Einfluss von GAF-Domänen auf die katalytische Aktivität.....	60
6.4.	Kinetische Unterschiede der Vertreter der Phosphodiesterasefamilie 1	63
6.5.	Einfluss von Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS auf gereinigte Thrombozyten.....	65
7.	Zusammenfassung	67
8.	Abkürzungsverzeichnis.....	68
9.	Abbildungsverzeichnis	70
10.	Literaturverzeichnis	71

1. Einleitung

1.1. Historische Entwicklung des Forschungsfeldes der Phosphodiesterasen

Wenige Jahre nach der Entdeckung des Signalmoleküls cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) durch Sutherland 1957 wurde erstmals die Aktivität eines Cyclonukleotide spaltenden Enzyms beschrieben (Butcher et al., 1962). Alle fortan identifizierten Proteine mit der Fähigkeit zur Hydrolyse von cyclischen Monophosphaten an der 3'-Bindungsstelle werden als Phosphodiesterasen (PDEs) klassifiziert. Die Isolierung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus dem Urin von Ratten (Ashman et al., 1963) trug in den Folgejahren zur Entwicklung des Konzeptes der Signaltransduktion mit „second messenger“-Molekülen bei. Mit Etablierung der Methode zur Messung der Hydrolyseaktivität von PDEs durch radioaktiv markierte Substrate gelang die Differenzierung mehrerer Formen mit unterschiedlichen kinetischen und regulatorischen Eigenschaften (Thompson et al., 1979; Beavo et al., 1982). Neuere molekularbiologische Methoden wie die Klonierung von Genen und der Gebrauch monoklonaler Antikörper sowie Techniken zur DNA-Sequenzierung und verbesserte Protokolle zur Aufreinigung von Proteinen deckten eine enorme Vielfalt der Familie der PDEs auf. Bis heute wurden 21 Gene und über 100 hiervon kodierte mRNA-Transkripte beschrieben.

Von besonderem medizinischen Interesse ist die Entwicklung spezifischer Inhibitoren von PDEs. Wegen ihrer außergewöhnlich großen Variabilität stellen diese hydrolysierenden Enzyme eine gute Zielstruktur für medikamentöse Interventionen mit sehr spezifischer Wirkung bei geringem Nebenwirkungsprofil dar. Der grundlegende Mechanismus, dass die intrazellulären Spiegel eines Moleküls wegen der geringen Aktivität synthetisierender Proteine eher durch die degradierenden Enzyme bestimmt werden, wurde kürzlich auch für die Regulation der cAMP-Spiegel durch PDE 2 gezeigt (Nikolaev et al., 2005). Somit erweist sich die Hemmung des schnellen Abbaus von Cyclonukleotiden durch PDEs als eine sinnvolle Strategie zur Beeinflussung fehlregulierter Signalwege (Bender et al., 2006). Da die intrazellulären Konzentrationen der Cyclonukleotide in der Regel unter 1 μM liegen, kann zudem schon bei geringen Wirkstoffkonzentrationen eine angemessene kompetitive Inhibition erreicht werden.

Bereits seit den siebziger Jahren ist die unspezifische hemmende Wirkung von Coffein und seinem Analogon Theophyllin auf PDEs bekannt (Smith et al., 1970). Anfang der neunziger Jahre beobachtete man, dass die durch Theophyllin vermittelte Inhibition von PDE 4 eine Bronchodilatation hervorruft (Cortijo et al., 1993). Wenig später führte man daher diese Substanz zur Therapie des Asthma bronchiale ein. Seither wurden viele verschiedene Substanzen entwickelt, um gezielter nur an ganz bestimmten Formen der PDEs Wirkung zu entfalten. Die spezifischen Inhibitoren der PDE 5, Sildenafil, Vardenafil und Tadalafil, finden seit einigen Jahren erfolgreich medizinische Anwendung bei der Therapie der erektilen Dysfunktion (Bischoff et al., 2004). In mehreren klinischen Studien wird zur Zeit ihr Nutzen bei der Therapie der pulmonalen Hypertonie des Erwachsenen (Lewis et al., 2004; Steiner et al., 2005) sowie des Neugeborenen (Hoepfer et al., 2005; Humpl et al., 2005) geprüft. Aufsehen erregte kürzlich eine Arbeit, in der im Tiermodell eine präventive Wirkung von Sildenafil auf die Entstehung der druckinduzierten Hypertrophie und Fibrosierung des Herzmuskels gezeigt werden konnte (Takimoto et al., 2005). Sollten diese Beobachtungen auf den Menschen übertragbar sein, ergäben sich mannigfaltige Anwendungsmöglichkeiten dieser Wirkstoffgruppe für die Behandlung von arterieller Hypertonie und Herzerkrankungen.

1.2. Proteinstruktur, Vorkommen und Funktion von Phosphodiesterasen

Die Signaltransduktion der „second messenger“ cAMP und cGMP wird von Cyclasen vermittelt. So stimulieren viele an der Außenseite der Zellmembran bindende Hormone und Neurotransmitter die Adenylylcyclase (AC) zur Synthese von cAMP. Dieses wiederum reguliert mehrere Effektorproteine und aktiviert unter anderem die Familienmitglieder der cAMP-abhängigen Proteinkinasen (PKA) sowie die Guaninnukleotidaustauschfaktoren Epac 1 und Epac 2 (Bos et al., 2003). Auf ähnliche Weise können Stickstoffmonoxid (Moncada et al., 1995) und der atriale natriuretische Faktor ANF (Garbers et al., 1999) die Guanylylcyclasen (pGC und sGC) zur Synthese des Signalmoleküls cGMP stimulieren, dadurch die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKG) aktivieren und so zum Beispiel in glatten Muskelzellen eine Vasodilatation hervorrufen (Carvajal et al., 2000).

In Abbildung 1 sind die wichtigsten Komponenten der durch Cyclonukleotide regulierten Signalkaskaden dargestellt.

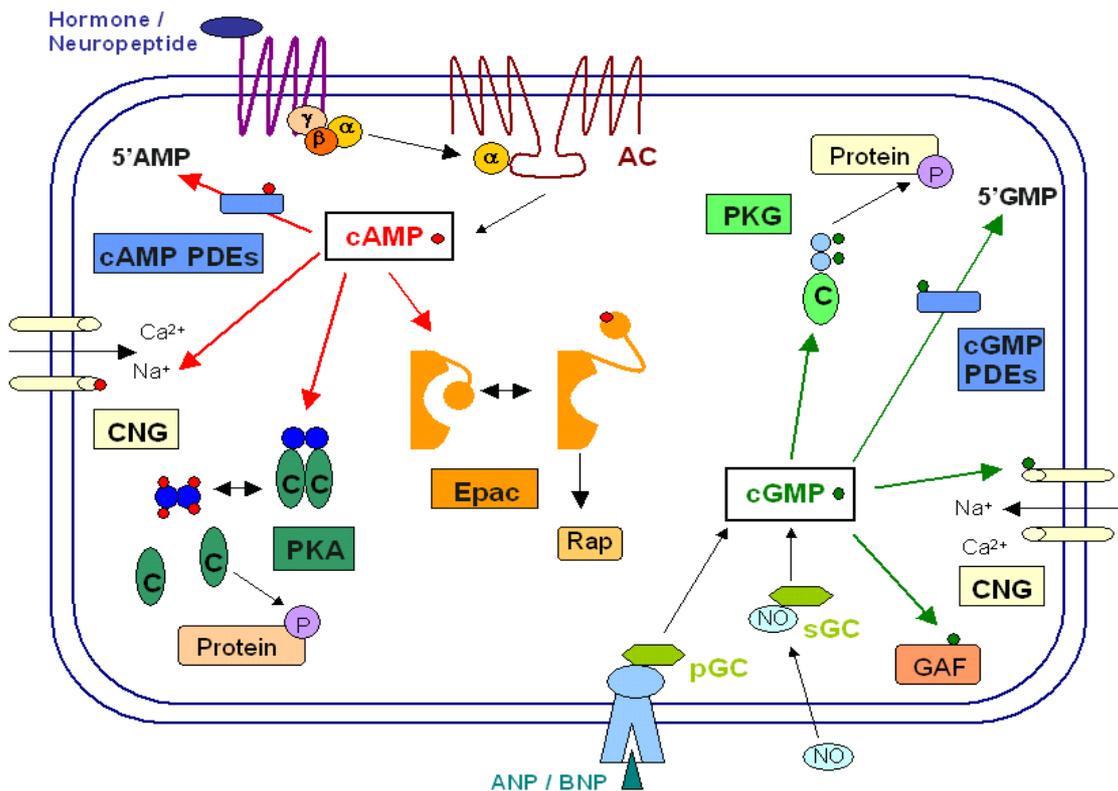


Abb. 1: Darstellung der über Cyclonukleotide regulierten Signalewege:

Während cAMP sowohl die PKA als auch Epac aktiviert, steigert cGMP die Proteinphosphorylierung durch PKG. Beide Cyclonukleotide können die Aktivität von Ionenkanälen in der Zellmembran regulieren. Die Hydrolyse der Cyclonukleotide durch die verschiedenen Familienmitglieder der Phosphodiesterasen beendet die Signaltransduktion.

PDEs sind intrazelluläre Enzyme, die durch Hydrolyse der Cyclonukleotide cAMP und cGMP die Spiegel dieser „second messenger“ maßgeblich beeinflussen. Bis heute sind elf PDE-Familien bekannt, wobei einige davon durch mehrere Gene kodiert werden. Allen Familienmitgliedern gemein ist eine hochkonservierte, etwa 270 Aminosäuren lange, C-terminale Domäne mit dem darin enthaltenen katalytischen Zentrum. In röntgenkristallographischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die aktiven Zentren der meisten PDEs aus 16 α -Helices aufgebaut sind. Diese bilden drei Untereinheiten, deren gemeinsame Schnittstelle als hydrophobe Bindungstasche fungiert (Francis et al., 2005). Weiter besitzen alle katalytischen Zentren mit dem fest gebundenen Zn^{2+} sowie einem zweiten, loser gebundenen Mg^{2+} oder Mn^{2+} für die enzymatische Reaktion essentielle Metallionen. Trotz dieser großen Gemeinsamkeiten zeigen die einzelnen Vertreter der PDEs enorme Unterschiede in ihrer Substratspezifität. Während die PDEs 3, 7 und 8 nur cAMP als Substrat akzeptieren, gelten die PDEs 5 und 6 als cGMP-spezifisch (Bender et al., 2006). Die Mitglieder der übrigen PDE-Familien sind sowohl zur Hydrolyse von cAMP als auch von cGMP in der Lage. Einen wichtigen Beitrag zur Fixierung der Cyclonukleotide im

katalytischen Zentrum liefert ein in allen PDEs hochkonserviertes Glutamin, welches direkt an die Purinbase bindet. Um die nötigen Wasserstoffbrückenbindungen sowohl zu cAMP als auch zu cGMP ausbilden zu können, muss dieses Glutamin frei rotierbar sein. Bei allen substratspezifischen PDEs dagegen ist die Aminosäure starr und ermöglicht wegen der dadurch festgelegten Orientierung der Basenbindung nur die Hydrolyse eines der beiden Cyclonukleotide (Zhang et al., 2004).

Bei den PDEs 2, 5, 6, 10 und 11 konnten als GAF-Domänen bezeichnete regulatorische Untereinheiten identifiziert werden, welche neben Protein-Protein-Interaktionen und Ligandenbindung auch enzymaktivierende Funktionen vermitteln (Zoraghi et al., 2004). Bisher gelang für die GAF-Domänen der PDEs 2, 5 und 6 der Nachweis, dass sie cGMP hochaffin binden und dadurch Einfluss auf die katalytische Aktivität des Holoenzym nehmen (Gillespie et al., 1989; Turko et al., 1998; Martinez et al., 2002).

Besonderheiten weisen die Mitglieder der PDE-1-Familie auf, da sie erst durch Bindung von Komplexen aus Calcium und Calmodulin vollständig aktiviert werden (Cheung et al., 1970). Somit stellen sie eine Schnittstelle zwischen Cyclonukleotid-vermittelten und Calcium-gesteuerten Signalwegen dar. Die besonders in den retinalen Photorezeptoren exprimierte PDE 6 besitzt eine autoinhibierende γ -Untereinheit sowie eine für die Wasserlöslichkeit bedeutende δ -Untereinheit und kann über lipophile Anker an die Zellmembran lokalisieren (Norton et al., 2005).

Trotz der großen Variabilität an Isoformen von PDEs findet sich keine hochspezifische Gewebeverteilung. Die Vertreter der Familien 4, 5, 7 und 10 konnten in fast allen murinen Geweben detektiert werden. In der aktuellen Fachliteratur häufen sich jedoch die Hinweise darauf, dass bestimmte Isoformen der PDEs durch eine spezifische subzelluläre Lokalisation die Spiegel von Cyclonukleotiden in begrenzten Zellkompartimenten regulieren und dadurch eine Feineinstellung von Signalen vornehmen (Barnes et al., 2005; Rich et al., 2001). Die komplexe Regulation der PDE-Aktivität kann neben veränderter Expression, Autoinhibition und Ligandenaktivierung auch über die Spiegel der Cyclonukleotide selbst vorgenommen werden. Die Bindung von cGMP an die GAF-Domäne von PDE 2 führt zur gesteigerten Hydrolyse sowohl von cGMP als auch von cAMP. In Zellen des Nebennierenmarks erhöhen natriuretische Peptide die cGMP-Spiegel und stimulieren somit die Degradation von cAMP, wodurch letztlich die von cAMP induzierte Synthese von Aldosteron inhibiert wird (Francis et al., 2005).

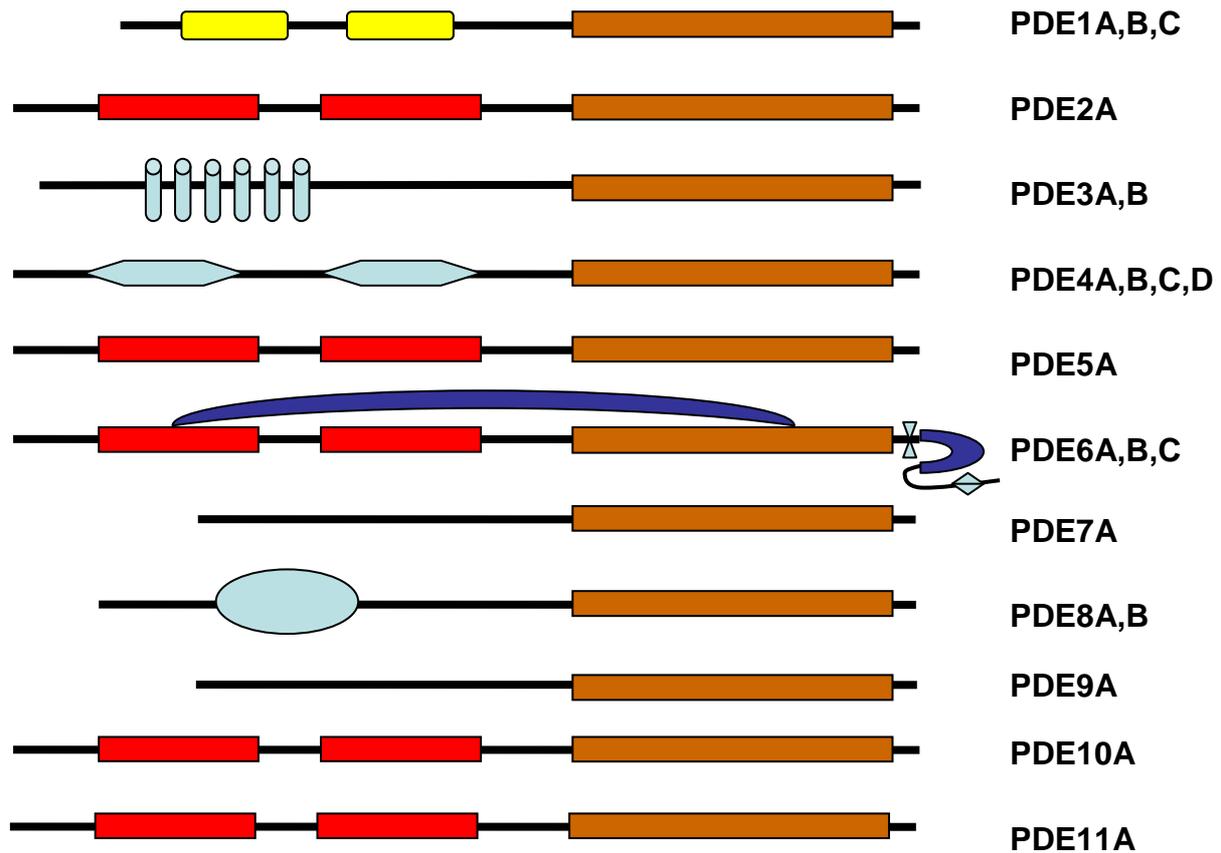
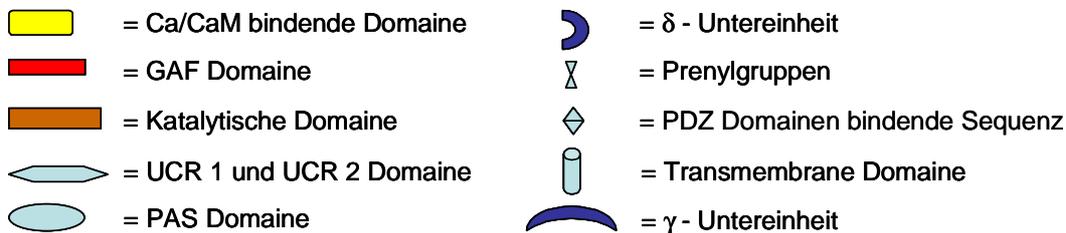


Abb. 2: Schematischer Aufbau und Strukturelemente der PDEs:



1.3. Zielsetzung des Cyclonukleotidprojekts

Neben den bekannten Mitgliedern der cAMP-abhängigen Proteinkinasen PKA I und PKA II und den cGMP-abhängigen Proteinkinasen PKG I α , PKG I β und PKG II sind als von Cyclonukleotiden regulierte Effektorproteine die Ionenkanäle CNG 1-4, die kürzlich beschriebenen Guaninnukleotidaustauschfaktoren Epac 1 und Epac 2 sowie die Cyclonukleotide spaltende Familie der PDEs von Bedeutung. All diese Proteine spiegeln dabei eigene Signalwege mit einer Vielzahl von biologischen Effekten wider. Um die genauen Zusammenhänge zwischen einem untersuchten Effektorprotein und der dazugehörigen Funktion in vivo beurteilen zu können, bedarf es einer Möglichkeit zur spezifischen Aktivierung dieses Effektors.

Daher spezialisierten sich einige Biotechnologieunternehmen auf die Synthese chemisch leicht modifizierter Analogsubstanzen der „second messenger“ cAMP und cGMP mit dem Ziel der selektiven Aktivierung oder Inhibition nur einzelner der genannten Proteine.

Derartige Derivate müssen einige generelle Anforderungen erfüllen. Neben einer hohen Spezifität für das Zielprotein sollte die Substanz eine hohe Affinität aufweisen und so die gewünschten Effekte auch schon in niedriger Konzentration hervorrufen. Durch eine ausreichend hohe Lipophilie kann eine gute Membranpermeabilität gewährleistet werden. Zudem ist darauf zu achten, dass die Derivate nicht von PDEs als Substrat akzeptiert werden und es somit nicht durch eine effiziente Hydrolyse zur schnellen Senkung der intrazellulären Konzentration kommt. Außerdem dürfen die Analogsubstanzen nicht als potente Inhibitoren der PDEs wirken, da dies zu einem Anstieg der Spiegel der physiologischen Cyclonukleotide cAMP und cGMP führen und dadurch vielfältige Nebeneffekte hervorrufen könnte.

Obwohl Analoga in der Erforschung von Cyclonukleotid-vermittelten Effekten seit vielen Jahren Verwendung finden, ist bislang nur sehr wenig über die tatsächlichen Wechselwirkungen der Derivate mit den verschiedenen Effektorproteinen bekannt. In einer der wenigen Arbeiten auf diesem Gebiet wurden insgesamt 42 chemisch synthetisierte Derivate auf ihre Potenz zur Inhibition von Proteinkinasen getestet (Bain et al., 2003). Über mögliche Effekte dieser Substanzen auf andere Cyclonukleotid-regulierte Proteine jedoch konnten keine sicheren Aussagen getroffen werden.

Um mehr Klarheit über das Wirkspektrum einzelner Analogsubstanzen zu gewinnen, haben sich mehrere Wissenschaftler zusammengeschlossen und systematisch die Effekte einiger der am häufigsten verwendeten Cyclonukleotidderivate auf die verschiedenen Effektorproteine analysiert. Für dieses aus Würzburg gesteuerte internationale Cyclonukleotidprojekt wurden von der Firma BIOLOG insgesamt elf Derivate bereitgestellt mit dem Ziel, umfassende Kenntnisse über die relevanten kinetischen Konstanten der Substanzen zu erhalten. Hierdurch soll es Forschern in Zukunft ermöglicht werden, das für ihre spezifische Fragestellung am besten geeignete Derivat auszuwählen und mögliche Nebeneffekte schon im Vorfeld der Experimente zu berücksichtigen.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist die Bestimmung der kinetischen Konstanten von elf der am häufigsten genutzten Analogsubstanzen der Cyclonukleotide cAMP und cGMP an verschiedenen Vertretern der PDEs. Hierfür wurde die von Todd 2001 publizierte, hochpräzise Methode zur kontinuierlichen mikrokalorimetrischen Datenmessung angewandt und durch eine Modifikation des Versuchsprotokolls ihre Aussagekraft erweitert. Dadurch wurde es möglich, neben der Erhebung von Hydrolysedaten auch eine quantitative Analyse einer durch hydrolysestabile Derivate verursachten Inhibition von PDEs durchzuführen. In Zusammenarbeit mit der Firma BIOLOG aus Bremen wurden neben einigen etablierten Derivaten auch neuere Analogsubstanzen mit potentiell verbesserten kinetischen Eigenschaften für die Experimente ausgewählt. Zwar besitzen diese meist eine hohe Affinität für ihr Zielprotein und erlauben auf Grund ihrer lipophilen Eigenschaften die Passage der Zellmembran, über ihre Hydrolysestabilität sowie mögliche Kreuzreaktionen durch eine Inhibition von PDEs ist bisher jedoch wenig bekannt. In umfangreichen Arbeiten mit an verschiedenen Positionen substituierten Cyclonukleotiden konnten elementare Erkenntnisse über die Interaktionen von cAMP- und cGMP-Analoga mit den katalytischen Zentren der PDE-Familien 1, 2, 3, 4, 5 und 6 gewonnen werden (Butt et al., 1995; Beltmann et al., 1995). Allerdings wurden trotz vieler Weiterentwicklungen bei der Synthese von Cyclonukleotidderivaten und der Entdeckung etlicher neuer Formen von PDEs seither keine systematischen Untersuchungen mehr über kinetische Eigenschaften von Analogsubstanzen durchgeführt. Durch die in dieser Arbeit ermittelten Daten soll es Wissenschaftlern, die an durch Cyclonukleotide regulierten Proteinen forschen, erleichtert werden, ein für ihre Fragestellung geeignetes Derivat auszuwählen. Zudem könnten die kinetischen Größen eine Abschätzung der nötigen Derivatkonzentration sowie die Berücksichtigung möglicher Nebeneffekte durch Veränderung der intrazellulären Spiegel von cAMP und cGMP erleichtern.

Da sowohl die nötige Geräteausstattung als auch ein Großteil der schwer zu exprimierenden und häufig instabilen Phosphodiesterasen in den Laboratorien von Professor Joseph Beavo in Seattle verfügbar waren, wurden die Experimente in den USA durchgeführt. Die Phosphodiesterasen 1A, 1B, 1C, 2A, 4D3, 5A, 6_{cone} und 10A wurden in Zusammenarbeit mit der „Proteinfacility“ der University of Washington für die anschließenden Versuche mit dem Mikrokalorimeter exprimiert und aufgereinigt.

2. Material

2.1. Bakterien

2.1.1. Bakterienstämme (*E. coli*)

BL21 (DE3) Cells	Invitrogen	Expression rekombinanter Proteine
DH5 α TM Cells	Invitrogen	Expression rekombinanter Proteine

2.1.2. Medien und Agarplatten

Low Salt LB Medium:

Tryptone	10.0 g
Yeast extract	5.0 g
NaCl	10.0 g
Tirs / Tris HCl buffer	1.5 g

Ad 1l dH₂O

Der pH wurde auf 7,0 eingestellt. Für Agarplatten wurden 5 g/l Agar zugegeben.

Ampicillinzusatz für Medien und Agarplatten:

Verwendete Endkonzentration: 100 μ g/ml Ampicillin

Stammlösung: 100 mg/ml in 50 % Ethanol

Die Stammlösung wurde bei -20 °C gelagert.

Das Antibiotikum wurde nach dem Autoklavieren dem Medium zugefügt.

2.2. Kulturzellen (Insect Cells)

SF9 Cells (<i>Spodoptera fugiperda</i>), SFM Adapted	Invitrogen
High Five TM Cells (<i>Trichoplusia ni</i>), SFM Adapted	Invitrogen

2.3. Lösungen und Medien für die Zellkultur

Grace's Insect Medium	Invitrogen
Fetal Bovine Serum	Invitrogen
Pen-Strept-Glut-Mix	BioWhittaker
Sf 900 II SFM Medium	Invitrogen

2.4. Vektoren

Vektor	Resistenz	Bezugsquelle	Verwendungszweck
pFastBac™1	Amp	Invitrogen	Expression von PDE 10A in Insektenzellen
pGEX-5x-1	Amp	Amersham Pharmacia Biotech	Expression von PDE 4D3 in DH5α™ Zellen
pRUNH	Amp	Eigene Synthese (Beavo)	Expression von PDE 2 und PDE 5 in BL21 (DE3) Zellen
pFastBac™Dual	Amp	Invitrogen	Coexpression von Calmodulin und PDE 1A, 1B oder 1C in Insektenzellen

2.5. Proteinkonstrukte

GST - PDE 1A und 6x - His - PDE 1A:

PDE 1A - N₁ - Nde I

5' TAG TAG TAG CAT ATG GGG TCT ACT GAT ACG GAC ATC GAA GAA 3'

PDE 1A - C₅₄₅ - Not I

5' TAG TAG TAG GCG GCC GC CTA CTA TGG ACG TGT GTC AGC ATG CTT TTC TTC 3'

GST - PDE 1B1 und 6x - His - PDE 1B1:

PDE 1B1 - N₁ - Nde I

5' TAG TAG TAG CAT ATG GAG CTG TCC CCC CGC AGT CCT CCA GAG 3'

PDE 1B1 - C₅₃₅ - Not I

5' TAG TAG TAG GCG GCC GC CTA CTA ATC CAG ATT CCC ATT CTG GTT GTG CTC 3'

GST - PDE 1C und 6x - His - PDE 1C:

PDE 1C - N₁ - Nde I

5' TAG TAG TAG CAT ATG GAG TCT CCA ACC AAG GAA ATT GAA GAA 3'

PDE 1C - C₆₅₄ - Not I

5' TAG TAG TAG GCG GCC GC CTA CTA TCC GTA GTC TCC TGG CAA GGT AAT GCG 3'

GST - CaM und 6x - His - CaM:

CaM - N₁ - Nde I

5' TAG TAG TAG CAT ATG GCT GAT CAG CTG ACT GAC GAG CAG ATC 3'

CaM - C₁₄₉ - Not I

5' TAG TAG TAG GCG GCC GC CTA CTA CTT AGC CAT CAT AAC CTG AAC GAA CTC 3'

mPDE 2A:

mPDE 2A - N - ABC (207)

5'TAG TAG TAG GTC GAC GAA GAT CAA AAG GAT GAG AAG GGG 3'

mPDE 2A - C - BC₂ (933)

5' TAG TAG TAG GAA TTC CTA CTA GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCC CTC GAG GCT GCA GCA GCC ATT 3'

mPDE 5A:mPDE 5A - N₁ - Nde I

5' TAG TAG TAG CAT ATG GAA CGA GCG GGC CCC 3'

mPDE 5A - NH - C_{ter} (865D)

5' TAG TAG TAG CTC GAG CTA CTA GTC CCG CTT GCC CTD GCT GCT 3'

mPDE 10A:mPDE 10A - N₁ - Nde I

5' TAG TAG TAG CAT ATG GAA AAA TTA TAT GGT TTG ACG GAT GAA 3'

mPDE 10A - C₇₇₉ - Not I

5' TAG TAG TAG GCG GCC GCC TAC TAG TCT TCA ACC TTC ACG TTC AGC TTC TC 3'

2.6. Cyclonukleotide und Cyclonukleotid-Analoga (BIOLOG)

<i>Derivat</i>	<i>Molare Masse</i>	<i>Absorptionsmaximum</i> λ_{max} [nm]	<i>Extinktionskoeffizient</i> ϵ
cAMP	329.2	258	15.000
8-Br-cAMP	430.1	264	17.000
6-Bnz-cAMP	455.3	279	17.000
8-pCPT-2'-O-Me-cAMP	507.8	282	16.000
Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS	523.9	282	16.000
Rp-8-Br-cAMPS	446.2	264	17.000
cGMP	437.3	252	13.500
8-Br-cGMP	446.2	260	15.000
8-Br-PET-cGMP	546.2	256	40.000
8-pCPT-cGMP	509.8	276	21.500
Rp-8-pCPT-cGMPS	525.9	276	21.500
Rp-8-Br-PET-cGMPS	562.3	256	40.000
Sp-5,6-DCI-cBIMPS	419.2	254	6.400

Die Substanzen wurden vom BIOLOG Life Sciences Institute aus Bremen bereitgestellt. Alle Derivate wurden in 40 mM MOPS gelöst und der pH-Wert mittels dünner pH-Elektrode auf 7,5 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Durch Ummantelung mit Aluminiumfolie konnten die lichtsensitiven Derivate 8-pCPT-cGMP und Rp-8-pCPT-cGMPS vor Zerstörung geschützt werden. Die Konzentration der Derivate wurde durch Messung der optischen Dichte am Spektrophotometer bestimmt.

2.7. Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid 30 %	Sigma
Acid Molybdate	Sigma
Ammoniumsulfat	Merck
Ascorbinsäure	Sigma
Bisacrylamid	Sigma
1-Butanol	Sigma
Calyculin A	Calbiochem
Coomassie® Plus Protein Assay Reagent	Pierce
Isoton® Diluent 20 I	Coulter®
ECC Plus Western Blotting Detection System	Amersham
EDTA	Sigma
EGTA	Sigma
Glycerin	Sigma
Glycerol	Sigma
Glutathion	Sigma
Hepes	Sigma
Mercaptoethanol 14 M	Fluka BioChemika
Methanol	J. T. Baker
MOPS	Sigma
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ponceau	Sigma
Pyronin Y	Sigma
SDS	Fisher Scientific
Ultima Gold Szintillationsflüssigkeit	Packard BioScience
Temed	Bio-Rad
Tris	J. T. Baker

2.8. Enzyme

5'-Nucleotidase (Crotalus Atrox Venom)	Sigma
--	-------

2.9. Proteine

Histone (Calf Thymus Type III – S)	Sigma
Protease Inhibitor Cocktail Set III	Calbiochem

2.10. Größenstandard

Prestained Ladder 10-180 kDA	Fermentas
------------------------------	-----------

2.11. Kits

Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System	Invitrogen
Elektrophorese-Kit mini Vertical Electrophoresis	Fisher Scientific
Large Gel Drying Kit	Invitrogen

2.12. Transfektionsreagenz

Cellfectin® Reagent	Invitrogen
---------------------	------------

2.13. Antikörper

Primärantikörper:

Bezeichnung	Typ	Bezugsquelle	Verdünnung
Phospho-S239-VASP 16C2	Maus IgG1	Nanotools	1:1000

Sekundärantikörper:

Bezeichnung	Typ	Bezugsquelle	Verdünnung
Goat anti mouse	Merrettich-Peroxidase	Bio-Rad	1:5000
Goat anti rabbit	Merrettich-Peroxidase	Bio-Rad	1:5000

2.14. Verbrauchsmaterialien

Dry Ease Mini Cellophane	Invitrogen
Film für Chemilumineszenz	X-RAY FILM 100 NIF (FUJI MEDICAL)
Glassichtfolie 901	Tartan™
Ionenaustauschsäule DEAD Sephadex	Sigma
50 kD-Zentrifugen-Filter	Millipore
Nitrocellulosemembran	PROTRAN® Nitrocellulose Transfer Membrane (Schleicher & Schuell)
96 Well Assay Plate	Costar®

2.15. Geräte

Blotkammer	Trans-Blot™ Cell (Bio-Rad)
Feinwaage	BP 121 S (Sartorius)
Filmentwicklermaschine	X-OMAT M 35 (Kodak)
Geräte für die Zytolyse	Microfluidizer Processor M-110EHI (Microfluidics Corp.) Microfractionator (Gilson)
Heizplatten	Pyro-Magnestir (Lab-Line-Instruments) Spin Mark (Markson)
Hood	BioGardHood (The Baker Company)
Konduktivitätsmesser	Conductivity meter (Palmer)
Microcalorimeter	VP-ITC (Microcal)
Mikroskop	Eclipse TS 100 (Nikon)
pH-Meter	PHM 82 Standard pH Meter (Radiometer Copenhagen) PH Electrode 130 mm Stem Length (Sigma-Aldrich)
Platereader	Precision microplare reader E _{max} (Molecular Devices)
Scanner	Perfection 636 U (Epson)
Schüttelinkubatoren	4430 Incubator Shaker (Innova) C24KC reffridgerated incubator shaker (New Brunswick Scientific)
Spannungsquelle	Power Pac® 1000 (Bio-Rad)
Speedvac	Speed-Vac Plus RC 110A (Savant)
Spektrometer	Thermo Spectronic (Biomate) Diode Array Spectrophotometer 8452A (Hewlett Packard)
Vortexgeräte	Fisher Vortex Genie 2 (Fisher Scientific) Deluxe Mixer S8220 (American Scientific)

	Products)
Wasserbad	Water Bath (Precision)
Zellzähler (Vollblut)	MicroDiff 18 (Beckmann Coulter®)
Zentrifugen und Rotoren	Micro 7 (Fisher Scientific) L8-70M Ultracentrifuge / Rotor 45 TI (Beckmann) Model J-GB Centrifuge (Beckmann)

2.16. Software

<i>Programm</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verwendungszweck</i>
Epson Twain 3	Epson	Zurechtschneiden und Formatieren gescannter Gele
GraphPad Prism 4	GraphPad Software	Analyse koordinativer Hydrolysemechanismen Quantifizierung der Phosphodiesterasen
Origin 7.0	OriginLab®	Analyse der im ITC gewonnenen Hydrolysedaten
Un-Scan-It	Silk Scientific	Quantifizierung der Proteinbanden gescannter Gele

3. Mikrokalorimetrische Methoden

3.1. Anwendung, Aufbau und Funktionsprinzip des Mikrokalorimeters

Die Mikrokalorimetrie wird seit einigen Jahren zunehmend als zuverlässige und einfache Methode zur Erhebung kinetischer Daten angewandt. So konnte die katalytische Aktivität des Celluloseabbaus durch den Wildtyp der β -D-Glucosidase und durch weitere neun thermostabile Mutanten dieses Enzyms mikrokalorimetrisch bestimmt werden (Jeoh et al., 2005).

In einer anderen Arbeit wurde die Hydrolyse von Glycosidbindungen in Oligo- und Polysacchariden durch verschiedene Formen der α -Amylase untersucht. Dabei zeigte sich unter anderem, dass der Stärkeabbau durch Maltosemoleküle nach dem linear-mixed Typ inhibiert wird (D'Amico et al., 2006).

Neben Hydrolyseexperimenten wird die Mikrokalorimetrie auch als Hochdurchsatzmethode von Bindungsstudien genutzt. Bei der Suche nach neuen Chemotherapeutika zur Behandlung von Leukämien wurde die Affinität synthetisch hergestellter 4-Arylcoumarin-Analoga von Combretastatin für die Tubulinbindung bestimmt. Zwei der getesteten Derivate waren wegen ihrer festen Bindung an Tubulin in der Lage, die Polymerisation zu einem mikrotubulären Netzwerk zu inhibieren. Als therapeutische Wirkung hiervon erhofft man sich einen Mitoseblock sowie die Induktion der Apoptose und damit letztlich ein reduziertes Überleben maligne transformierter Leukämiezellen (Rappl et al., 2006).

Das Mikrokalorimeter VP-ITC von MicroCal besteht aus zwei zylinderförmigen Zellen - einer Messzelle und einer Referenzzelle. Die Referenzzelle wird mit destilliertem Wasser gefüllt; die ein Volumen von 1,42 ml fassende Messzelle kann je nach Versuchsprotokoll mit in geeignetem Puffer gelöstem Makromolekül, Substrat oder Ligand gefüllt werden. Beide Zellen besitzen in der Mitte des Dachs eine kleine Öffnung, durch welche der gewünschte Zellinhalt mit einer dünnen Metallkanüle platziert oder entnommen werden kann. Umgeben sind beide Zellen von sehr sensiblen Temperatursensoren. Diese sind in der Lage, selbst kleinste Temperaturunterschiede von wenigen Mikrokalorien zwischen den Zellen zu detektieren.

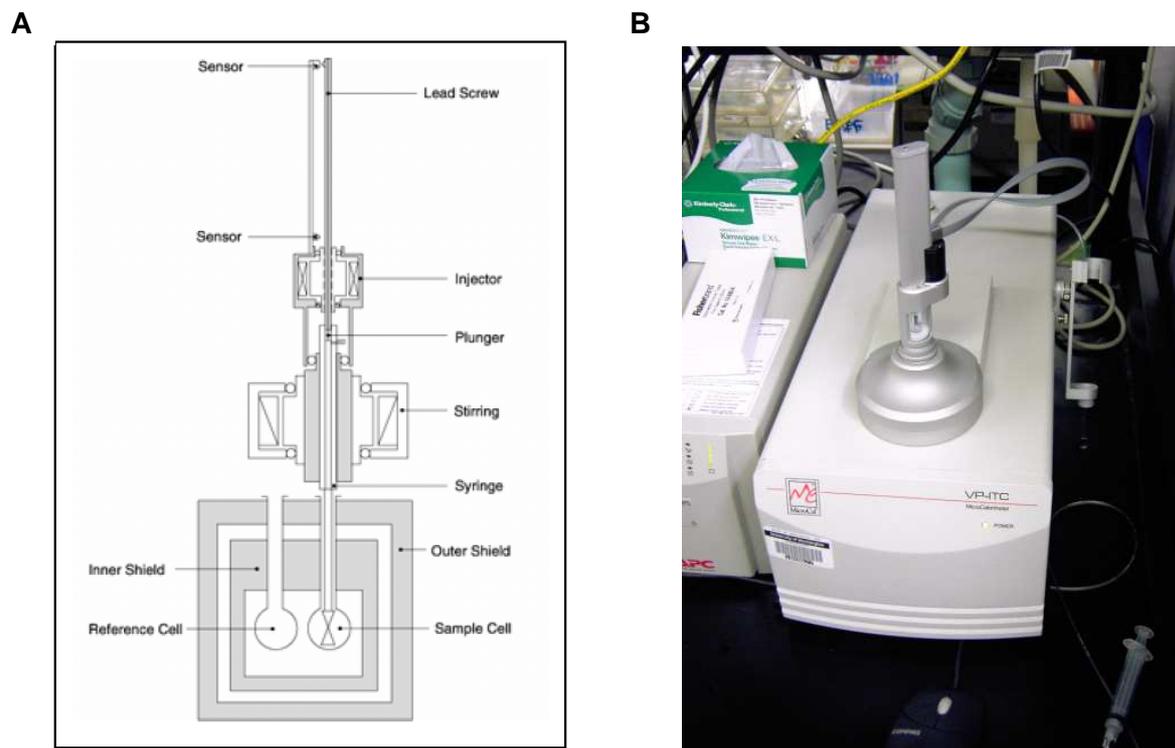


Abb. 3: Schematischer Aufbau (A) und Fotografie (B) des Mikrokalorimeters:

Die feine Metallkanüle der motorgesteuerten Injektionspritze ist in der Messzelle platziert. Mess- und Referenzzelle sind von hochsensitiven Temperatursonden umgeben.

Bei einem Experiment werden Referenz- und Messzelle durch integrierte Heizelemente stets auf dem vom Versuchsleiter gewählten Temperaturniveau gehalten. Dieses muss aus technischen Gründen zwischen 2 °C und 80 °C liegen. Nach dem Füllen der Messzelle mit der für die Untersuchung gewählten Flüssigkeit erwärmen die Heizelemente den Inhalt von Mess- und Referenzzelle auf die eingestellte Temperatur. Für das Hinzugeben der Derivatlösung wird die feine Metallkanüle einer durch einen Motor gesteuerten Injektionsvorrichtung durch die Öffnung im Dach der Messzelle angebracht. Hierdurch wird auch die Abdichtung des gesamten Systems erreicht. An ihrem Ende ist die Injektionskanüle spiralförmig gewunden, so dass durch ihre Rotation eine gute Durchmischung der injizierten Flüssigkeit mit der schon vorher in die Messzelle eingebrachten Lösung der PDE gewährleistet wird.

A



B

**Abb. 4: Elemente eines mikrokalorimetrischen Experiments:**

Mehrere Geräte (A) befinden sich auf der Arbeitsfläche. Neben dem Mikrokalorimeter (rechts) werden auch die Stromquelle für das Heizelement (Mitte) sowie das zum Anwärmen und Entgasen benutzte ThermoVac (links) für die Experimente benötigt.

Die motorgesteuerte Injektionsvorrichtung (B) besitzt eine dünne, an der Spitze spiralförmig gewundene Metallkanüle. Durch die Rotation mit konstanter Geschwindigkeit wird ein gutes Durchmischen der Reaktionskomponenten sichergestellt.

Haben Referenz- und Messzelle die identische Zieltemperatur erreicht, so beginnt die Injektionspritze mit der vorher wählbaren Umdrehungsrate von 0, 270, 310, 500 oder 580 rpm zu rotieren. Nun wird für einige Minuten die Basislinie äquilibriert und anschließend durch Injektion des Derivats die Reaktion gestartet.

Während die Referenzzelle nicht von dem Versuch beeinflusst wird und daher auch keinen Temperaturschwankungen unterliegt, nehmen die in der Messzelle ablaufenden chemischen Reaktionen unter Generierung oder Absorption von Wärme Einfluss auf die dort herrschende Temperatur. Das Funktionsprinzip der Mikrokalorimetrie ist nun, dass durch die sensiblen Temperatursonden sehr geringe Temperaturunterschiede zwischen Mess- und Referenzzelle quantitativ bestimmt und durch Anpassung der Leistung des Heizelements der Messzelle sofort automatisch ausgeglichen werden. Beide Zellen besitzen demnach während des gesamten Experiments eine identische Temperatur.

Wird bei der in der Messzelle ablaufenden Reaktion also Energie in Form von Wärme frei, so zeigt sich auf dem Bildschirm eine Änderung der Heizleistung ins Negative genau um den Betrag pro Zeiteinheit, den die exotherme Reaktion liefert. Umgekehrt beobachtet man bei endothermen Reaktionen, die nur unter Energieabsorption ablaufen können, eine ins Positive gehende Änderung der Heizleistung.

3.2. Allgemeine Vorbereitungen der ITC-Assays

Die kinetischen Konstanten der PDEs wurden mittels VP-ITC der Firma Microcal bestimmt. Zu 2,5 ml Reaktionspuffer wurde die für eine ausreichende Reaktionsgeschwindigkeit nötige Menge an PDE in ein Plastikröhrchen beigefügt. Dieses wurde daraufhin in dem Gerät ThermoVac für 5 Minuten entgast und dabei durch ein integriertes Heizsystem auf eine Temperatur von 28 °C erwärmt. Kleine Rührmagneten gewährleisteten in diesem Zeitraum ein gutes Durchmischen des Reaktionsansatzes.

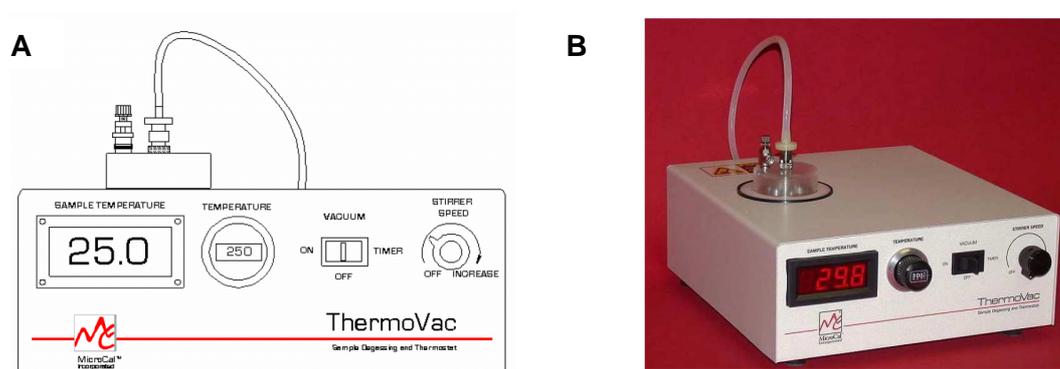


Abb. 5: Skizze (A) und Fotografie (B) des ThermoVac:

Die Phosphodiesterasen wurden mit Reaktionspuffer in einem Plastikröhrchen gelöst. Das ThermoVac erwärmte die Lösung auf 28 °C und entgaste das Volumen durch den angelegten Unterdruck. Eine laufende Durchmischung wurde durch kleine Rührmagneten erreicht.

Folgende Reaktionspuffer wurden bei den Experimenten mit dem ITC verwendet:

5-fach Reaktionspuffer für die PDEs 1A, B und C:

Tris 1 M pH 7,5	100 ml
Imidazol 1,5 M	67 ml
MgCl ₂ 25 mM	600 ml
CaCl ₂ 1 M	1 ml
BSA 100 mg/ml	10 ml
Calmodulin 0,8 mg/ml	25 ml

Ad 1 l dH₂O

Für die Versuche wurden zu 0,5 ml konzentriertem Reaktionspuffer 2,0 ml dH₂O zugegeben.

Reaktionspuffer für die PDEs 2A, 4D3, 5A und 10A:

Puffer A	10 ml
Puffer B	10 ml
	Ad 50 ml dH ₂ O

Reaktionspuffer für PDE 6:

Puffer A	10 ml
Puffer B	10 ml
Histon 25 mg/ml	2,5 ml
Ad 50 ml dH ₂ O	

Puffer A:

MOPS	100 mM pH 7,5
EGTA	4 mM
BSA	1 mg/ml

Puffer B:

MOPS	100 mM pH 7,5
MgAcetat	75 mM

Anschließend wurde die PDE enthaltende Pufferlösung in eine Glasspritze mit langer Metallkanüle aufgezogen und in die 1,42 ml fassende Reaktionszelle des Mikrokalorimeters durch die kleine Öffnung im Dach bis zum Sichtbarwerden der Flüssigkeit vorsichtig injiziert. Um sicherzugehen, dass sich keine Luftblasen in der Reaktionszelle befinden, wurde drei bis vier mal etwa die Hälfte der applizierten Lösung langsam und gleichmäßig resuspendiert. Hierauf wurde die Metallkanüle langsam nach oben bewegt, bis sie den aus einer Plasticscheibe mit zentraler Öffnung bestehenden Oberrand der Reaktionszelle passierte. Das sich hier befindende überschüssige Volumen wurde abgesaugt, so dass die Zelle genau bis zur richtigen Höhe gefüllt war. Als Zieltemperatur der Reaktionszelle wurden 30 °C gewählt. Daher musste der Reaktionszelle vom Heizelement des Mikrokalorimeters noch für wenige Minuten eine geringe Menge an Wärme zugeführt werden.

Während dieser Zeit wurde die Injektionsvorrichtung gefüllt. Das zu testende Derivat wurde in 40 mM MOPS bei einem pH-Wert von 7,5 in einem solchen Verhältnis gelöst, dass man in einem Eppendorfröhrchen ein Volumen von 1 ml in der gewünschten Konzentration erhielt. Nach Durchmischen in einem Vortexgerät wurden gut 600 µl hiervon in ein dünnes Glasröhrchen gefüllt und dieses in den Gummiring der Haltevorrichtung für die Injektionsspritze geklemmt. Die vorher gründlich gespülte und danach von Restwasser befreite Injektionsspritze wurde nun in die Halteapparatur eingehängt, wobei die metallene Kanüle durch den Gummiring bis knapp vor den Boden des Glasröhrchens vorgeschoben wurde. Mit dem Befehl „open fill port“ wurde computergesteuert der kleine Plastikkolben im Inneren der Injektionsspritze soweit nach oben bewegt, bis durch eine kleine Öffnung in der Mitte eines Metallstifts eine freie Verbindung zwischen dem Spritzeninnenraum und der

Außenluft bestand. An diesen Metallstift wurde nun ein dünner Plastikschauch angeschlossen und dieser am anderen Ende mit einer Plastikspritze verbunden. Durch langsames Ziehen am Kolben der Plastikspritze baute sich ein Unterdruck in der Injektionsspritze auf, der letztlich ein Ansteigen der Derivatlösung und damit ein Füllen der Injektionsspritze bewirkte.

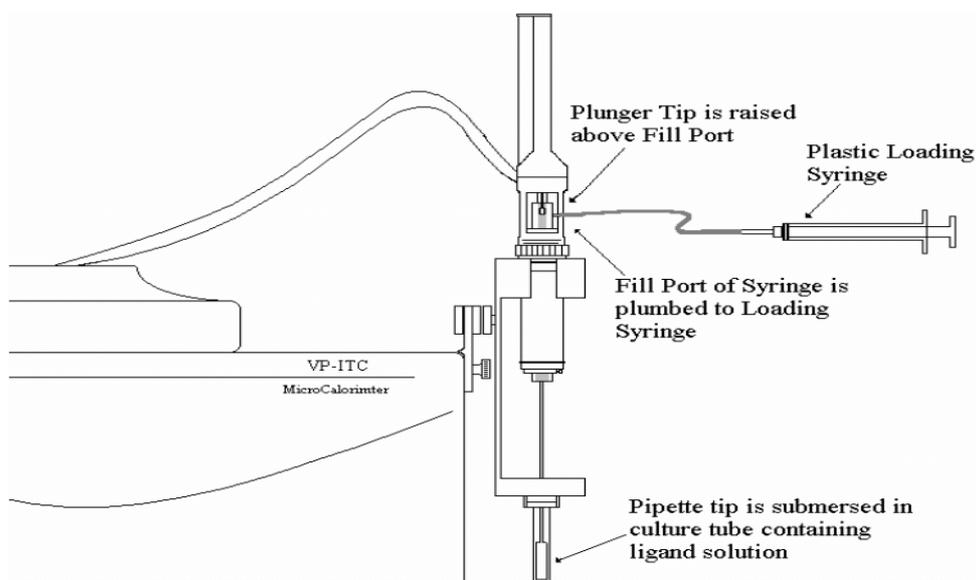


Abb. 6: Laden der Injektionsspritze:

Über einen Plastikschauch wird eine Plastikspritze an die Injektionsvorrichtung angeschlossen. Mit dieser kann nun ein Unterdruck im Inneren der Injektionsspritze erzeugt werden. Dadurch verursacht man ein Ansteigen der sich in einem Glasröhrchen befindenden Derivatlösung durch die Metallkanüle und somit die Füllung der Injektionsspritze.

Auf den Befehl „close fill port“ bewegte sich der Plastikkolben wieder wenige Millimeter nach unten, unterbrach dadurch die Verbindung zu der noch angeschlossenen Plastikspritze und dichtete so das System ab. Nun konnte der Plastikschauch langsam von dem Metallstift entfernt werden.

Um zu gewährleisten, dass sich keine Luftblasen im Inneren der Injektionsspritze befinden, wurde der Befehl „purge and refill“ gegeben. Dies bewirkte, dass sich der Plastikkolben bis an den Boden der Injektionsspritze bewegte und so das gesamte Volumen samt noch enthaltener Luftblasen zurück in das Glasröhrchen drängte. Das direkt folgende Wiederansteigen des Plastikkolbens führte durch den erzeugten Unterdruck zu einer blasenfreien Füllung der Injektionsspritze mit der sich im Glasröhrchen befindenden Flüssigkeit. Nachdem die dünne Metallkanüle der Injektionsspritze mit einem feuchten Tuch vorsichtig von noch daran haftender Derivatlösung befreit wurde, konnte sie behutsam durch die Öffnung im Dach

senkrecht in die Messzelle eingeführt werden. Ein hörbares Einrasten zeigte die korrekte Lage der Injektionsspritze an. Anschließend wurden die Versuchsbedingungen im Hauptmenü von VPViewer 2000 festgelegt.

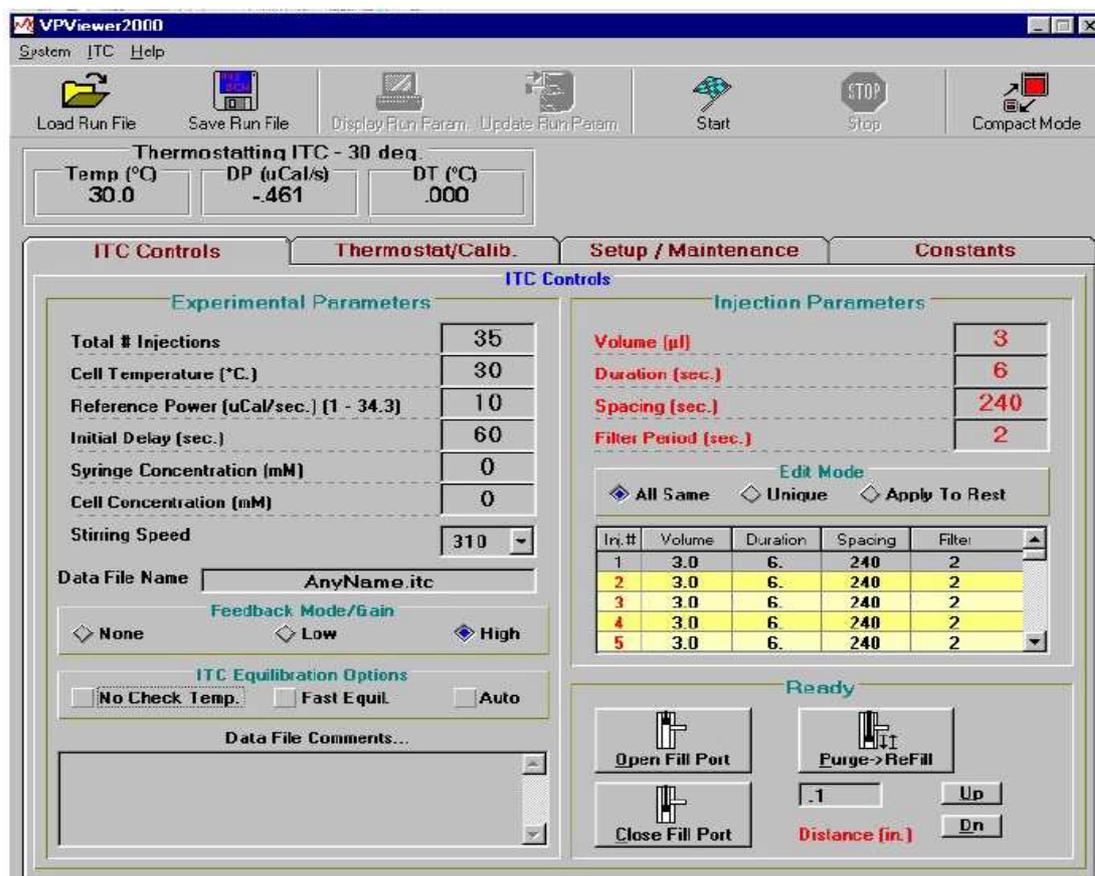


Abb. 7: Hauptfenster des Bedienungsmenüs des ITC:

Über die Befehle im unteren rechten Bereich wird der Füllvorgang der Injektionsspritze gesteuert. Die Parameter im mittleren Bereich des Bildschirms werden vom Versuchsleiter für das Experiment entsprechend festgelegt. Mit dem Button „Start“ in der Befehlsleiste oben setzt man den Versuch in Gang.

Bevor das Experiment gestartet werden konnte, mussten auf dem Bildschirm noch folgende für den jeweiligen Versuch angepasste Parameter eingestellt werden.

Number of Injections:	Anzahl der Derivat-Injektionen pro Experiment
Cell Temperature:	Temperatur in Referenz- und Messzelle (2 °C – 80 °C)
Reference Power:	Energieniveau, auf dem die Basislinie äquilibriert wird (1 µcal – 34 µcal)
Syringe Concentration:	Konzentration des Derivats in der Injektionslösung
Cell Concentration:	Konzentration des Derivats in der Messzelle vor Versuchsstart
Stirling Speed:	Anzahl der Rotationen der Injektionsspritze pro Minute (0, 270, 310, 500 oder 580 rpm)

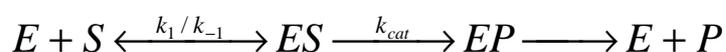
Volume:	Zu injizierendes Volumen der Derivatlösung
Duration:	Gesamtdauer des Injektionsvorganges
Spacing:	Zeitdauer der Energieaufzeichnung nach der Injektion
Filter Period:	Zeitabstand zwischen den Einzelmessungen der Heizleistung

Alle Versuche wurden mit nur einer Injektion und anschließender kontinuierlicher Aufzeichnung der Heizleistung durchgeführt. Außerdem wurde stets eine Zelltemperatur von 30 °C, ein „stirring speed“ von 310 rpm, ein hoher „feedback mode“, eine schnelle und automatische Äquilibration sowie eine „filter period“ von zwei Sekunden gewählt. Da vor Versuchsstart kein Derivat in die Messzelle eingebracht wurde, betrug auch dessen Konzentration stets 0 mM. Die „reference power“ wurde je nach Größenordnung der erwarteten bei der Reaktion freigesetzten Energie auf Werte zwischen 1 und 34 $\mu\text{cal}/\text{sec}$ eingestellt. Bei schnellen und viel Wärme freisetzenden Reaktionen konnten höhere Werte toleriert werden, wohingegen bei nur langsam ablaufenden Reaktionen mit geringer Wärmefreisetzung eine ausreichend hohe „signal-to-noise-ratio“ durch eine niedrige „reference power“ gesichert sein musste. Als „syringe concentration“ wurde die Konzentration des Derivats in der Injektionslösung angegeben. Die Konzentration der zur Verdünnung herangezogenen Stammlösung wurde vorher photometrisch bestimmt.

Um Mixartefakte sowie den Verdünnungseffekt auf der einen Seite und Ungenauigkeiten durch zu geringe Injektionsvolumina auf der anderen Seite so gering wie möglich zu halten, wurden nur Volumina zwischen 5 μl und 20 μl injiziert. Für die Dauer der Injektion von 1 μl wurden 2 Sekunden festgelegt, so dass sich Gesamtinjektionszeiten von 10 bis 40 Sekunden ergaben. Da die Heizleistung so lange aufgezeichnet werden musste, bis sämtliche Substratmoleküle hydrolysiert wurden und die Heizleistungskurve demnach wieder das Ursprungsniveau der Basislinie erreichte, wurde die erforderliche „spacing time“ maßgeblich von der Schnelligkeit der enzymatischen Reaktion bestimmt. Diese betrug, abhängig von der maximalen Umsatzrate der untersuchten PDE, Werte zwischen 300 und 10.000 Sekunden.

3.3. Bestimmung kinetischer Daten von Substraten

Die Mikrokalorimetrie ist eine schnelle, einfache und sensitive Methode, um enzymkinetische Größen zu bestimmen, welche unter folgendem Mechanismus ablaufen:



Dabei bindet Enzym E am katalytischen Zentrum reversibel das Substrat S unter Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes ES. Aus diesem wird in einer irreversiblen Reaktion mit der Umsatzrate k_{cat} das Substrat S in das Produkt P umgewandelt. Schließlich dissoziiert der Enzym-Produkt-Komplex EP in das Produkt P sowie das nun wieder freie Enzym E.

Nachdem, wie vorher beschrieben, die Messzelle des ITC mit der PDE enthaltenden Reaktionslösung gefüllt und die mit dem Testderivat geladene Injektionsspritze korrekt platziert war, konnten die gewünschten Versuchsparameter auf dem Bildschirm eingestellt werden. Mit dem Befehl „Start“ wurde der komplett computergesteuerte Versuch begonnen. Ihm folgten wenige Minuten, in denen die Heizelemente die Mess- und Referenzzelle auf die vorher gewählte Zieltemperatur erwärmten. War diese erreicht, begann automatisch die Injektionsspritze mit der angegebenen Drehzahl zu rotieren, wobei eine Basislinie auf dem als „reference power“ ausgewählten Sensitivitätsniveau äquilibriert wurde. Das Äquilibrieren dauerte, abhängig vom Ausmaß um das ITC ventilierender Luftströme, zwischen 15 und 30 Minuten. Nach dem Äquilibrieren startete die Aufzeichnung und Speicherung der gemessenen Leistung des Heizelements der Messzelle, wobei schon vor der Injektion des Derivats über eine Dauer von 60 Sekunden die stabile Basislinie gesichert wurde. Anschließend bewegte sich der Plastikkolben im Inneren der Injektionsspritze genau soweit nach unten, bis das vorher gewählte Volumen mit einer Flussrate von 0,5 $\mu\text{l}/\text{sec}$ in die Reaktionszelle entlassen wurde. Während des Injektionsvorganges konnte ein geringer Ausschlag der Heizleistung auf dem Bildschirm beobachtet werden. Dieses als Injektionspeak bezeichnete Phänomen spiegelt Energieumsätze in Folge von Unterschieden in pH-Wert, Ionisationsgrad oder Löslichkeit der beiden gemischten Lösungen wider und betrug im Verhältnis zur insgesamt freigesetzten Reaktionswärme stets vernachlässigbare Werte unter einem Prozent.

Die konstant rotierende Kanüle stellte eine gute Durchmischung der beiden Lösungen und somit einen ungehinderten Ablauf der Reaktion sicher.

Entsprechend der bei der Hydrolyse des injizierten Derivats freigesetzten Energie zeigte sich auf dem Bildschirm ein Ausschlag ins Negative, der nach kurzer Zeit ein Minimum erreichte. Dieses entsprach der unter der vorhandenen Substratkonzentration möglichen maximalen Umsatzrate der PDE. Mit zunehmendem Umsatz des Substrats in Produkt und somit abnehmender Substratkonzentration reduzierte sich auch die Anzahl der mit Substrat besetzten PDEs. Die Reaktionsgeschwindigkeit nahm demnach stetig ab und damit korrelierend auch die Menge der freigesetzten Reaktionswärme. Mit sinkender Substratkonzentration bewegte sich also die Kurve der Heizleistung in positiver Richtung bis sie schließlich nach kompletter Hydrolyse des injizierten Derivats wieder horizontal auf dem Niveau der anfangs äquilibrierten Basislinie verlief. Die aufgezeichnete Kurve eines Hydrolyseversuches hat daher folgende Form:

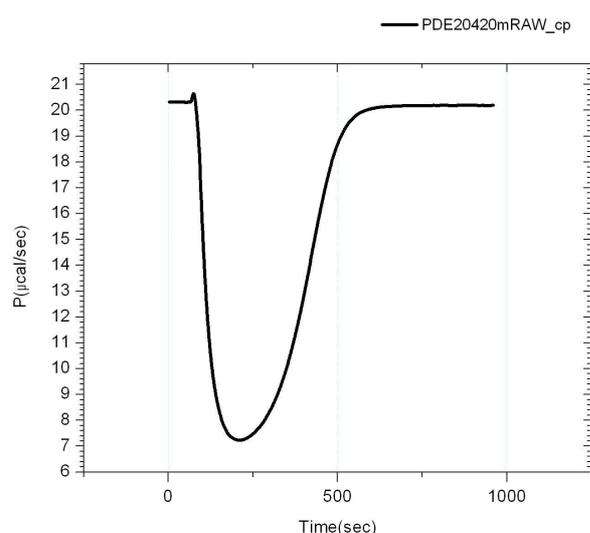


Abb. 8: Mikrokalorimetrische Untersuchung der Hydrolyse von cGMP durch PDE 2A:

Dargestellt ist der Verlauf der Leistung des Heizelements der Reaktionszelle nach Injektion von 10 µl einer Lösung von cGMP (30 mM).

Versuchsparameter: 3 µl PDE 2A in 40 mM MOPS, 0.8 mM EGTA, 15 mM Mg Acetate und 0.2 mg/ml BSA bei 30 °C und konstanter Drehrate von 310 pro Minute.

Die freie Enthalpie ΔH_{app} berechnet sich nun aus der im gesamten Versuch freigesetzten Energie Q (Fläche unter der Kurve) dividiert durch die molare Menge an Substrat, welche dem Produkt aus Substratkonzentration $[S]_{total}$ und Volumen V entspricht:

$$H_{app} = \frac{1}{[S]_{total} \cdot V} \cdot \int_0^{\infty} \frac{dQ(t)}{dt} \cdot dt \quad (\text{Todd et al., 2001})$$

Hierbei muss berücksichtigt werden, dass auch die Reaktionsbedingungen auf den Wert ΔH_{app} Einfluss nehmen können. So steigt ΔH_{app} , wenn bei der Reaktion Protonen freigesetzt werden und diese den Grad der Ionisation im Reaktionspuffer

verändern. Der mikrokalorimetrisch bestimmte Wert von -1.35×10^4 Kalorie pro Mol hydrolysiertem cAMP entspricht sehr gut dem in der Literatur bekannten Wert (Greengard et al., 1969).

Anhand der aufgezeichneten Heizleistung konnte nun direkt die bei der Reaktion freigesetzte Wärme im Zeitverlauf bestimmt und diese in die enzymatische Umsatzrate konvertiert werden:

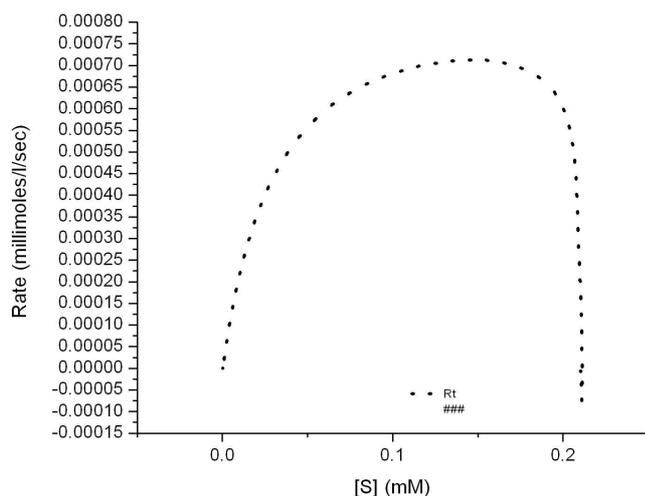


Abb. 9: Datenverarbeitung der Hydrolyse von cGMP durch PDE 2A:

Aus der gemessenen Leistungskurve des Heizelements wurde die enzymatische Umsatzrate bestimmt.

Versuchsparameter: 3 μ l PDE 2A in 40 mM MOPS, 0.8 mM EGTA, 15 mM Mg Acetate and 0.2 mg/ml BSA bei 30 °C und konstanter Drehrate von 310 pro Minute.

Mit dem Programm Origin wurden nun die den gemessenen Kurvenverlauf am genauesten beschreibenden kinetischen Konstanten k_m und V_{max} nach der Formel von Michaelis und Menten berechnet:

$$V_0 = \frac{k_{cat} \cdot [E]_{total} \cdot [S]}{k_m + [S]}$$

Durch Verrechnen der verwendeten Menge PDE $[E]_{total}$ ergibt sich:

$$V_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{k_m + [S]}$$

Nach Auswertung in Origin erhielt man also die freie Enthalpie ΔH pro Mol hydrolysiertem Substrat, die Bindungsaffinität k_m von Substrat zu Enzym sowie den zur maximalen Umsatzrate des Enzyms V_{max} proportionalen Wert k_{cat} . Mit diesem konnte unter Einbeziehung der Menge von im Versuch verwendeter PDE die tatsächliche maximale Umsatzrate V_{max} berechnet werden.

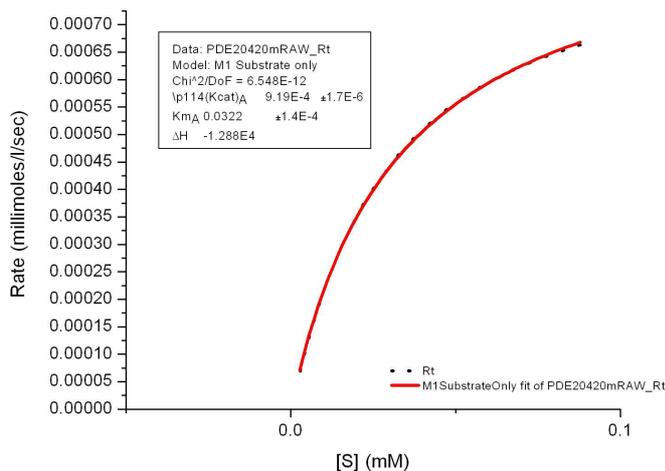


Abb. 10: Kinetik der Hydrolyse von cGMP durch PDE 2A:

Die genaueste nach Michaelis und Menten verlaufende Umsatzkurve (rot) stimmt sehr exakt mit den im Versuch bestimmten Werten (schwarz) überein. Ebenso liegt der k_m -Wert von 32,2 μM nah an dem in der Literatur angegebenen Wert (Martins et al., 1982).

Da im Konzentrationsbereich um den k_m -Wert die Kurve am sensitivsten verläuft, sollte die maximal in der Messzelle erreichte Substratkonzentration für eine ansprechende Messgenauigkeit nicht deutlich unter dem k_m -Wert selbst liegen.

3.4. Untersuchung des Inhibitionsverhaltens nicht hydrolysierbarer Derivate

Stabile Derivate, die von der untersuchten PDE nicht gespalten werden können, zeigten nach ihrer Injektion lediglich den Injektionspeak, aber keine Hydrolyse und daher eine sofortige Rückkehr der Kurve auf das Niveau der äquilibrierten Basislinie. In diesen Fällen wurde der Versuch für insgesamt 900 Sekunden durchgeführt und danach gestoppt. Anschließend wurde das Derivat in der Injektionsspritze gegen das präferierte Substrat des Enzyms, also gegen cAMP oder cGMP, ausgetauscht und eine zweite Injektion in die bereits PDE und das erste Derivat in bekannter Konzentration enthaltende Messzelle vorgenommen. Die erhaltenen Werte für $k_{m(\text{app})}$ und $k_{\text{cat}(\text{app})}$ in Anwesenheit einer zweiten Verbindung wurden mit den Daten der reinen Hydrolyse des Substrats verglichen. Bei signifikanten Abweichungen war es nun möglich, die beobachtete Inhibition je nach Resultat in einen kompetitiven oder einen linear-mixed Typ einzuteilen und darüber hinaus die Inhibitionskonstante k_i für das anfangs injizierte Derivat zu berechnen:

Kompetitive Inhibition:
$$k_{m_{\text{app}}} = k_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{k_i} \right) \quad \rightarrow \quad k_i = \frac{[I]}{\frac{k_m}{k_{m_{\text{app}}} - 1}}$$

Kompetitive Inhibitoren I binden am aktiven Zentrum der PDE, werden jedoch nicht in Produktmoleküle umgesetzt. Da sie mit Substratmolekülen um die Bindung am aktiven Zentrum mit der Inhibitionskonstanten k_i konkurrieren, erhöhen sie konzentrationsabhängig die Bindungskonstante k_m auf den Wert $k_{m(\text{app})}$, wohingegen die maximale Umsatzrate V_{max} unverändert bleibt.

Inhibition nach dem linear-mixed Typ:

Diese Art von Inhibition kombiniert einen kompetitiven Mechanismus mit einem hemmenden Effekt vermittelt über eine regulatorische Seite außerhalb des katalytischen Zentrums entsprechend der nicht kompetitiven Inhibition. Somit verursachen derartige Inhibitoren sowohl einen Anstieg des $k_{m(app)}$ als auch eine Reduktion der $V_{max(app)}$.

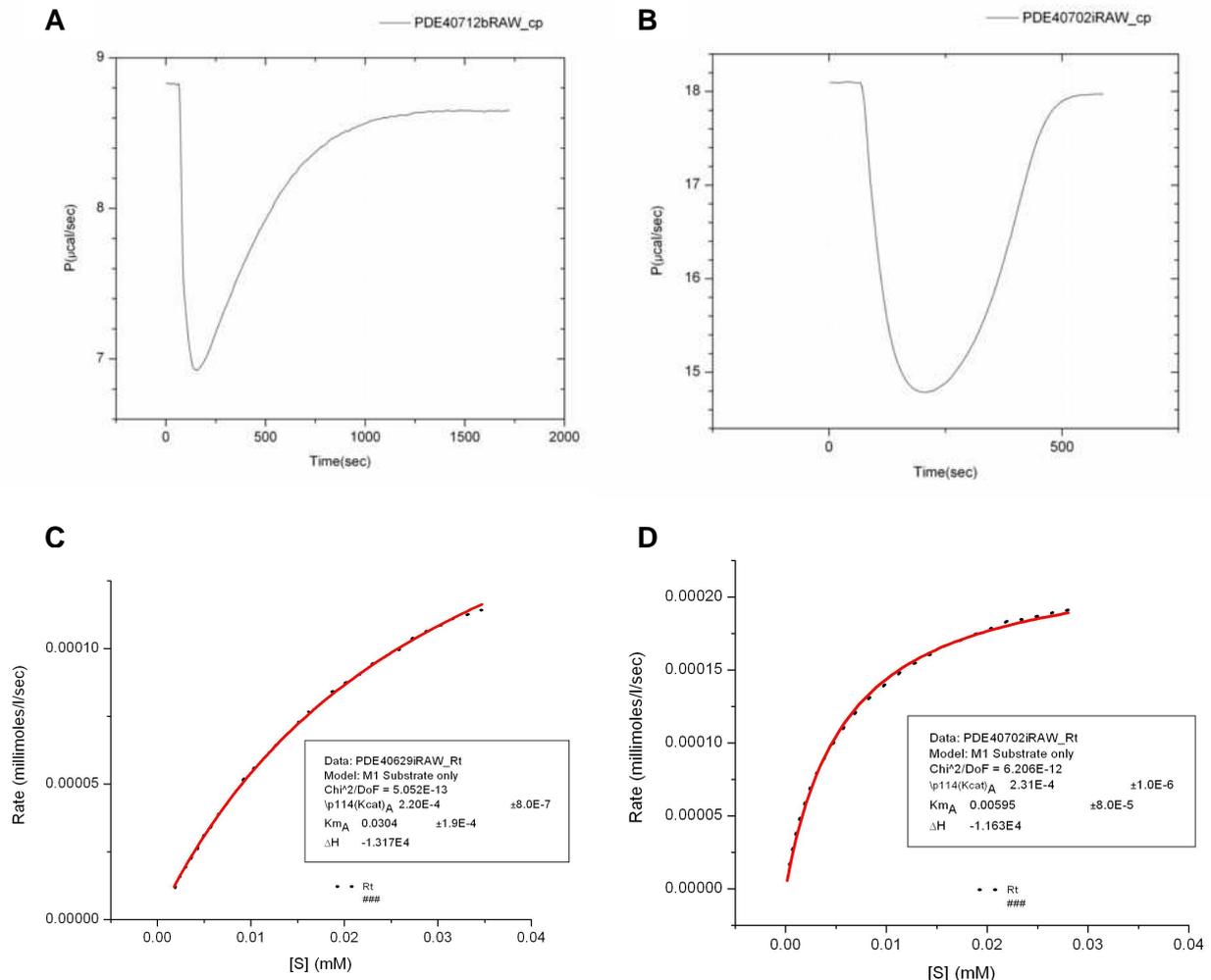


Abb. 11: Analyse des Inhibitionsverhaltens:

Dargestellt ist ein Vergleich der Hydrolyse von cAMP durch eine gleiche Menge an PDE 4D3 in Anwesenheit von 36 μ M Epac-Modulator 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (A) und ohne diesen (B). Neben einer geringeren maximalen Wärmeproduktion fällt die deutlich verlängerte Dauer für die komplette Hydrolyse von cAMP auf. In der Analyse der kinetischen Daten zeigt sich im Vergleich zum k_m -Wert der Hydrolyse von cAMP (D) eine erhöhte Bindungskonstante $k_{m(app)}$ in Anwesenheit von 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (C). Bei den Werten für V_{max} (k_{cat}) jedoch besteht kein signifikanter Unterschied. Daher handelt es sich hier um eine kompetitive Inhibition. Unter Zuhilfenahme der Werte $k_{m(app)}$ und k_m ist es nun möglich, die Inhibitionskonstante k_i zu berechnen.

Um zu belegen, dass es durch die zusätzliche Zeit der ersten Injektion zu keiner Aktivitätsminderung der PDE durch Denaturierung, Degradation oder Inaktivierung kam, wurden auch Versuche durchgeführt, bei denen 900 Sekunden nach der ersten

Injektion des präferierten Substrats eine zweite Injektion des präferierten Substrats unter gleichen Bedingungen wie zuvor gestartet wurde. Bei dieser zweiten Injektion zeigten sich im Vergleich zur ersten durchweg statistisch nicht signifikant veränderte Werte. Somit war nicht nur eine Minderung der Hydrolyseaktivität während des Versuchs ausgeschlossen, sondern zudem auch eine Produktinhibition durch 5'AMP und 5'GMP.

Der Nachweis, dass bei der Injektion des nicht hydrolysierten Derivats tatsächlich keine Reaktionswärme freigesetzt wird, erbrachten Vergleichsmessungen, bei denen man das Derivat in Reaktionspuffer ohne enthaltene PDE injizierte und die Heizleistung für die Reaktionszelle ebenfalls 900 Sekunden lang gemessen wurde. Die Integration der Flächen der Versuche mit und ohne PDE zeigte in der statistischen Analyse keinen signifikanten Unterschied.

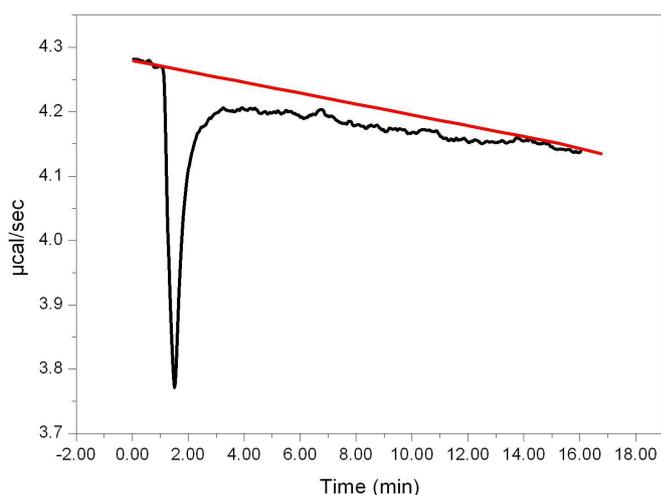


Abb. 12: Kurvenverlauf bei einem stabilen Derivat:

Nach Injektion von 5 µl einer 4.1 mM Lösung des Epac-modulators 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP in die PDE 4D3 enthaltende Reaktionszelle misst man die Heizleistung für 900 Sekunden. Bereits direkt nach Abklingen des Injektionspeaks befindet sich die Heizleistung wieder auf dem Niveau der äquilibrierten Basislinie.

Mit Hilfe der Software von Origin konnten die Flächen unter der Heizleistungskurve von Derivat-Versuch und Hintergrundmessung exakt bestimmt werden. Die Integration der Fläche unter der Kurve wurde dabei im Intervall von 300 bis 900 Sekunden durchgeführt, um die durch den Injektionspeak verursachte Fläche nicht mit einzubeziehen. Die in jeweils drei unabhängigen Experimenten erhaltenen Flächenmaße wurden herangezogen, um den Mittelwert zu berechnen. In der statistischen Datenanalyse konnte anschließend bestätigt werden, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den von den Heizkurven eingeschlossenen Flächen besteht.

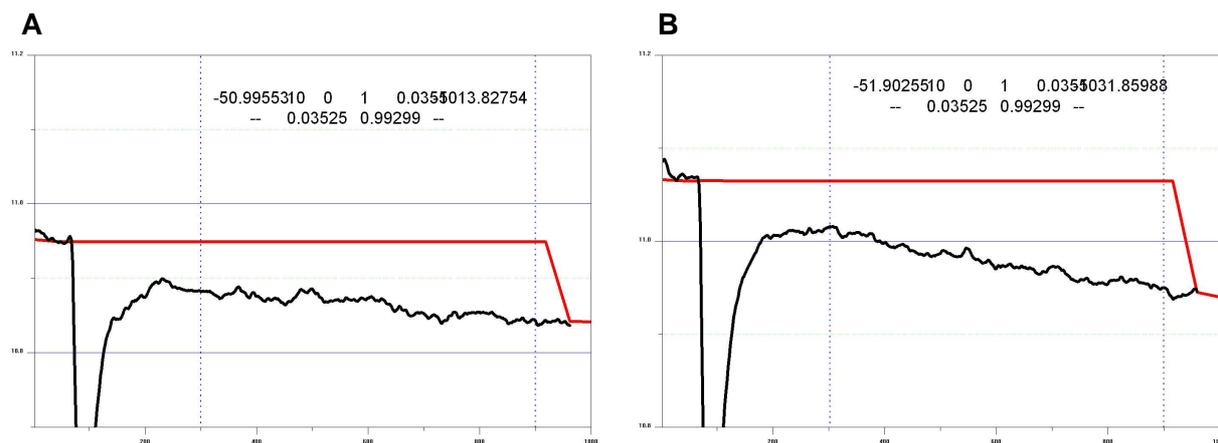


Abb. 13: Integration der Flächen von Derivat- und Hintergrundmessung:

Dargestellt sind die integrierten Flächen unter der Heizkurve von Derivat injiziert in die PDE 4D3 enthaltende Reaktionszelle (A) und in die nur Puffer enthaltende Reaktionszelle (B). Die Stabilität des Derivats zeichnet sich durch fehlende Freisetzung von Hydrolysewärme aus. Daher sind die Größenunterschiede der Flächen unter den Heizleistungskurven statistisch nicht signifikant.

4. Proteinbiochemische Methoden

4.1. Überexpression in Insektenzellen

Zur effizienten Expression der PDEs 1A, 1B, 1C und 10A wurden die entsprechenden Gensequenzen in GST-Fusionsvektoren kloniert, diese in *E. coli*-Zellen transformiert und hieraus schließlich gemäß der Anleitung des Herstellers rekombinante Baculoviruspartikel gewonnen. Die für die Transfektion verwendeten Viren hatten drei Amplifikationsrunden durchlaufen. Nachdem ein Liter der Insektenzellsuspension eine ausreichende Zelldichte von 3×10^6 Zellen pro ml erreicht hatte, wurden die Zellen für 5 Minuten abzentrifugiert und das überstehende Medium verworfen. Für die Expression der PDE GST-m10A gab man nun 20 ml der entsprechenden Baculoviruspartikel auf die Zellen. Bei den PDEs 1A, B und C wurden neben 15 ml der jeweiligen Viruspartikel auch 15 ml Viruspartikel für die Expression von 6x-His-Calmodulin auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde der Ansatz für eine Stunde bei Raumtemperatur belassen und danach die Zellen durch Mediumzugabe in eine Suspension der Zelldichte 1×10^6 / ml überführt. Nach weiteren drei Tagen Anzucht bei 26 °C unter Rotation auf dem Schüttelinkubator mit 110 rpm konnte mit der Reinigung der PDE begonnen werden.

4.2. Transformation in *E. coli*

Für die Expression der PDEs 6x-His-2A und 6x-His-5A wurden 3 µl der jeweiligen Plasmid-DNA auf 50 µl einer Lösung kompetenter BL21 DE3 Bakterien gegeben und der Ansatz für 30 Minuten auf Eis gelagert. Ebenso wurde bei der Transformation der PDE GST-5A in DH5α Bakterien verfahren. Anschließend erhielten die Bakterien für 45 Sekunden einen Hitzeschock bei 42 °C und wurden hierauf nochmals für 3 Minuten auf Eis gekühlt. Nun überführte man die Zellen in ein Eppendorfröhrchen und löste sie in 1 ml Low Salt LB Medium. Nachdem die Zellen auf mehrere Agarplatten verteilt waren, gab man die Ampicillinlösung hinzu und zog die Bakterien über Nacht bei 37 °C und 225 rpm auf dem Schüttelinkubator an. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie entnommen, in 5 ml LB Medium suspendiert und für eine weitere Nacht inkubiert. Diese 5 ml schließlich wurden am Folgetag in eine Flasche mit einem Liter LB Medium inklusive Ampicillinzusatz überführt und nochmals inkubiert. Sobald die Zellsuspension eine OD_{600} von 1 erreichte, kühlte man die Zellen auf 17 °C ab und entfernte durch Hinzufügen von IPTG in der Endkonzentration 0,2 mM

den Depressor der Expression. Nach einem weiteren Tag Inkubation konnte mit der Reinigung der PDE begonnen werden.

4.3. Reinigung überexprimierter Phosphodiesterase

Folgende Puffer wurden für die Reinigung verwendet:

Lysepuffer für GST-Fusionsproteine:

Tris pH 8.0	20 mM
NaCl	200 mM
DTT	5 mM

Lysepuffer für 6x-His-tagged-Proteine:

Tris pH 7.5	20 mM
NaCl	100 mM
β -Mercaptoethanol	3 mM

Proteaseinhibitoren:

PMSF	1 mM
Aprotinin	1 μ g/ml
Leupeptin	5 μ g/ml
Pepstatin	1 μ g/ml

Elutionspuffer:

Tris pH 8.0	50 mM
NaCl	200 mM
Glutathion	10 mM

Zu Beginn der Reinigung wurden die Insektenzellen durch Zentrifugation mit 2.500 G für fünf Minuten pelletiert, bei E.coli-Zellen wurde die Zentrifugation mit 5.000 G für 15 Minuten durchgeführt. Nach Verwerfen des Überstands wurden 30 ml des jeweiligen Lysepuffers mit darin enthaltenen Proteaseinhibitoren pro Liter Zellsuspension auf das Pellet gegeben und mehrmals resuspendiert. Mit mehreren Läufen durch den Microfluidizer wurden die Zellen ausreichend fragmentiert. Die größeren Zellwandtrümmer wurden durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 16.000 G pelletiert und verworfen. Für die bessere Aufreinigung von in Insektenzellen exprimierten PDEs folgte ein zweiter Zentrifugationsschritt des Überstands bei 100.000 G für 45 Minuten. Der pro Liter Zellsuspension erhaltene Milliliter Überstand konnte nun zur Gewinnung der GST-Fusionsproteine im Kühlraum bei 4 °C auf eine GST-Säule mit Glutathion Sepharose 4B geladen werden. Zur Isolierung von 6x-His-tagged-Proteinen wurde der Überstand auf eine Talon-Säule gegeben. Um unspezifisch gebundene Substanzen zu entfernen, ließ man im Vergleich zum Überstandsvolumen etwa die zehnfache Menge an Lysepuffer durch die Säule laufen.

Schließlich konnten mit der fünffachen Menge an Elutionspuffer die gereinigten PDE von der Säule getrennt und im Eluat gesichert werden. Nach Hinzufügen von 1 mg/ml BSA und 15 % Glycerol wurde das Enzymkonzentrat auf Eppendorfröhrchen verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

4.4. Reinigung von PDE 6 aus Retinagewebe von Hühneraugen (Beavo 2004)

Folgende Puffer wurden für die Gewinnung der PDE 6 verwendet:

Lysepuffer:

Tris	10,0 mM pH 7,5
MgCl ₂	1,0 mM
Dithiothreitol	1,0 mM
Phenylmethylsulfonyl-Fluorid	0,2 mM

Elutionspuffer 1:

Tris	10 mM pH 7,5
NaCl	20-300 mM
MgCl ₂	1 mM

Low-Salt-Puffer:

Tris	20 mM pH 7,5
NaCl	200 mM
Dithiothreitol	10 mM
EDTA	0,1 mM
Phenylmethylsulfonyl-Fluorid	1 mM

Elutionspuffer 2:

Tris	20 mM pH 7,5
NaCl	200 mM
Dithiothreitol	10 mM
EDTA	2 mM
Phenylmethylsulfonyl-Fluorid	1 mM
IBMX	2 mM
cGMP	1 mM

Konzentrierungspuffer:

Tris	10 mM pH 7,5
NaCl	150 mM
MgCl ₂	1 mM

4.4.1. Materialgewinnung und erster Reinigungsschritt der PDE 6

Bei etwa 50 von Tyson Co. erhaltenen Hühneraugäpfeln wurde das Retinagewebe vom Glaskörper getrennt und in hypotonem Lysepuffer durch einige Schläge eines motorbetriebenen Stößels aus Teflon homogenisiert. Durch Zentrifugation des Homogenats bei 100.000 G für 60 Minuten konnten die Gewebetrümmer pelletiert und verworfen werden. Der Überstand wurde auf eine 75 ml fassende DE2-Anionenaustauschsäule geladen. Bei 4 °C wurde das Protein durch einen linearen NaCl-Gradienten (20-300 mM NaCl, Elutionspuffer 1) bei einer Flussrate von 1 ml/min in insgesamt 80 Fraktionen von jeweils 5 ml eluiert. In jeder der 80 Fraktionen wurden die Aktivität im Phosphate-Release-Assay (siehe 4.5.) sowie der Gesamtproteingehalt im Bradford-Assay (siehe 4.6.) bestimmt. Die zwei Aktivitätsspitzen in den Fraktionen um Fraktion 30 und 42 spiegeln die Anwesenheit von PDE 6 aus retinalen Stäbchen (rod) beziehungsweise Zapfen (cone) wider.

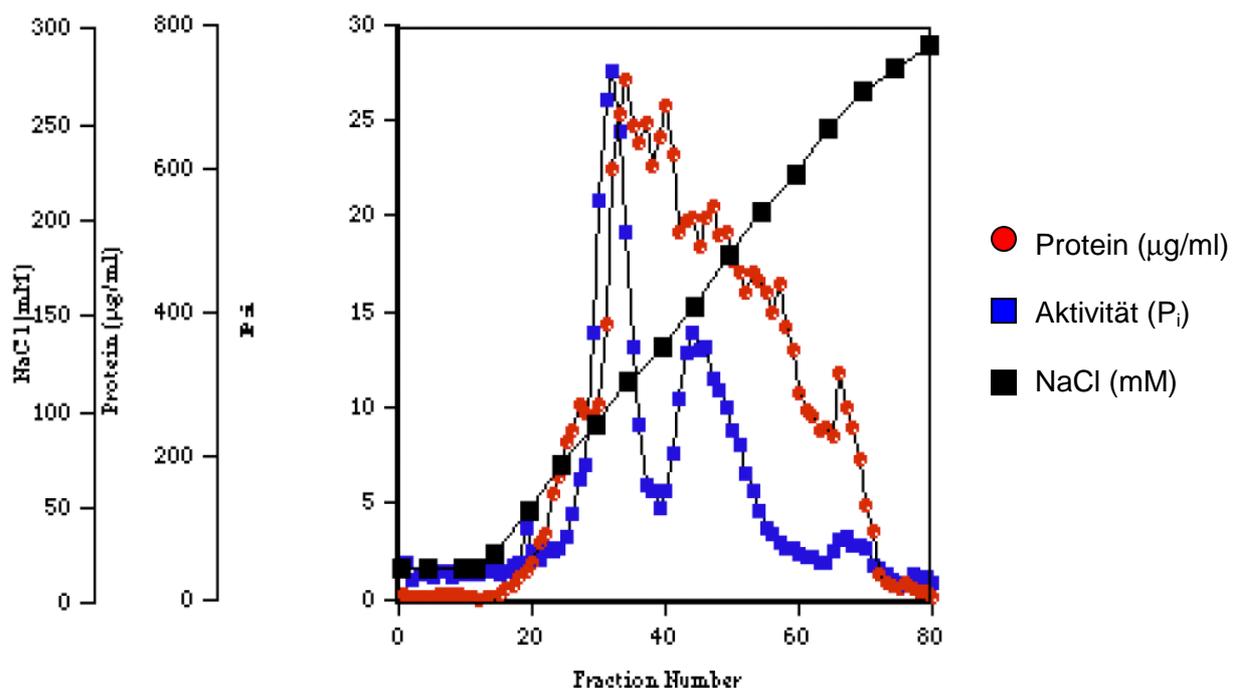


Abb. 14: Fraktionen der Reinigung von PDE 6:

Graphische Darstellung von Proteingehalt (rot), Aktivität der Hydrolyse von cGMP (blau) und elektrischer Leitfähigkeit (schwarz) in den 80 Fraktionen des Eluats aus gereinigter Hühnerretina:

Die zwei Gipfel der Hydrolyseaktivität entsprechen den Photorezeptor-Phosphodiesterasen PDE 6_{cone} und PDE 6_{rod}. Die NaCl-Konzentration wurde mit einem Konduktivitätsmeter in allen 80 Fraktionen bestimmt.

4.4.2. Reinigung von PDE 6 auf einer cGMP-Affinitätssäule

Die fünf Fraktionen mit der jeweils höchsten Aktivität von PDE 6_{cone} und PDE 6_{rod} wurden gepoolt und auf eine cGMP-Affinitätssäule aus Epoxy-Sepharose geladen. Nach zweimaligem Waschen mit Low-Salt-Puffer wurden anschließend die cGMP-bindenden Proteine mit dem cGMP enthaltenden Elutionspuffer 2 gewonnen.

4.4.3. Konzentrierung und Aufbewahrung der gereinigten PDE 6

Das erhaltene Eluat wurde mit Konzentrierungspuffer fünfmal für jeweils 30 Minuten bei 2.000 G in 50 kD-Filtern zentrifugiert und die zurückgehaltene Lösung gesichert. Parallel zur Konzentrierung der PDE 6 konnten hierbei auch niedermolekulare Substanzen sowie kleinere Proteine aus der PDE6-Lösung entfernt werden. Abschließend wurden die Lösungen von PDE 6_{cone} und PDE 6_{rod} durch Beifügen von 20 % Glycerol stabilisiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.5. Photometrischer Aktivitätsnachweis durch Phosphate-Release-Assay

Für eine qualitative und schnelle Bestimmung der Aktivität von PDEs hat sich der Phosphate-Release-Assay bewährt. Bei der Reinigung von PDE 6 wurde er für die Detektion der Fraktionen mit hoher Hydrolyseaktivität genutzt. Außerdem diente er zur Verlaufskontrolle der PDE-Aktivität während der Reinigungsschritte aller verwendeter PDEs.

Auf einer 96-Well-Platte wurden pro Well 10 µl der Probe in verschiedenen Verdünnungen pipettiert. In jedes Well pipettierte man anschließend zusätzlich 20 µl Puffer A (siehe 3.2.), 20 µl Puffer B (siehe 3.2.), 10 µl 5'-Nukleotidase und 30 µl dH₂O. Für die Versuche mit PDE 6 wurden zudem 10 µl Histon der Konzentration 25 µg/ml verwendet, dafür jedoch nur 20 µl dH₂O. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl Substrat in der Konzentration 10 mM, also abhängig von der untersuchten PDE durch Hinzupipettieren von cAMP oder cGMP. Die Platte wurde daraufhin sofort für 10 Minuten bei 30 °C inkubiert und anschließend die Reaktion mit 25 µl 10 % SDS in jedem Well gestoppt. Als Standard fungierten Lösungen anorganischen Phosphats in aufsteigender Konzentration. Abschließend wurden in jedes Well 125 µl einer Färbelösung pipettiert, die optische Dichte im Plattenleser gemessen und anhand der Standardkurve die Aktivität in den einzelnen Proben bestimmt.

Färbelösung:

0,56 g Ascorbinsäure gelöst in 24 ml Acid Molybdate

Acid Molybdate:

H ₂ SO ₄	17,42 ml
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ + 4H ₂ O	3,35 g
	ad 1 l dH ₂ O

4.6. Photometrische Gesamtproteinbestimmung nach Bradford (1976)

Für die Bestimmung des Gesamtproteins der PDE-Lösungen wurden auf einer 96-Well-Platte BSA-Standards von jeweils 10 µl pro Well in aufsteigenden Konzentrationen von 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 und 1,0 mg/ml pipettiert. Zudem wurden Wells mit 10 µl der Proteinlösung in unterschiedlicher Verdünnung beladen, wobei durch Doppelbestimmungen eine erhöhte Genauigkeit erzielt werden sollte. Nachdem jedem Well 200 µl Coomassie® Plus Protein Assay Reagent hinzugefügt wurden, konnte im Plattenleser die optische Dichte bei 595 nm gemessen und über die BSA-Standardkurve der Proteingehalt der Proben ermittelt werden.

4.7. Quantifizierung der Phosphodiesterase**4.7.1. Denaturierende Gelelektrophorese (Läemli 1970)**

Um die Konzentration an PDE nach Aufreinigung zu bestimmen, wurden verschiedene Volumina der PDE-Lösung auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Zudem liefen verschiedene Volumina einer bekannten Konzentration an BSA als Standard auf dem Gel. Die in der Größe von 8 x 9 cm gegossenen Minigele mit einer Dicke von 0,75 mm bestanden aus einem konstanten Trenngel (10%) sowie einem Sammelgel.

10 % Trenngel

Trenngelpuffer	1,5 ml
Acrylamidlösung	1,0 ml (30 g ad 100 ml dH ₂ O)
SDS 10 %	60 µl
dH ₂ O	3,45 ml
Temed	7,5 µl
APS 10 %	45 µl

Sammelgel

Sammelgelpuffer	3,75 ml
Acrylamidlösung	5,0 ml
SDS 10%	150 µl
dH ₂ O	6,0 ml
Temed	7,5 µl
APS 10 %	75 µl

Trenngelpuffer:

0,5 mM Tris pH 6.9

Sammelgelpuffer :

1,5 mM Tris pH 8.8

APS 10 % :

10 % Ammonium-Persulfat (w/v) in dH₂O

SDS 10 %:

10 % Natriumdodecyl-Sulfat (w/v) in dH₂O

Zur Abschätzung des für die Gelelektrophorese benötigten Volumens an PDE-Lösung wurde eine Gesamtproteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Zu der so bestimmten Menge an PDE-Lösung wurde dasselbe Volumen an 2x-treatment-Puffer hinzugegeben. Anschließend wurde das Protein durch Zusatz von 1 µl 14 M Mercaptoethanol und kurzes Aufkochen über fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Mit der Standardlösung von 0,05 µg/µl BSA wurde ebenso verfahren. Nach kurzer Zentrifugation bei 4.000 G über zwei Minuten wurden ansteigende Volumina der beiden Lösungen auf das Gel aufgetragen. Durch Anlegen der Spannung von 100 V bei 25 mA wurden die denaturierten Proteine im Sammelgel konzentriert, sodass die blaue Farbfront nach etwa 30 Minuten das Trenngel erreichte. Bei nun auf 150 V (konstante Leistung 4 W, Spannung anfangs 150 V und während des Versuchs steigend, Stromstärke anfangs 26 mA und mit der Zeit fallend) eingestellter Spannung wurden die Proteine im Trenngel entsprechend ihrer molekularen Größe für zwei Stunden aufgetrennt.

2x-treatment-Puffer:

Tris-Cl	0.125 M
EDTA	1 mM
SDS	4 %
Glycerol	20 % (v/v)
Pyronin Y	0,02 %

Der Puffer hatte einen pH-Wert von 6,8.

TANK-Puffer für die Elektrophorese:

Tris	0,025 M
Glycerin	0,192 M
SDS	0,1 %

Der Puffer hatte einen pH-Wert von 8,3.

4.7.2. Proteinfärbung mit Coomassie blau

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel zurechtgeschnitten und dreimal für jeweils 20 Minuten in 50 ml dH₂O auf dem Orbital Shaker gewaschen. Anschließend folgte die Proteinfärbung in 50 ml Coomassie blau für 20 Stunden. Zur Entfärbung unspezifischer Bindungen folgten drei weitere Waschschriffe von jeweils 20 Minuten in dH₂O.

Färbelösung:

Coomassie blue G-250	1 g
Ammoniumsulfat	170 g
Methanol	340 ml
O-Phosphorsäure	30 ml
	Ad 1 l dH ₂ O

4.7.3. Trocknen von Polyacrylamidgelen

Zur Präparation für die weiteren Quantifizierungsschritte wurde das Gel zwischen zwei feuchten Cellophanfolien auf einem Gelrockner für etwa zwei Stunden bei 60 °C getrocknet. Danach wurde es vorsichtig auf eine saubere Glasplatte gelegt und mit Frischhaltefolie luftdicht versiegelt.

4.7.4. Digitale Analyse getrockneter Polyacrylamidgele

Das getrocknete Gel wurde von einem Scanner eingelesen, im Programm Epson Twain zurechtgeschnitten und als TIFF-5.0-Datei gespeichert. Mit dem Programm Un-scan-it konnten die Proteinbanden auf dem Gel quantifiziert werden. Dabei wurde die Pixeldichte der Banden des BSA-Standards in rechteckigen Balken gleicher Größe gemessen, ebenso die Hintergrundpixeldichte in der unmittelbaren Umgebung der BSA-Banden. Gleichermaßen wurde mit den anhand des gefärbten Proteinstandards identifizierten PDE-Banden verfahren. Nach Subtraktion der Hintergrundpixelzahlen wurden die Nettopixelzahlen des BSA-Standards mit den dazugehörigen BSA-Konzentrationen im Programm Prism tabellarisch eingegeben. Die hieraus berechnete Standardkurve konnte nun im „non-linear regression curve fit“ graphisch dargestellt werden. Mit Hilfe dieser Standardkurve wurde für jede gescannte PDE-Bande eine Bestimmung der Proteinmasse vorgenommen. Unter Berücksichtigung der auf das Gel aufgetragenen Volumina konnten die PDE-Konzentrationen berechnet und aus allen erhaltenen Werten schließlich das arithmetische Mittel gebildet werden.

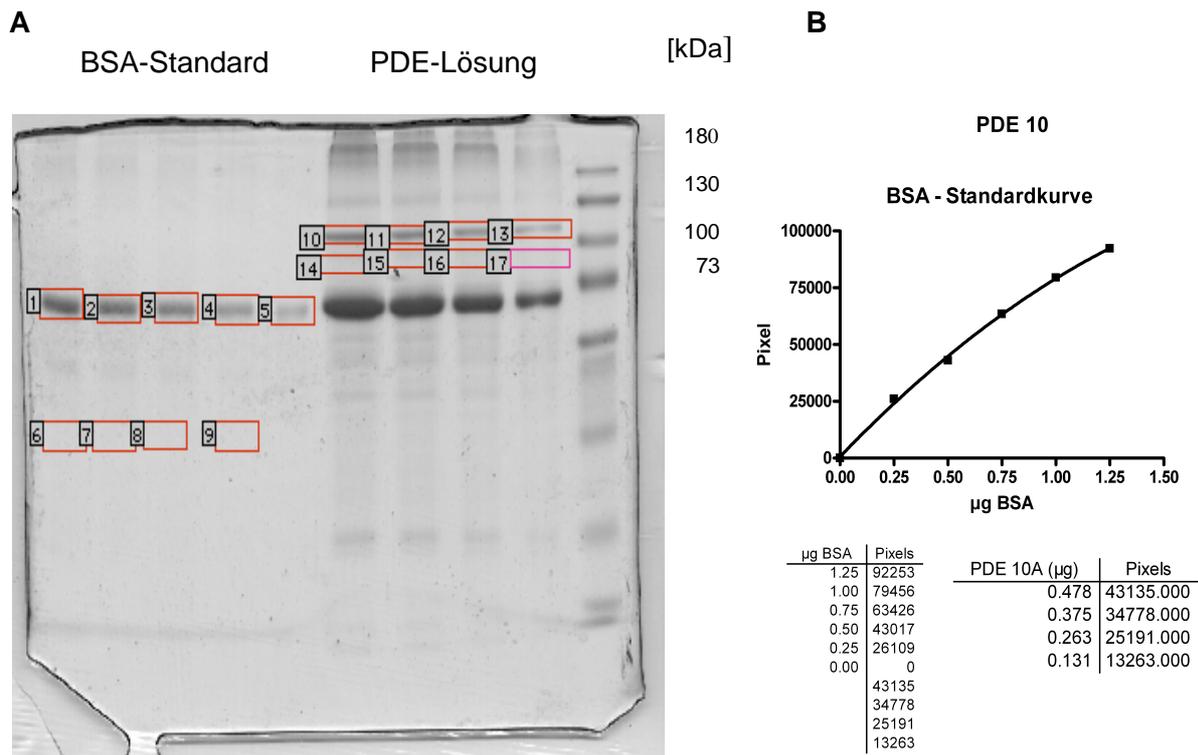


Abb. 15: Digitale Quantifizierung der Konzentration von PDE 10A:

Die gescannten BSA-Banden (Banden 1 bis 5 in A) lieferten eine Standardkurve (B), mit welcher die Masse der unter Zuhilfenahme des gefärbten Proteinstandards identifizierten PDE-Banden (Banden 10 bis 13 in A) bestimmt wurde. Durch Berücksichtigung der aufgetragenen Volumina konnte somit für jede PDE-Bande eine Konzentration bestimmt und anschließend der Mittelwert berechnet werden.

Die in einem ITC-Versuch verwendete Menge an PDE berechnet sich demnach folgendermaßen:

$$\text{Masse}(PDE) = \frac{\text{Konzentration}(PDE) \cdot \text{Volumen}(PDE) \cdot 1,42\text{ml}}{2,5\text{ml} + \text{Volumen}(PDE)}$$

Für die Bestimmung der Umsatzrate wurde die Masse eines PDE-Moleküls anhand der Aminosäuresequenz berechnet. Zudem musste berücksichtigt werden, dass die katalytisch aktiven PDEs als Dimere fungieren.

4.8. Radioaktiver Phosphodiesterase-Assay nach Beavo (1970)

Puffer A:

100 mM MOPS pH 7.5
4 mM EGTA
1.0 mg/ml BSA

Puffer B:

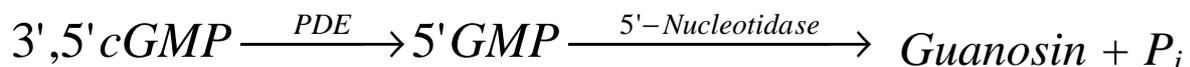
100 mM MOPS pH 7.5
75 mM Mg Acetate
100.000 cpm ³H-cGMP + nicht radioaktives cGMP in gewünschter Konzentration

Low-Salt-Puffer:

20 mM Tris pH 6.8

Um die mikrokalorimetrische Methode mit einer etablierten Methode der Aktivitätsbestimmung vergleichen zu können, wurde die Kinetik der cGMP-Hydrolyse durch PDE 5A mit dem radioaktiven Phosphodiesterase-Assay (Beavo et al., 1970) gemessen.

Folgender Reaktionsmechanismus liegt der Methode zu Grunde:



Zu 50 µl Puffer A wurden verschiedene Volumina an PDE-Lösung gegeben und anschließend die Proberöhrchen bis auf ein Volumen von 200 µl mit destilliertem Wasser gefüllt. Nach Starten der Reaktion durch Zugabe von 50 µl Puffer B wurden die Proberöhrchen für zehn Minuten in einem Wasserbad bei 30 °C inkubiert. Bei dieser Reaktionsdauer wurden stets weniger als 20 Prozent des vorhandenen Substrats hydrolysiert.

Für die Dauer von einer Minute wurde nun in kochendem Wasser die Reaktion gestoppt, anschließend ließ man die Proberöhrchen auf Raumtemperatur abkühlen. Nach Hinzupipettieren von 10 µl 5'-Nucleotidase (aus dem Gift von *Crotalus atrox*) der Konzentration 2,5 mg/ml wurde der Ansatz in einem Vortexgerät kurz geschüttelt und danach für weitere fünf Minuten bei 30 °C inkubiert.

Jeder Reaktionsansatz wurde nun mit 250 µl Low-Salt-Puffer verdünnt und auf eine 0,6 ml fassende DEAE Sephadex A-25 Ionenaustauschsäule geladen. Da diese spezifisch nur das nicht hydrolysierte cGMP bindet, konnte neben den übrigen

Bestandteilen auch das Reaktionsprodukt Guanosin in 2 ml Low-Salt-Puffer eluiert werden. Hierzu gab man 3 ml Szintillationsflüssigkeit und bestimmte die noch vorhandene Aktivität im Szintillationszähler. Mit den erhaltenen Werten konnte schließlich die spezifische Aktivität für jeden einzelnen Reaktionsansatz berechnet werden. Da sowohl die Menge an PDE als auch die Inkubationszeit sowie das Verhältnis von radioaktiv markiertem cGMP zu unmarkiertem cGMP variiert wurden, konnte mit den erhaltenen Daten die Aktivitätskurve kalkuliert und in Prism graphisch dargestellt werden.

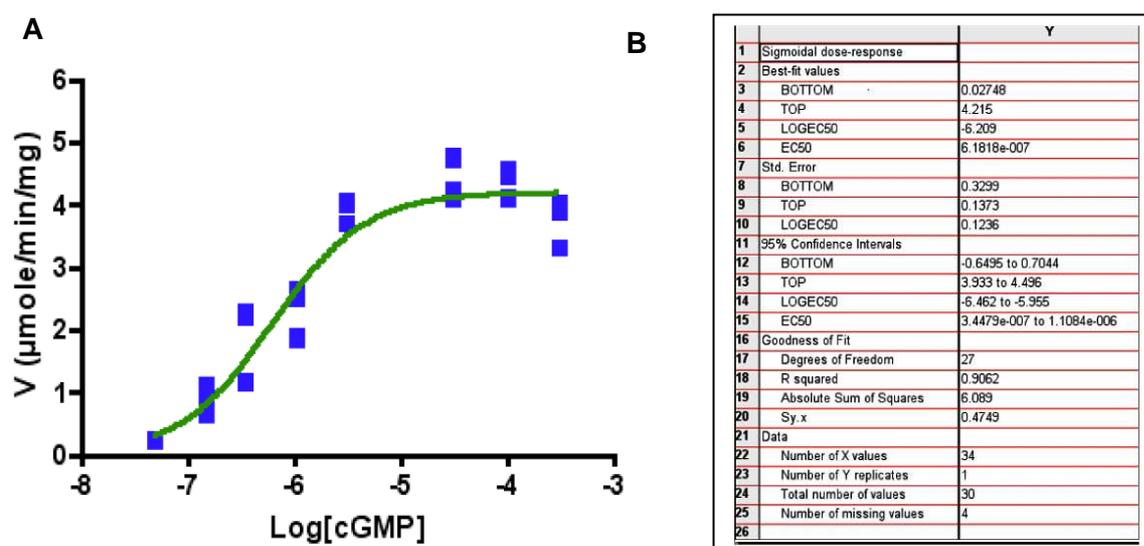


Abb. 16: Bestimmung der Hydrolyseaktivität von PDE 5A mit der radioaktiven Methode nach Beavo:

Der Verlauf der Umsatzrate V von PDE 5A in Abhängigkeit von der Konzentration an Substrat cGMP verläuft sigmoid (A). In der statistischen Auswertung (B) lässt sich die Affinitätskonstante k_m (LOGEC50) von $0,62 \mu\text{M}$ berechnen.

Der Vergleich der kinetischen Daten von radioaktiver Methode und Mikrokalorimetrie mit den Literaturwerten für die Hydrolyse von cGMP durch PDE 5A untermauern die Genauigkeit des VP-ITC:

Methode	k_m
Mikrokalorimetrie	$2,01 \mu\text{M}$
Radioaktiver Assay nach Beavo	$0,62 \mu\text{M}$
Literatur (Turko et al., 1998)	$2,00 \mu\text{M}$

4.9. Western Blot (Towbin et al., 1979) nach Stimulation von gereinigten Thrombozyten mit Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS

4.9.1. Gewinnung und Präparation von Thrombozyten

CCD-Puffer: pH 6,5

Na-Citrat	100 mM
Citronensäure	7 mM
Glucose	140 mM
EGTA	15 mM

Resuspensionspuffer: pH 7,4

NaCl	145 mM
KCl	5 mM
MgCl ₂	1 mM
Hepes	10 mM
Glucose	10 mM

Nachdem der CCD-Puffer Raumtemperatur erreicht hatte, wurden 10 ml hiervon in ein 50 ml Greinerröhrchen überführt. Anschließend punktierte man eine periphere Vene eines Probanden und füllte mit dem gewonnenen Vollblut das Greinerröhrchen. Durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 300 G und 18 °C erhielt man als Überstand etwa 25 ml plättchenreiches Plasma. Dieses wurde mit einer Einmalplastikpipette vorsichtig entnommen und in einem weiteren Greinerröhrchen für zehn Minuten bei Raumtemperatur belassen. In einer nun folgenden Zentrifugation für zehn Minuten bei 380 G und 18 °C pelletierten die Thrombozyten. Nach sofortigem Abgießen des Überstands (Plasma) löste man die Thrombozyten durch mehrmaliges Resuspendieren in 5 ml Resuspensionspuffer. In einer Probe von 10 µl wurde mit dem MicroDiff 18 Coulter® die Zellzahl bestimmt und gegebenenfalls die Thrombozytenlösung durch weitere Zugabe von Resuspensionspuffer auf eine Endkonzentration von etwa $3,0 \times 10^8$ Zellen / ml verdünnt.

4.9.2. Stimulation gereinigter Thrombozyten

Jeweils 2,5 ml der Thrombozytensuspension wurden in vier Teströhrchen überführt und diese in ein Wasserbad bei 37 °C gestellt. Die Stimulation im ersten Teströhrchen mit Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS in der Endkonzentration 100 µM wurde durch Hinzupipettieren von 25 µl einer Lösung von 10 mM durchgeführt. Um den Einfluss von Phosphatasen zu berücksichtigen, wurden dem zweiten Teströhrchen 10 nM des Phosphataseninhibitors Calyculin A beigefügt. Das dritte Teströhrchen enthielt sowohl 100 µM Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS als auch 10 nM

Calyculin A. Als Negativkontrolle diente das nicht weiter behandelte vierte Teströhrchen. Schließlich wurde in einem Eppendorfröhrchen eine Stimulation mit 100 μ M 8-pCPT-cGMP für 20 Minuten durchgeführt, um durch die maximale Aktivierung der PKG auch eine Positivkontrolle zu erhalten. Jeweils 80 μ l der vier Ansätze wurden nach 0, 1, 2, 5, 10 und 20 Minuten entnommen, sofort mit 40 μ l SDS-Lösung abgestoppt und anschließend für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt. Um auch die Bestimmung der Konzentrationen von cGMP durch einen Radioimmunassay vornehmen zu können, wurden parallel zu jeder Probeentnahme 300 μ l der Thrombozytensuspension mit 300 μ l TCA-Lösung (20%) verdünnt und vor der weiteren Bearbeitung für 40 Minuten auf Eis gelagert.

4.9.3. Gelelektrophorese und Transfer auf die Nitrocellulosemembran

Nachdem ein Polyacrylamidgel mit jeweils 20 μ l jeder Probe beladen war, wurden die Proteine, wie in 4.7.1. ausführlich beschrieben, elektrophoretisch separiert. Währenddessen konnte ein in Transferpuffer gelegtes Plastikgitter mit Kunststoffvlies, Blottingpapier und Nitrocellulose vorbereitet werden. Für den Transfer presste man nun das zurechtgeschnittene Gel luftblasenfrei auf die Nitrocellulose und setzte anschließend das fest zusammengeklappte Plastikgitter in die mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer. Im Kühlraum erfolgte der Transfer für 60 Minuten bei 2 A mit zum Positivpol gerichteter Nitrocellulosemembran.

Transferpuffer:

Tris	15,0 g
Glycin	72,0 g
Methanol	1 l

Ad 5 l dH₂O

Durch Zugabe von etwa 23 g NaOH-Plätzchen wurde der pH auf 10,0 eingestellt.

4.9.4. Anfärben von Proteinen auf der Nitrocellulosemembran

Zur Dokumentation der Transfereffizienz wurde die Nitrocellulose kurz mit Ponceau-S (0,1 % (w/v) in 5 % (v/v) Essigsäure) angefärbt und die unspezifische Pigmentbindung durch Schwenken in destilliertem Wasser entfernt. Nach Erstellen einer Fotokopie der dargestellten Proteinbanden wurde die Nitrocellulose mit TBS entfärbt.

10 x TBS:

Tris 24,2 g
NaCl 175,3 g
Ad 2 l dH₂O

4.9.5. Detektion spezifischer Proteine durch Antikörper

Nach dem Entfärben wurden die noch freien Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran durch Inkubation mit Blockmedium für eine Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Hierauf folgte die Inkubation der Membran mit dem in TBS/T/Milk verdünnten ersten Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nun wurde die Nitrocellulose durch dreimaliges Waschen mit TBS/T für jeweils fünf Minuten von unspezifisch gebundenem Antikörper befreit. Durch Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper verdünnt in TBS/T/Milk für eine Stunde bei Raumtemperatur wurde es ermöglicht, den gebundenen Erstantikörper über eine Chemilumineszenz-Reaktion zu detektieren. Hierfür musste die Membran abermals dreimal für jeweils 5 Minuten mit TBS gewaschen und anschließend für eine Minute mit ECL-Plus-Detektionsmix bedeckt werden. Nach Abtropfen der Detektionslösung wurde die Nitrocellulose in Folie gelegt und luftblasenfrei glattgestrichen. Schließlich konnten in der Dunkelkammer durch eine Membranexposition von einigen Sekunden bis wenigen Minuten ECL-Filme verschiedener Signalintensitäten entwickelt werden.

Blockmedium:

3 % (w/v) Milchpulver 1,5 g
ad 50,0 ml TBS

TBS/T:

Tween 3,0 ml
ad 1,0 l TBS

TBS/T/Milk:

3 % (w/v) Milchpulver 1,5 g
ad 50,0 ml TBS/T

5. Ergebnisse

5.1. Bestimmung kinetischer Daten von PDEs mittels Mikrokalorimetrie

5.1.1. Verwendung und Zweck der Analogsubstanzen von cAMP und cGMP

Die Cyclonucleotide cAMP und cGMP regulieren als Botenstoffe über die Aktivierung der intrazellulären Effektorproteine PKA, PKG, Epac und der Ionenkanäle CNG eine Vielzahl wichtiger Zellfunktionen. Um spezifisch die Funktionen nur eines bestimmten dieser Effektorproteine untersuchen zu können, wurden vom BIOLOG Life Science Institut aus Bremen chemisch leicht modifizierte Analogsubstanzen der Cyclonucleotide cAMP und cGMP synthetisiert. Diese sollen durch ihre hohe Selektivität den Signalweg des Effektorproteins von Interesse stimulieren, ohne dabei auf die Aktivität der anderen Cyclonucleotid-bindenden Proteine Einfluss zu nehmen. Von entscheidender Bedeutung hierbei ist neben der Selektivität für den Effektor auch die Frage nach der Stabilität des Analogons gegenüber der Hydrolyse durch PDEs. Um die Stabilität sowie mögliche inhibitorische Effekte der Derivate auf die Aktivität der PDEs 1A, 1B, 1C, 2A, 4D3, 5A, 6_{cone} sowie 10A zu testen, wurden die enzymkinetischen Daten in mikrokalorimetrischen Messungen bestimmt.

5.1.2. Versuchsprotokoll der mikrokalorimetrischen Experimente

Die vorher aufgereinigte PDE wurde in Reaktionspuffer gelöst und in die Messzelle des Mikrokalorimeters eingebracht. Nach Zugabe des Derivats durch eine motorgesteuerte Injektionsvorrichtung wurde die Änderung der zur Konstanthaltung der Temperatur in der Messzelle nötigen Heizleistung im zeitlichen Verlauf detektiert. Anhand der ermittelten Werte konnten mit dem Programm Origin die kinetischen Größen k_m und V_{max} nach der Formel von Michaelis und Menten berechnet werden. Bei hydrolysestabilen Analoga konnten keine signifikanten Temperaturänderungen gemessen werden. In einem zweiten Schritt war es hier jedoch möglich durch Injektion des physiologischen Substrats einen eventuell vorhandenen Einfluss des Analogons auf die Aktivität der PDE aufzudecken. In vielen Fällen zeigte sich ein kompetitiver Inhibitionsmechanismus hydrolysestabiler Derivate auf die jeweilige PDE. Einige Derivate waren in der Lage, die PDEs vornehmlich nach dem linear-mixed-Typ zu inhibieren. Dies deutet darauf hin, dass eine Bindungsstelle außerhalb des katalytischen Zentrums existiert, über welche der Aktivitätszustand der PDE reguliert werden kann.

Tabelle 1 listet die kinetischen Daten aller Analoga an den getesteten PDEs auf. Angegeben sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Einheiten: k_m [μM], V_{max} [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$], k_i [μM]

Derivate	PDE 1A k_m V_{max} k_i	PDE 1B k_m V_{max} k_i	PDE 1C k_m V_{max} k_i	PDE 2A k_m V_{max} k_i	PDE 4D3 k_m V_{max} k_i	PDE 5A k_m V_{max} k_i	PDE 6 _{cone} k_m V_{max} k_i	PDE 10A k_m V_{max} k_i
cAMP	93 41	33 13	3.2 15.6	241 332 allosterisch	5.25 62	200 20	823 641	0.24 0.67
8-Br-cAMP	32.8 3.6	63 5	18 9.9	38.7 6.0	54 2.9	23.2 6.2	68.8 101	4.8 0.8
Sp-5,6-DCI-cBIMPS	89.5	6.2	55.7	17.7	18.8	27.8	24.5	8.0 linear mixed
6-Bnz-cAMP	no effect	20	678	240	85 linear mixed	136	64.6	45.6 0.43
8-pCPT-2'-O-Me-cAMP	50.5	8.6	44.1	14.5	895	3.1 6.4	3.5	5.84 4.51
Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS	8.5	12.3	17.3	n.d.	1.3 linear mixed	1.5 linear mixed	3.2 linear mixed	3.8 linear mixed
Rp-8-Br-cAMPS	no effect	21	37.6	23.3	62 linear mixed	241	105	28
cGMP	8.2 20	3 6.5	4.6 13.7	29.4 161	24.5	2.0 6.9	10 412	1.09 1.56
8-Br-cGMP	47.1	4.5	62.8	91	55 linear mixed	143 linear mixed	33	23.7 0.5
8-pCPT-cGMP	73.7	8.6	47.1	40	53.3 2	27.6 0.47	41.3	6.04 3.63
8-Br-PET-cGMP	52.2 98	7.7	73.1 3.5	5.4 linear mixed	11.4 linear mixed	15.4 linear mixed	19.7 linear mixed	34
Rp-8-pCPT-cGMPS	no effect	11.8	32.6	49	137	50 linear mixed	26	38.6 linear mixed
Rp-8-Br-PET-cGMPS	no effect	11.3	55.5	3.3 linear mixed	8.1 linear mixed	13.4 linear mixed	19.2 linear mixed	6.2 linear mixed

5.1.3. Schwächen und Limitationen der mikrokalorimetrischen Methode

Trotz aller Vorteile der Mikrokalorimetrie existieren auch für diese Methode Schwächen und Limitationen. Zudem sollten Störfaktoren berücksichtigt und nach Möglichkeit ausgeschaltet werden.

Durch die hohe Sensitivität der Temperatursensoren wird die Messung der Reaktionswärme anfällig für Temperaturveränderungen an der Außenseite des ITC. So kann zum Beispiel durch kühle Luftströme die Messung beeinflusst und dadurch die Qualität der Rohdaten gemindert werden. Auch eine größere Variation der Lufttemperatur im Tagesverlauf wirkt sich negativ auf die Reproduzierbarkeit der Experimente und die Exaktheit der ermittelten Werte aus. Die Störanfälligkeit gewinnt dabei mit zunehmender Dauer eines mikrokalorimetrischen Versuchs an Bedeutung. Insbesondere enzymatische Reaktionen, die mit hohem k_m -Wert und gleichzeitig niedriger V_{max} ablaufen, können durch die Außenbedingungen signifikant verändert werden. Hier werden nämlich sehr hohe Konzentrationen an Substrat erforderlich, um einen ausreichenden Betrag an Wärme pro Zeiteinheit zu produzieren. Da jedoch für die Berechnung der Umsatzrate die Reaktion komplett ablaufen muss und bei abnehmender Substratkonzentration auch die Reaktionsgeschwindigkeit kontinuierlich sinkt, wird zwangsläufig über einen längeren Zeitraum nur geringe und somit störanfällige Wärmeproduktion gemessen. Dem Problem nicht ausreichender Wärmeproduktion bei langsamen Reaktionen kann durch die Verwendung höherer Enzymkonzentrationen begegnet werden. Hier stellt sich letztlich die Frage nach der Verfügbarkeit größerer Mengen an aktiver PDE.

Ein weiteres Problem stellen auftretende Wechselwirkungen der Reaktionslösung in der Messzelle mit der injizierten Substratlösung dar. Durch Unterschiede in pH-Wert, Temperatur, Lipophilie und Ionisierungsgrad kann Wärme freigesetzt oder absorbiert werden. Dieses Artefakt zu Beginn des Experiments wird nicht automatisch vom Analyseprogramm Origin subtrahiert und fließt somit fälschlicherweise in die Berechnung der Umsatzrate ein. Durch optimale Anpassung der pH-Werte und Temperaturen kann dieser Fehler minimiert werden.

Ebenfalls sollte berücksichtigt werden, dass bei der Reaktion entstehende Produkte mit dem Puffer energetisch wechselwirken können. So absorbieren zum Beispiel freigesetzte Protonen Energie und führen dadurch zu einer scheinbaren Reduktion der freien Enthalpie ΔH_{app} pro Mol hydrolysiertem Substrat.

Schließlich können Verunreinigungen der Messzelle aus Vorversuchen ungewollte Effekte auf spätere Experimente entwickeln. Durch versehentlich noch an der Wand der Messzelle haftende Substanzen besteht einerseits die Möglichkeit von Interaktionen mit der eigentlichen Reaktionslösung. Zum anderen leidet die Sensitivität der Temperatursonden durch die isolierende Wirkung eines viskosen Films auf der Innenschicht der Reaktionszelle. Daher ist besonders bei Gebrauch lipophiler Substanzen eine gründliche Reinigung der Zelle durch mehrmaliges Spülen durchzuführen.

5.1.4. Vorteile der Mikrokalorimetrie gegenüber dem radioaktiven Standardversuch nach Beavo

Die Bestimmung enzymkinetischer Größen mittels Mikrokalorimetrie ist eine einfache, schnelle und zuverlässige Methode zur Messung der Hydrolyseaktivität von PDEs und besitzt im Vergleich zur Standardmethode nach Beavo wichtige Vorteile.

An erster Stelle ist hier sicherlich die Exaktheit der Methode zu nennen. Das ITC ist in der Lage, durch eine chemische Reaktion hervorgerufene Temperaturunterschiede in der Größenordnung von wenigen Mikrokalorien zu messen und mit diesen Daten enzymatische Umsatzraten zu berechnen. Während nach Beavo nur etwa zwanzig Prozent des initial vorhandenen Substrats hydrolysiert werden und aus diesem eingeschränkten Set an Werten die Umsatzkurve extrapoliert werden muss, erhält man in einem mikrokalorimetrischen Experiment eine kontinuierliche Messung der kompletten Hydrolyse des Substrats. Anhand dieser mikrokalorimetrisch erhaltenen Rohdaten lassen sich Umsatzkurven graphisch erstellen, die zu über 99 % identisch mit einer nach Michaelis und Menten theoretisch errechneten Umsatzkurve sind. Zudem zeigten die experimentell erhobenen Werte für k_m und V_{max} eine hohe Reproduzierbarkeit mit Standardabweichungen, die in den meisten Fällen unter 10 % lagen. Radioaktiv ermittelte kinetische Größen dagegen zeigen in der Regel Standardabweichungen von 25 % und mehr.

Ebenfalls ein wichtiger positiver Aspekt ist die Tatsache, dass die Substrate nicht radioaktiv markiert werden müssen und somit der gesamte Ablauf des Experiments ohne wesentliche Gesundheitsrisiken durchgeführt werden kann. Hierin liegt auch ein finanziell relevanter Vorteil, denn der chemische Einbau von Tritium in die verschiedenen Cyclonukleotide ist ein kostspieliger Prozess.

Der Zeitaufwand von etwa 120 Minuten für ein komplettes Hydrolyseexperiment mit dem ITC liegt deutlich unter dem des radioaktiven Versuchs und ermöglicht somit eine äußerst effektive Erhebung kinetischer Daten.

Eine weitere Stärke der Methode ergibt sich aus dem Umstand, dass die untersuchten Enzyme während des Versuchs von keiner wesentlichen Denaturierung betroffen sind. Somit lassen sich mehrere Experimente hintereinander durchführen und Fragen wie etwa nach auftretender Substratinhibition oder nach der Stabilität der PDEs im zeitlichen Verlauf beantworten. Außerdem zeigen die Experimente, dass hierdurch ein möglicher inhibitorischer Einfluss nicht hydrolysierbarer Derivate auf die PDE qualitativ und quantitativ ermittelt werden kann.

5.2. Hydrolysestabilität und Inhibitionsverhalten Epac-relevanter Analoga

5.2.1. Vorkommen und Funktionen von Epac

Epac ist ein Guaninnukleotidaustauschfaktor für kleine G-Proteine, die als intrazelluläre Multiplikatoren der Signaltransduktion von Rezeptoren mit 7-transmembran-Domänen fungieren. Das kleine G-Protein Rap als Vertreter dieser umfangreichen Familie liegt in inaktivem Zustand in GDP-gebundener Form vor. Durch cAMP stimuliert, fördert Epac den Austausch von GDP gegen GTP und versetzt Rap so in den GTP-gebundenen aktiven Zustand. In diesem reguliert Rap unter anderem die Intergrin-vermittelte Zelladhäsion sowie die Formation von Zell-Zell-Kontakten durch Cadherine (Bos et al., 2003).

Kürzlich wurde eine wichtige Rolle von Epac 2 bei der Regulation der Exozytose gezeigt, welche insbesondere für die Sekretion von Insulin aus pankreatischen β -Zellen essentiell ist. Diese Funktion von Epac 2 ist interessanter Weise eindeutig nicht über das kleine G-Protein Rap vermittelt.

5.2.2. Ergebnisse der Experimente mit den Epac-Modulatoren 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP und Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS

8-pCPT-2'-O-Me-cAMP wurde entwickelt als spezifischer Modulator von Epac ohne signifikante Effekte auf die Isoformen der PKA. Eine Diskriminierung zwischen Epac und PKA wird insbesondere durch die Methylierung der Hydroxylgruppe an der 2'-Ribose erreicht. Diese freie Hydroxylgruppe nämlich ist essentiell für die Bindung von cAMP an PKA und somit für deren Aktivierung (Enserink et al., 2002). Die Einführung einer pCPT-Gruppe an der 8-Position erhöht die Affinität des Derivats zum

Rezeptorprotein sowie die Membranpermeabilität (Rehmann et al., 2003). Zudem erhoffte man sich hierdurch eine erhöhte Resistenz gegenüber der Hydrolyse durch PDEs, wie sie bei anderen 8-substituierten Cyclonukleotiden gezeigt werden konnte (Butt et al., 1992).

Im Gegensatz zu dieser Annahme wurde in den mikrokalorimetrischen Experimenten eine effektive Hydrolyse von 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP durch die PDEs 5A und 10A gemessen. Die enzymkinetischen Konstanten k_m und V_{max} aus Tabelle 1 sind dabei im Falle der PDE 5A in ihrer Größenordnung vergleichbar mit denen der Hydrolyse des physiologischen Substrats cGMP. Für die PDE 10A konnten sogar V_{max} -Werte gemessen werden, die deutlich über denen der Hydrolyse von cAMP und cGMP liegen - bei nur geringfügig verminderter Affinität im Vergleich zur Bindung von cGMP. Zudem wirkte 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP als potenter kompetitiver Inhibitor der PDEs 2A und δ_{cone} mit Inhibitionskonstanten k_i ähnlich den k_m -Werten für die Hydrolyse von cAMP oder cGMP.

Die ermittelten Daten aus den Experimenten mit 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP machten weitere chemische Modifikationen notwendig, um eine verbesserte Stabilität gegenüber der Hydrolyse durch PDEs zu erreichen. Da aus anderen Versuchen die stabilisierende Wirkung der Sp-Modifikation an 8-substituierten Derivaten bekannt war, synthetisierte BIOLOG das Derivat Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS. Tatsächlich erwies sich dieses als stabil gegenüber den PDEs 5A und 10A sowie alle übrigen getesteten PDEs. Allerdings verursacht es eine beträchtliche Inhibition aller PDEs mit k_i -Werten im niedrigen mikromolaren Bereich.

5.3. Hydrolysestabilität und Inhibitionsverhalten PKA-relevanter Analoga

5.3.1. Struktur und Funktionen von PKA

Die PKA ist ein heterotetramerer Enzymkomplex bestehend aus zwei katalytischen und zwei regulatorischen Untereinheiten. Jede regulatorische Einheit besitzt eine Bindungsstelle für das Cyclonukleotid cAMP und hält die PKA in Abwesenheit des Liganden im autoinhibierten Zustand. Haben beide regulatorische Untereinheiten cAMP gebunden, so dissoziieren die katalytischen Untereinheiten und sind nun in der Lage, eine Vielzahl von Zielproteinen zu phosphorylieren.

5.3.2. Ergebnisse der Experimente mit den PKA-Aktivatoren 8-Br-cAMP, 6-Bnz-cAMP und Sp-5,6-DCI-cBIMPS

Das Derivat 8-Br-cAMP wird als selektiver Aktivator der PKA angesehen und häufig verwendet, um in Experimenten Stoffwechselwege der PKA zu stimulieren. Wie Tabelle 1 zeigt waren alle getesteten PDEs in der Lage, dieses Analogon mit k_m -Werten im niedrigen mikromolaren Bereich zu hydrolysieren. Auch die als cGMP-selektiv geltende PDE 5A spaltete 8-Br-cAMP effektiv mit einer V_{max} , die in derselben Größenordnung wie die V_{max} für die Hydrolyse des physiologischen Substrats cGMP liegt.

Als stabiles Derivat mit nur sehr geringer inhibitorischer Wirkung auf die analysierten PDEs erwies sich 6-Bnz-cAMP. Lediglich durch PDE 10A konnte eine schwache Hydrolyse gezeigt werden. Jedoch liegt die Affinität für das physiologische Substrat cAMP einhundertfach über der für 6-Bnz-cAMP bei ähnlichen V_{max} -Werten.

Das Analogon Sp-5,6-DCI-cBIMPS besitzt eine hohe Membranpermeabilität und gilt als potenter Aktivator der PKA. Wegen der Sp-Modifikation wurde zudem eine gute Stabilität gegenüber der Hydrolyse durch PDEs angenommen. Tatsächlich konnte in den mikrokalorimetrischen Versuchen keine der getesteten PDEs das Derivat spalten. Allerdings verursacht Sp-5,6-DCI-cBIMPS eine beachtliche Inhibition der PDEs 1B, 2A, 4D3 und 6_{cone} mit k_i -Werten, die in ihrer Größenordnung den k_m -Werten für die Hydrolyse des physiologischen Substrats entsprechen.

5.3.3. Ergebnisse der Experimente mit dem PKA-Inhibitor Rp-8-Br-cAMPS

Schon seit langem ist die inhibitorische Wirkung Rp-modifizierter Analogsubstanzen von cAMP auf die Familie der PKA bekannt (Dostmann et al., 1991). Für das Derivat Rp-8-Br-cAMPS wurde eine effektive Hemmung der PKA in biologischen Systemen wie Fibroblasten, Hepatozyten und Thrombozyten beschrieben (Schwede et al., 2000).

Die durchgeführten mikrokalorimetrischen Experimente zeigten eine hohe Stabilität dieses Analogons gegenüber der Hydrolyse durch alle getesteten PDEs. In höheren Konzentrationen ist es auch in der Lage, inhibierend auf PDEs zu wirken. Die Inhibitionskonstanten k_i aus Tabelle 1 jedoch liegen in allen Fällen deutlich über den Affinitätskonstanten k_m für die Hydrolyse des bevorzugten Substrats der jeweiligen PDE.

5.4. Hydrolysestabilität und Inhibitionsverhalten PKG-relevanter Analoga

5.4.1. Struktur und Funktionen von PKG

Vom Botenstoff Stickstoffmonoxid stimuliert, produziert die intrazelluläre Guanylylcyclase den „second messenger“ cGMP. Dieses Cyclonukleotid kann durch Bindung an die regulatorischen Domänen der PKG diese in den aktiven Zustand versetzen. In glatten Muskelzellen der Gefäßwand zum Beispiel senkt daraufhin die PKG über verschiedene Mechanismen den intrazellulären Calciumspiegel und wirkt somit vasodilatatorisch.

Die PKG besitzt mit zwei Cyclonukleotid-bindenden Domänen sowie einem katalytischen Zentrum eine sehr ähnliche strukturelle Organisation wie die PKA. Allerdings befinden sich hier beide regulatorischen Bindestellen für cGMP sowie das aktive Zentrum des Enzyms in einer einzigen Aminosäurekette.

In Säugern wurden bisher zwei Gene identifiziert, die für eine PKG kodieren. Die Genprodukte hiervon werden PKG Typ I und PKG Typ II genannt, wobei von ersterer zwei unterschiedliche Splicevarianten existieren und als PKG I α und PKG I β bezeichnet werden (Lohmann et al., 2005; Hofmann et al., 2005).

5.4.2. Ergebnisse der Experimente mit den PKG-Aktivatoren 8-Br-cGMP, 8-Br-PET-cGMP und 8-pCPT-cGMP

Das Derivat 8-Br-cGMP war eine der ersten synthetischen Analogsubstanzen von cGMP auf dem Markt und wird bis heute gerne verwendet, um selektiv den Signalweg über die PKG zu stimulieren. Die 8-Substitution des Bromatoms soll dabei sowohl die Affinität für das Rezeptorprotein steigern als auch eine erhöhte Resistenz gegenüber den degradierenden PDEs bewirken. Wie in Tabelle 1 dargestellt erwies sich 8-Br-cGMP in den mikrokalorimetrischen Versuchen als stabil gegenüber der Hydrolyse durch alle untersuchten PDEs mit Ausnahme der PDE 10A. Die hier erfasste Spaltungsreaktion verläuft allerdings erst bei Konzentrationen effektiv, die mehr als eine Größenordnung über den k_m -Werten der physiologischen Substrate liegen, und dabei auch nur mit geringerer V_{max} . Alle getesteten PDEs, die 8-Br-cGMP nicht hydrolysieren konnten, wurden von diesem Derivat inhibiert mit k_i -Werten im höheren zweistelligen mikromolaren Bereich. Besonders bei der retinalen PDE 6_{cone} liegt der k_i -Wert dabei nur geringfügig über dem k_m -Wert der Hydrolyse des präferierten Substrats cGMP.

Als Weiterentwicklung mit stark erhöhter Lipophilie wurde das Derivat 8-Br-PET-cGMP synthetisiert. Die PET-Modellierung erhöht dabei die Selektivität des Nukleotids und reduziert den aktivierenden Effekt auf die Familie der PKA. In den mikrokalorimetrischen Experimenten zeigte sich eine Resistenz des Analogons gegen die enzymatische Spaltung durch die PDEs 2A, 4D3, 5A, 6_{cone} und 10A. Allerdings besitzt 8-Br-PET-cGMP eine beachtliche inhibitorische Wirkung auf alle genannten PDEs mit k_i -Werten im niedrigen mikromolaren Bereich. Zudem akzeptieren die PDEs 1B und 1C 8-Br-PET-cGMP als Substrat mit einer V_{max} , die ungefähr der V_{max} für die Hydrolyse der bevorzugten Substrate cGMP und cAMP entspricht. Die Affinität für das Derivat ist hierbei jedoch mit k_m -Werten um 100 μM äußerst niedrig. Im Gegensatz zu den Isoformen 1B und 1C zeigt die PDE 1A keine Hydrolyse von 8-Br-PET-cGMP. Zwar besitzt 8-Br-PET-cGMP einen hemmenden Effekt auf die PDE 1A, dieser ist mit einem K_i -Wert um 50 μM aber weniger ausgeprägt als jener auf die übrigen getesteten PDEs.

Das photosensitive Analogon 8-pCPT-cGMP ist ein hochpotenter Aktivator der PKG. Durch die 8-pCPT-Modellierung erhöht sich besonders die Affinität für die PKG Typ II, zudem wird wegen der steigenden Lipophilie die Passage der Zellmembran erleichtert. Ähnlich wie bei dem Derivat 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP konnte auch für 8-pCPT-cGMP der erhoffte Effekt einer erhöhten Stabilität gegenüber der Hydrolyse durch PDEs nicht verifiziert werden. Wie das Derivat 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP so wird auch 8-pCPT-cGMP von den PDEs 5A und 10A effektiv gespalten. Wegen der im Vergleich zum physiologischen Substrat deutlich erhöhten V_{max} bei einem k_m im niedrigen mikromolaren Bereich ist dabei die Hydrolyse durch PDE 10A in besonderem Maß von Relevanz. Auch die cAMP bevorzugende PDE 4D3 konnte in den mikrokalorimetrischen Versuchen 8-pCPT-cGMP degradieren. Allerdings liegen Affinität und V_{max} mehr als eine Größenordnung unter den kinetischen Konstanten für die Hydrolyse von cAMP. Alle untersuchten PDEs, die nicht zur Hydrolyse von 8-pCPT-cGMP in der Lage sind, werden durch dieses Derivat inhibiert. Die k_i -Werte in Tabelle 1 liegen dabei jeweils um 50 μM und somit in allen Fällen deutlich über den Affinitätskonstanten der physiologischen Substrate cAMP oder cGMP.

5.4.3. Ergebnisse der Experimente mit den PKG-Inhibitoren Rp-8-pCPT-cGMPS und Rp-8-Br-PET-cGMPS

Auch für die Inhibition der PKG haben sich Rp-modifizierte Nukleotidanaloga als äußerst wirkungsvoll erwiesen. Das photosensitive Derivat Rp-8-pCPT-cGMPS hemmt alle drei Formen der PKG mit ähnlicher Effektivität. In den mikrokalorimetrischen Experimenten wurde es von keiner der getesteten PDEs als Substrat akzeptiert, entfaltete jedoch auf alle eine gewisse inhibitorische Wirkung. Besonders die k_i -Werte für die Hemmung der PDEs 2A und 6_{cone} liegen hierbei in der Größenordnung der Affinitätskonstante des physiologischen Substrats cGMP.

Der Inhibitor Rp-8-Br-PET-cGMPS vermag wegen seiner sehr hohen Affinität für die PKG I zwischen den beiden Familien der PKG zu diskriminieren. Er wurde sowohl in Arterien von Ratten als auch in menschlichen Thrombozyten (Butt et al., 1995) und Mukosazellen (Vaandrager et al., 1997) erfolgreich zur selektiven Ausschaltung PKG-vermittelter Effekte eingesetzt. Rp-8-Br-PET-cGMPS zeigte nicht nur eine generelle Stabilität gegenüber der Spaltung durch alle untersuchten PDEs, sondern verursachte zudem eine effektive Inhibition dieser Enzyme. Besonders die PDEs 2A, 4D3, 5A, 6_{cone} und 10A werden von Rp-8-Br-PET-cGMPS schon bei Konzentrationen im niedrigen mikromolaren Bereich massiv in ihrer Hydrolyseaktivität reduziert.

5.5. Ergebnisse der Thrombozytenstimulation mit Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS

Um die Relevanz der mikrokalorimetrisch ermittelten Daten in Zellen zu untersuchen, wurden gereinigte Thrombozyten mit 100 μM des potenten PDE-Inhibitors Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS stimuliert und durch einen Western Blot die PKG-spezifische Phosphorylierung von VASP an Ser-239 im zeitlichen Verlauf beobachtet. Der Einfluss von Phosphatasen auf die Konzentration von Phospho-S239-VASP wurde durch die Reaktionsansätze mit 10 nM des Phosphataseninhibitors Calyculin A plus 100 μM Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS sowie nur 10 nM Calyculin A genauer betrachtet. Eine Negativkontrolle lieferten Probeentnahmen aus einem unbehandelten Ansatz gereinigter Thrombozyten. Die zwanzigminütige Stimulation mit 100 μM 8-pCPT-cGMP diente zur Positivkontrolle der maximal stimulierten PKG.

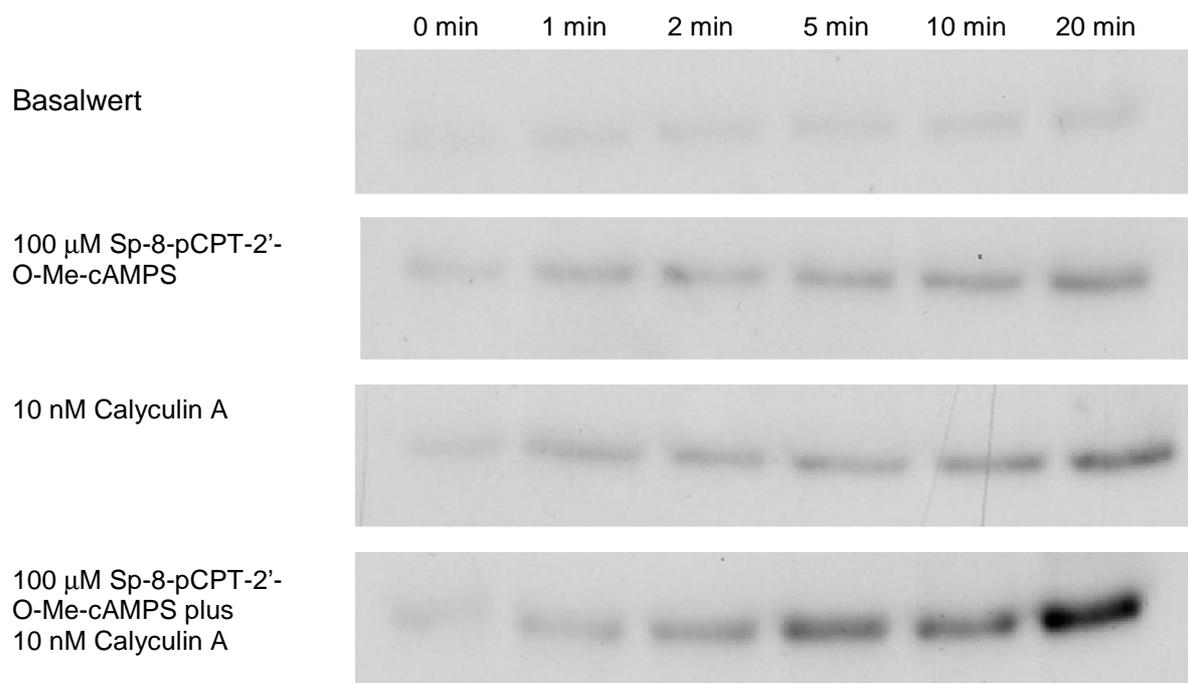


Abb. 17: Western Blot der Phosphorylierung von VASP:

Nach Stimulation gereinigter Thrombozyten wurde die Phosphorylierung an Ser-239 durch PKG detektiert. Sowohl Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS als auch Calyculin A führen zu einer gesteigerten Phosphorylierung von VASP. In der Costimulation mit beiden Substanzen zeigt sich ein synergistischer Effekt. Der Basalwert bleibt im Zeitverlauf konstant.

Tabelle 2: Pixelzahlen der Banden von Phospho-S239-VASP im zeitlichen Verlauf:

Dauer der Stimulation	0'	1'	2'	5'	10'	20'
Basalwert	395	773	785	777	825	863
100 µM Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS	601	1174	1255	1516	1814	2390
10 nM Calyculin A	803	2384	2704	2971	3984	6082
100 µM Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS plus 10 nM Calyculin A	528	1235	2148	4356	4668	7505

Um die hier gemessene Aktivierung der PKG im Verhältnis zur maximal erreichbaren Aktivität zu betrachten, wurde Phospho-S239-VASP nach jeweils zwanzigminütiger Stimulation durch 100 µM 8-pCPT-cGMP, 100 µM Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS, 10 nM Calyculin A sowie 100 µM Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS plus 10 nM Calyculin A in einem Western Blot detektiert. Zur Kontrolle identischer Gesamtkonzentrationen an VASP wurde zusätzlich mit dem unspezifisch an VASP bindenden Antikörper M4 inkubiert. Anschließend wurde der entwickelte Film eingescannt und die Pixeldichte der Banden quantifiziert.

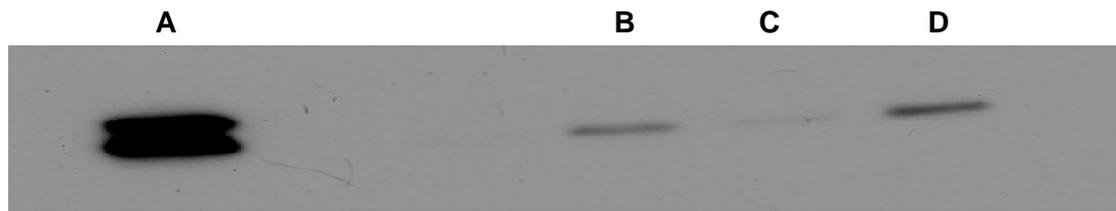


Abb. 18: Phospho-S239-VASP nach zwanzigminütiger Stimulation:

Die maximale Aktivierung der PKG durch 100 μ M 8-pCPT-cGMP (A) führt zu einer deutlich stärkeren Phosphorylierung von VASP an Ser-239 als durch die Stimulation mit 10 nM Calyculin A (B), 100 μ M Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS (C) oder 10 nM Calyculin A plus 100 μ M Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS (D) erreicht wird.

Tabelle 3: Pixelzahlen der Banden von Phospho-S239-VASP und daraus hergeleiteter Aktivitätsgrad von PKG nach zwanzigminütiger Stimulation:

	Pixelzahl	Aktivitätsgrad von PKG [%]
100 μ M 8-pCPT-cGMP	14970	100
10 nM Calyculin A	754	5
100 μ M Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS	162	1
100 μ M Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS plus 10 nM Calyculin A	1054	7

Somit betrug die durch 100 μ M Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS verursachte Aktivierung nur ein Prozent der durch den spezifischen Aktivator 8-pCPT-cGMP erreichbaren maximalen Aktivität von PKG.

6. Diskussion

6.1. Literaturvergleich der mikrokalorimetrisch ermittelten Hydrolysedaten

In den Experimenten zur Bestimmung kinetischer Daten von PDEs mit dem VP-ITC der Firma Microcal konnten Werte mit hoher Reproduzierbarkeit erhalten werden. Eine externe Validierung der Methode liefert der Vergleich der mikrokalorimetrisch ermittelten kinetischen Konstanten mit denen in der Fachliteratur publizierten. Die Tabelle 2 stellt die Bindungsaffinität k_m der untersuchten PDEs anerkannten Literaturdaten gegenüber und untermauert die Genauigkeit der Mikrokalorimetrie.

Tabelle 4: Vergleich mikrokalorimetrisch ermittelter Hydrolysedaten mit anerkannten Literaturwerten:

Enzyme	Kalorimetrie		Literatur	
	k_m (μ M) cGMP	k_m (μ M) cAMP	k_m (μ M) cGMP	k_m (μ M) cAMP
PDE 1A	8.2	93	5.0 ^a	113 ^a
PDE 1B	2.9	33	2.7 ^a	24.3 ^a
PDE 1C	4.6	3.2	1.1 ^a	1.2 ^a
PDE 2A	29.4	241	10 ^b	30 ^b
PDE 4D3		5.25		5.8 ^c
PDE 5A	2.0	200	2.0 ^d 0.62 ^e	330 ^d
PDE 6 _{cone}	10	832	29 ^f	820 ^f
PDE 10A	1.09	0.24	3.0 ^g	0.05 ^g

^a Yan et al., 1995

^b Martins et al., 1982

^c Herman et al., 2000

^d Turko et al., 1998

^e diese Arbeit (Standardmethode nach Beavo et al., 1970)

^f Huang et al., 2004

^g Soderling et al., 1999

6.2. Entscheidungskriterien und Vorschläge für die Auswahl eines Analogons

Für die Auswahl des am besten geeigneten Derivats zur Stimulierung oder Inhibition eines Effektorproteins von Cyclonukleotiden sollten einige Aspekte in Betracht gezogen werden. Eine entscheidende Rolle für die Reduzierung störender Nebeneffekte spielt die Spezifität des Derivats für den gewünschten Rezeptor. Des Weiteren sollten die Substanzen eine ausreichend hohe Membranpermeabilität aufweisen und somit eine adäquate Konzentration an ihrem Wirkort erreichen. Allerdings darf die Lipophilie hierbei nicht zu hoch sein, um eine gute Löslichkeit im Zytoplasma der Kulturzellen zu gewährleisten. Eine weitere Anforderung an die Derivate ist die Stabilität gegenüber der Degradation durch PDEs. Besonders in Langzeitexperimenten ist die Halbwertszeit des Analogons von entscheidender Bedeutung. Ebenfalls gilt es zu berücksichtigen, dass viele Analoga, welche eine Resistenz gegenüber PDEs aufweisen, konsequenterweise in den meisten Fällen als Inhibitoren dieser PDEs wirken. Eine dadurch verursachte Erhöhung der Spiegel von cAMP oder cGMP wiederum könnte verschiedene Stoffwechselwege aktivieren und dadurch Störeffekte hervorrufen. Häufig ist es nötig, einen Kompromiss zwischen allen zu berücksichtigenden Faktoren zu finden. Hilfreich kann dabei die Betrachtung der Expressionslevel relevanter Cyclonukleotidrezeptoren sein. So kann durchaus ein Derivat Verwendung finden, welches zwar instabil gegen die Hydrolyse durch PDE 10A ist, diese jedoch in den herangezogenen Kulturzellen nur gering exprimiert wird.

Für die Aktivierung des Guaninnukleotidaustauschfaktors Epac stellte sich 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP als besonders geeignet heraus. In-vitro-Versuche mit Epac zeigten eine Affinität von 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, welche sogar über der des physiologischen Liganden cAMP liegt (Rehmann et al., 2003; Christensen et al., 2003). Neben diesen hervorragenden Aktivierungseigenschaften besitzt das Derivat dank seiner hohen Lipophilie auch eine sehr gute Membranpermeabilität. 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP zeigte weder aktivierende noch inhibierende Effekte auf die PKA und die PKG und minimiert somit das Risiko von direkten Störeffekten durch diese Signalwege. Ein Nachteil des Derivats allerdings liegt in der mangelnden Resistenz gegenüber PDEs. So hydrolysieren besonders die PDEs 5A und 10A das Analogon 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP mit ähnlicher Effektivität wie ihre physiologischen Substrate cAMP und cGMP. In Langzeitexperimenten mit Zellen, in denen PDE 5A oder PDE 10A in höheren Konzentrationen vorliegen, ist 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP daher weniger zur suffizienten

Aktivierung von Epac geeignet. Hier könnte man auf das Sp-modifizierte Nachfolgederivat Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS zurückgreifen. Dieses ist äußerst stabil gegenüber der Hydrolyse durch alle getesteten PDEs, entfaltet auf diese jedoch eine beträchtliche inhibitorische Wirkung. Besonders die PDEs 4D3, 5A, 6_{cone} und 10A werden von Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS mit K_i -Werten im einstelligen mikromolaren Bereich gehemmt. Alle Zellen, die ihre Cyclonukleotidspiegel vornehmlich über diese PDEs regulieren, sind daher sehr empfindlich für Störeffekte durch dieses Derivat.

Weitaus schwieriger gestaltet sich die spezifische Aktivierung von PKA. Häufig wird das Derivat 8-Br-cAMP für die Stimulation des PKA-Signalwegs in Zellkultur verwendet. Allerdings ist diese Substanz in der Lage, auch Epac effektiv zu aktivieren. Zudem wird 8-Br-cAMP von allen untersuchten PDEs als gutes Substrat akzeptiert und daher schnell hydrolysiert. Da es wegen seiner geringen Membranpermeabilität intakten Zellen in sehr hohen Konzentrationen zugeführt werden muss, lassen sich massive Nebeneffekte durch eine Aktivierung von Epac oder einen kompetitiven Einfluss auf die Funktion der PDEs nicht ausschließen. Verbesserte Eigenschaften besonders für die Aktivierung von PKA II bietet das Analogon Sp-5,6-DCI-cBiMPS. Dieses ist resistent gegen den enzymatischen Abbau durch PDEs und besitzt wegen seiner hohen Lipophilie eine deutlich bessere Membranpermeabilität. Als problematisch erweist sich jedoch auch bei diesem Derivat die Diskriminierung zwischen den Vertretern von PKA und Epac. Kürzlich wurden N6-modifizierte Substanzen wie 6-Bnz-cAMP mit erhöhter Spezifität für die PKA eingeführt. Die Modifikation am Stickstoffatom reduziert den aktivierenden Effekt auf Epac und die PKG und erhöht zugleich die Membranpermeabilität (Rehmann et al., 2003). Ein weiterer Vorteil dieser Substanz liegt in der Stabilität gegenüber der Hydrolyse durch die meisten PDEs, ohne dabei eine große inhibitorische Wirkung zu entwickeln. Insgesamt kann somit 6-Bnz-cAMP als das am ehesten für die spezifische Aktivierung der PKA geeignete Derivat empfohlen werden. Ein gewisser hemmender Effekt auf die PDE 1B sowie die mäßige Hydrolyse durch die PDE 10A sollten bei der Verwendung berücksichtigt werden.

Rp-8-Br-cAMPS ist ein Derivat zur spezifischen Inhibition der PKA. Allerdings vermag es auch die PKG sowie die PDEs 1B, 1C, 2A und 10A schon bei niedrigen Konzentrationen im zweistelligen mikromolaren Bereich zu inhibieren. Besonders

wegen der geringen Lipophilie und der daraus resultierenden Notwendigkeit, große Mengen an Derivat den Zellen zuzuführen, könnten ungewollte Nebensignale die Interpretation biologischer Effekte erschweren.

Für die gezielte Aktivierung der PKG wurden verschiedene Analogsubstanzen von cGMP synthetisiert. Da schon das physiologische cGMP auf Grund der chemischen Struktur seiner Base keine Aktivierung von PKA und Epac verursacht, sind auch bei den cGMP-Derivaten Störeffekte durch eine Aktivierung dieser Signalwege nicht zu erwarten. Mit als erste auf dem Markt erschienene und heute noch häufig verwendete Substanz zur Stimulation von PKG ist 8-Br-cGMP. Es besitzt eine hohe Aktivierungspotenz für alle drei Isoformen der PKG, ohne dabei Einfluss auf die Cyclonukleotidrezeptoren PKA und Epac zu nehmen. Außerdem zeigte sich dieses Derivat in den mikrokalorimetrischen Experimenten als stabil gegenüber der Hydrolyse durch alle PDEs mit Ausnahme der PDE 10A, welche 8-Br-cGMP als schlechtes Substrat mit hohem k_m -Wert und niedriger V_{max} akzeptierte. Probleme beim Gebrauch von 8-Br-cGMP können durch eine Inhibition der PDEs entstehen. Wegen seiner geringen Membranpermeabilität wird 8-Br-cGMP gewöhnlich in sehr hohen Konzentrationen in die Umgebung der Kulturzellen gebracht. Es existiert jedoch keine zuverlässige Methode, die intrazellulär tatsächlich erreichte Konzentration des Derivats zu bestimmen. Da die Inhibitionskonstante für die Hemmung von PDE 1B durch 8-Br-cGMP lediglich 4,5 μM beträgt, besteht durch dieses Derivat besonders bei PDE 1B stark exprimierenden Zellen wie Neuronen und Lymphozyten die Gefahr empfindlicher Störungen der Cyclonukleotidspiegel. So könnte man zum Beispiel nach Behandlung mit 8-Br-cGMP gemessene biologische Effekte, die tatsächlich durch eine Hemmung von PDEs mit konsekutiver Erhöhung der Cyclonukleotidspiegel und somit durch Aktivierung alternativer Signalwege hervorgerufen werden, fälschlicherweise als Folge einer PKG-Aktivierung interpretieren.

Als modifiziertes Analogon mit verbesserter Aktivierungspotenz besonders für die PKG I β wurde das Derivat 8-Br-PET-cGMP entwickelt. Dieses zeichnet sich neben der fehlenden Beeinflussung von PKA und Epac auch durch seine gute Membranpermeabilität aus. Zudem ist es resistent gegenüber dem Abbau durch die meisten PDEs. In den Versuchen mit dem ITC konnten nur PDE 1B sowie PDE 1C 8-Br-PET-cGMP hydrolysieren. Die niedrige Affinität mit k_m -Werten um 100 μM lässt den Grad der Degradation des Derivats als tolerabel erscheinen. Größere Probleme

könnte die von 8-Br-PET-cGMP verursachte Inhibition der anderen Vertreter der PDEs verursachen. So werden die PDE 2A, 4D3, 5A und 6_{cone} schon bei niedrigen Konzentrationen um 20 μM deutlich in ihrer Funktion beeinträchtigt.

8-pCPT-cGMP aktiviert die PKG bereits in niedrigeren Konzentrationen als das physiologische cGMP und bevorzugt dabei besonders die PKG II als Zielprotein. Eine hohe Membranpermeabilität sowie die fehlenden Effekte auf die Signalwege von PKA und Epac sind weitere günstige Eigenschaften dieser Substanz. Zwar hemmt es die PDE 1B mit einem k_i -Wert in Höhe von etwa 10 μM , verursacht jedoch nur eine moderate Inhibition anderer PDEs. Ähnlich wie der Epac-Modulator 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, so wird auch 8-pCPT-cGMP von den PDEs 5A und 10A mit vergleichbarer Kinetik wie deren physiologisches Substrat hydrolysiert. Bei Experimenten mit Zellen wie Neuronen, die hohe Expressionslevel dieser PDEs aufweisen, sollte daher auf ein anderes cGMP-Analogon zurückgegriffen werden. Ein überraschendes Ergebnis der Versuche mit dem Mikrokalorimeter ist die mäßige Hydrolyse von 8-pCPT-cGMP durch die cAMP-spezifische PDE 4D3. Wegen des hohen k_m -Wertes über 50 μM und der niedrigen V_{max} stellt dies allerdings nur ein geringes Problem für den Gebrauch der Substanz dar. Zusammenfassend kann 8-pCPT-cGMP als selektiver Aktivator der PKG empfohlen werden. Bei Zellen mit hoher Expression von PDE 5A und 10A könnte man alternativ 8-Br-PET-cGMP in niedriger Konzentration verwenden.

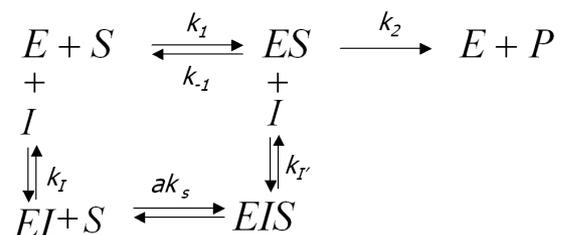
Für die spezifische Inhibition der PKG stehen mit Rp-8-Br-PET-cGMPS und Rp-8-pCPT-cGMPS zwei äußerst effektive Derivate zur Verfügung. Rp-8-Br-PET-cGMPS hemmt bevorzugt die beiden Splicevarianten der PKG I während Rp-8-pCPT-cGMPS alle drei PKG mit ähnlichem k_i -Wert inhibiert. Beide Substanzen zeigen keinen Einfluss auf PKA und Epac und konnten in den mikrokalorimetrischen Versuchen von keiner der PDEs gespalten werden. Ein entscheidender Unterschied besteht im Inhibitionsverhalten auf PDEs. Zwar verursachen beide Substanzen eine relevante Hemmung aller PDEs, diese ist jedoch bei Rp-8-Br-PET-cGMPS deutlich stärker ausgeprägt. Aus diesem Grund sowie wegen der günstigeren Membranpermeabilität sollte für die Inhibition der PKG dem Derivat Rp-8-pCPT-cGMPS der Vorzug gegeben werden.

6.3. Möglicher Einfluss von GAF-Domänen auf die katalytische Aktivität

Das Akronym GAF steht für eine Gruppe von Proteindomänen, die als erstes bei cGMP-bindenden PDEs, der Adenylcyclase von *Anabaena* sowie dem *Escherichia coli* Stamm FhIA beschrieben wurden (Aravind et al., 1997). Bis heute hat man über 400 Vertreter der sehr heterogenen Familie GAF-enthaltender Proteine entdeckt. Neben der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen besitzen diese etwa 110 Aminosäuren langen Untereinheiten auch regulatorische Funktionen und können zudem durch eine Tasche mit einer sauren, hydrophoben Gruppe kleine Liganden wie cGMP binden. In den Familien der PDEs 2, 5, 6, 10 und 11 beinhalten die Monomere an ihrem N-terminalen Pol zwei nebeneinander gelegene GAF-Domänen. Kristallographische Untersuchungen von PDE 2A zeigten, dass GAFa eine wichtige Rolle bei der Bildung des homodimeren Holoenzym spielt, während GAFb eine hochaffine Bindungsstelle für cGMP mit einer Bindungskonstanten im nanomolaren Bereich besitzt (Martinez et al., 2002). Durch Bindung von cGMP an GAFb wird die katalytische Aktivität von PDE 2A allosterisch reguliert und dadurch sowohl cGMP als auch cAMP effektiver hydrolysiert (Stroop et al., 1991). Bei der in Photorezeptoren vorkommenden PDE 6 konnte gezeigt werden, dass nach Bindung von cGMP an die beiden GAF-Domänen diese eine starke Interaktion mit der regulatorischen γ -Untereinheit eingehen und somit die Inhibition der cGMP-Spaltung aufheben (Norton et al., 2000). Ausführlich erforscht ist die allosterische Wirkung der GAF-Domänen bei PDE 5A. Hier führt die Bindung von cGMP an GAFa zu einer deutlichen Konformationsänderung des Proteins. Durch eine Linearisierung der Tertiärstruktur klappt eine autoinhibitorische Domäne zur Seite und gibt so das katalytische Zentrum für potentielle Substrate frei. Außerdem erleichtert die lineare Form der PDE 5A eine Phosphorylierung am Serin 102 durch Proteinkinase G und damit eine Aktivierung für einen längeren Zeitraum. Da die PDE 5A über die allosterische Seite schon bei einer sehr niedrigen Konzentration von 1 μ M cGMP maximal aktiviert wird, misst man diesem Mechanismus die entscheidende Bedeutung als Antwort auf kurzfristige Konzentrationsschwankungen von cGMP im submikromolaren Bereich bei. Erst bei weiterer Anhäufung von cGMP schaltet die PKG durch Phosphorylierung der PDE 5A eine längerfristige negative Rückkopplung des Signalweges an (Rybalkin et al., 2003).

Die mit dem ITC durchgeführten Experimente konnten zeigen, dass verschiedene Analogsubstanzen von cGMP und cAMP eine Hemmung der getesteten PDEs

hervorrufen. Während die Derivate bei den Vertretern der PDE-Familie 1 ausschließlich einen kompetitiven Inhibitionsmechanismus aufwiesen, zeigte sich in einigen anderen Fällen auch eine Inhibition vom linear-mixed-Typ. Bei dieser Form der Inhibition wird sowohl das katalytische Zentrum durch den Inhibitor blockiert als auch das Enzym über eine Inhibitorinteraktion mit einer regulatorischen Seite außerhalb des aktiven Zentrums gehemmt. Daraus resultiert neben einer Erhöhung des $k_{m(\text{app})}$ -Wertes auch eine Verminderung der $V_{\text{max}(\text{app})}$ in Anwesenheit des Inhibitors. Das Äquilibrium für diesen Typ der Inhibition kann man folgendermaßen darstellen:



Wie in Kapitel 3.4. ausführlich dargestellt, ist wegen des katalytisch inaktiven Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplexes EIS der V_{max} -Wert reduziert.

In der jüngeren Fachliteratur häufen sich Publikationen über den Mechanismus der linear-mixed-Inhibition. So konnte gezeigt werden, dass die bovine Ribonuklease A durch das *Pholiota nameko* Polysaccharid PNPS-1 nach dem linear-mixed-Typ gehemmt wird (Li et al., 2006). Mikrokalorimetrische Experimente ergaben, dass dies auch auf die Inhibition des Enzyms p38 MAPK α durch den Komplex MgAMP-PCP zutrifft (Szafranska et al., 2005). Bei der Suche nach neuen antihypertensiven Medikamenten wurden verschiedene Substanzen auf ihre hemmende Wirkung auf Renin durch eine Fluoreszenzmethode analysiert. Das Houltuynin-Analogon SHA-C14 zeigte sich hierbei als effektiver Inhibitor und wirkte ebenfalls nach dem linear-mixed-Prinzip (Yuan et al., 2006).

Als mögliche Untereinheiten der PDEs, die über Interaktionen mit Cyclonukleotidanaloga regulatorische Effekte entwickeln könnten, kommen besonders die GAF-Domänen in Betracht. In vielen Experimenten konnte gezeigt werden, dass cGMP zumindest an einen Teil der GAF-Domänen binden kann und dadurch die Hydrolyseaktivität der PDE beträchtlich steigert. Sollten die chemisch modifizierten Derivate ebenfalls eine Affinität zu den allosterischen Bindungsstellen aufweisen, so könnte dadurch eine optimale Aktivierung der PDE verhindert und die maximale Umsatzrate reduziert werden. Untersuchungen der Affinität von cGMP-

Analoga zur GAF-Domäne von PDE 6 erbrachten, dass etwa 8-Br-cGMP die Bindung von cGMP mit einem IC_{50} -Wert von nur 13.4 μ M zu inhibieren vermag (Hebert et al., 1998). Vor kurzem gelang erstmalig der Nachweis, dass GAF-Domänen eine wichtige Rolle für die Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren spielen können. So verliert die Substanz Vardenafil über 90 Prozent ihrer Potenz zur Inhibition der PDE 5A, wenn diese um ein 46 Aminosäuren umfassendes Segment der GAFb verkürzt wird (Blount et al., 2006). Zudem zeigte sich, dass dieser Teil der GAFb essentiell für die Dimerisation der PDE 5A zum voll aktiven Holoenzym ist. Möglicherweise sind die Analoga also durch Wechselwirkungen mit der GAF-Domäne auch im Stande, die Dimerisation und das Erreichen der für die effektive Hydrolyse erforderlichen Konformation des Enzyms zu behindern.

Die bisher untersuchten GAF-Domänen der PDEs 2, 5 und 6 zeigen eine etwa zwanzig- bis einhundertfach höhere Affinität für cGMP gegenüber cAMP, während für diejenigen der PDEs 10 und 11 noch keine verlässlichen Daten vorliegen (Zoraghi et al., 2004). In den Experimenten mit dem ITC verursachten die Derivate 8-Br-cGMP, 8-Br-PET-cGMP sowie Rp-8-Br-PET-cGMPS eine Inhibition der PDEs 2A, 5A und 6_{cone} nach dem linear-mixed-Typ mit einer Reduktion der V_{max} um etwa 30 bis 70 Prozent. Wie wegen der cGMP-Spezifität dieser GAF-Domänen zu vermuten war, so konnte dagegen keines der cAMP-Derivate die Kinetik einer Inhibition nach dem linear-mixed-Mechanismus hervorrufen. Bemerkenswert ist zudem, dass auch die keine Cyclonukleotid-bindende regulatorische Domäne enthaltenden PDEs 1 A, B und C von keinem einzigen der getesteten 11 Derivate im linear-mixed-Mechanismus gehemmt werden konnten. Dagegen wurde die PDE 10A besonders von den Sp-modifizierten Derivaten nach dem linear-mixed Typ inhibiert. So haben die Substanzen Sp-5,6-DCI-cBIMPS und Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS schon bei Konzentrationen im niedrigen mikromolaren Bereich die V_{max} um 50 % reduziert.

Interessanterweise wurde die PDE 4D3 von den meisten cAMP- und cGMP-Analoga, die sie nicht als Substrat akzeptierte, linear-mixed-typisch inhibiert. Dieses Enzym besitzt zwar keine GAF-Domänen, dafür aber mit den N-terminal gelegenen Regionen UCR1 und UCR2 ebenfalls eine regulatorische Seite. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass diese hochkonservierten Domänen eine entscheidende Rolle bei der Dimerisation gerade der langen Splicevariante PDE 4D3 zum Holoenzym sowie bei der Phosphorylierung durch PKA spielen (Richter et al., 2002). Weitere Untersuchungen ergaben zudem, dass die UCR-vermittelte Homodimerisation und

die Phosphorylierung an Serin 54 eine Steigerung der Aktivität um den Faktor 2,5 bewirkt. Außerdem stabilisiert die Dimerisation das Enzym in seiner Rolipram-sensitiven HARBS-Konformation (Richter et al., 2004). Insgesamt ergeben sich also einige funktionelle Ähnlichkeiten zwischen den UCR-Domänen der PDE 4 und den GAF-Domänen anderer PDEs. Bis heute wurde nicht erforscht, inwieweit Cyclonukleotide oder deren Analogsubstanzen an die UCR-Domänen binden können. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass die in den ITC-Versuchen verwendeten Derivate Interaktionen mit den UCR-Domänen eingehen und zum Beispiel durch Störung des Dimerisationsprozesses die Umsatzrate des Enzyms beeinflussen können.

Die Beobachtung einer reduzierten maximalen Umsatzrate in Anwesenheit der Derivate könnte auch durch eine gewisse Instabilität des Enzyms über die Dauer des Versuchs erklärt werden. Um eine zeitabhängige Inaktivierung der PDEs auszuschließen, wurden Kontrollexperimente mit zwei aufeinanderfolgenden Injektionen des physiologischen Substrats mit einem zeitlichen Abstand von 60 Minuten durchgeführt. Da zwischen den kinetischen Daten der ersten und der zweiten Injektion kein signifikanter Unterschied bestand, konnten Derivat-unabhängige Aktivitätsverluste ausgeschlossen werden.

Die experimentellen Resultate einer Inhibition der PDEs 2A, 4D3, 5A, 6_{cone} und 10A durch einige Analoga nach dem linear-mixed-Typ könnten demnach durch Interaktionen mit N-terminal gelegenen regulatorischen Untereinheiten verursacht worden sein. Möglicherweise erbringen weiterführende Untersuchungen von Struktur und Funktion dieser konservierten Domänen ein genaueres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen.

6.4. Kinetische Unterschiede der Vertreter der Phosphodiesterasenfamilie 1

Für die Familie der Calcium- und Calmodulin-abhängigen PDEs sind bisher drei Gene beschrieben und deren Genprodukte als PDE 1A, B und C klassifiziert worden. Alle Vertreter können cytosolisch als Monomer vorliegen und besitzen eine N-terminale autoinhibitorische Bindungsstelle für CaM-Komplexe. Die volle Hydrolyseaktivität der PDE 1 wird erst nach Dimerisation zweier CaM-gebundener Monomere erreicht. Somit bilden sie eine intrazelluläre Schnittstelle zwischen Calcium-abhängigen und Cyclonukleotid-abhängigen Signalwegen. PKA kann inhibitorische Wirkung auf die PDE 1 entwickeln, indem sie deren Affinität zu den

aktivierenden CaM-Komplexen durch eine Phosphorylierung herabsetzt (Sharma et al., 1985). Die Expression der Phosphodiesterasen 1 ist beim Menschen stark gewebeabhängig. Während PDE 1C besonders in proliferierenden glatten Muskelzellen und dem olfaktorischen Epithel dominiert, konnte PDE 1B in Purkinjezellen, dem dopaminergen System sowie in aktivierten Immunzellen nachgewiesen werden (Essayan et al., 2001). Zudem konnte eine gezielte subzelluläre Lokalisation beispielsweise im Mittelstück von murinen und humanen Spermien gezeigt werden (Vasta et al., 2005).

Um neue Erkenntnisse über die Substrat- und Inhibitorspezifität verschiedener Mitglieder derselben PDE-Familie zu erlangen, wurden die mikrokalorimetrischen Versuche mit allen drei Vertretern der PDE 1 durchgeführt. Die in der Fachliteratur beschriebene Hydrolyse sowohl von cAMP als auch von cGMP durch sämtliche PDE-1-Enzyme konnten die Experimente mit dem ITC bestätigen, wobei die ermittelten k_m -Werte sehr nahe an in der Vergangenheit publizierten Daten liegen (Yan et al., 1995). Über die Umsatzraten besonders der PDE 1C dagegen war bisher nur ein sehr begrenztes Wissen vorhanden. In den durchgeführten Hydrolyseexperimenten zeigte sich, dass sowohl PDE 1B als auch PDE 1C die beiden physiologischen Cyclonukleotide cAMP und cGMP mit sehr ähnlichen V_{max} -Werten von etwa 15 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ spalten. Der Hauptunterschied zwischen diesen beiden PDEs besteht hier in der zehnfach höheren Affinität von PDE 1C zu cAMP. PDE 1A dagegen präferiert cGMP als Substrat deutlich gegenüber cAMP, degradiert letzteres jedoch, verglichen mit der Hydrolyse von cGMP, mit doppelter V_{max} . Auch 8-Br-cAMP fungiert als gutes Substrat aller drei PDEs. Interessanterweise erhöht die Bromsubstitution die Affinität des Derivats zu PDE 1A, während sie einen deutlichen Affinitätsverlust für PDE 1B und PDE 1C verursacht. Ein weiterer Unterschied besteht in der Stabilität des Derivats 8-Br-PET-cGMP. Dieses ist resistent gegenüber der Hydrolyse durch PDE 1A, wird aber von den anderen beiden PDEs enzymatisch umgesetzt. Große Unterschiede bestehen hinsichtlich der Inhibitionspotenz nicht hydrolysierbarer Derivate. Während PDE 1B von jedem getesteten stabilen Analogon im niedrigen mikromolaren Bereich gehemmt wird, sind die inhibierenden Effekte auf PDE 1A und PDE 1C vergleichsweise gering ausgeprägt. Dies spricht für eine relativ unspezifische Bindungstasche im katalytischen Zentrum der PDE 1B, die auch vielen strukturähnlichen Molekülen gestattet zu binden und dadurch als kompetitiver Inhibitor zu wirken.

Die Unterschiede in den kinetischen Eigenschaften der drei Vertreter der PDE-Familie 1 verdeutlichen die Relevanz genauer Untersuchungen jedes einzelnen Enzyms. Bis heute ist es nicht gelungen, das Holoenzym eines der PDE-1-Enzyme kristallographisch darzustellen. Weitere Experimente auf diesem Gebiet werden nötig sein, um ein besseres Verständnis der katalytischen Mechanismen und der daran beteiligten Aminosäuren zu erlangen.

6.5. Einfluss von Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS auf gereinigte Thrombozyten

Um die Relevanz der mikrokalorimetrisch gemessenen Inhibition von PDEs durch Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS in Zellen zu untersuchen, wurden Thrombozyten mit diesem Derivat stimuliert und anschließend durch Western Blot die Phosphorylierung eines Substratproteins der PKG detektiert. Das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein VASP wird am Ser-157 bevorzugt von PKA phosphoryliert, wohingegen PKG vornehmlich Ser-239 als Substrat akzeptiert (Smolenski et al., 1998). Neben der Phosphorylierung durch Proteinkinasen bestimmt auch die Dephosphorylierung durch Phosphatasen maßgeblich die Konzentration phosphorylierter Substratproteine. Die für die Dephosphorylierung von VASP hauptverantwortliche PP 2A ist in Thrombozyten mit Konzentrationen bis 1 μ M hoch exprimiert (Abel et al., 1995) und wurde deshalb in einem Teil der Experimenten durch Calyculin A inhibiert.

Die durchgeführte Thrombozytenstimulation konnte zeigen, dass die Inhibition von PDEs durch Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS auch in intakten Zellen auftritt und Stoffwechselveränderungen hervorruft. So stieg die Phosphorylierung von VASP an der Phosphorylierungsstelle Ser-239 nach 1, 2, 5, 10 und 20 Minuten kontinuierlich an. In der digitalen Auswertung der Bandendicke nahm die Pixeldichte sowohl im Reaktionsansatz mit Calyculin A als auch in dem mit Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS im Zeitverlauf zu, wobei durch die Inhibition der Phosphatase ein größerer Effekt erzielt wurde. Der ohne Stimulation konstant geblieben Basalwert sowie die größte gemessene Konzentrationssteigerung von Phospho-S239-VASP in der Costimulation mit Calyculin A und Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS sprechen dabei für eine Aktivitätssteigerung der PKG durch Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS. Diese Annahme bekräftigt auch der Radioimmunassay, in welchem gezeigt wurde, dass der intrazelluläre Spiegel von cGMP zehn Minuten nach der Stimulation mit Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS auf etwa die doppelte Höhe des Ursprungswerts zunahm.

Zusammenfassend sprechen die ermittelten Daten für eine durch PDE-Inhibition verursachte Erhöhung der Cyclonukleotidspiegel mit konsekutiver Aktivierung der PKG. Hierbei muss erwähnt werden, dass die digital quantifizierte Aktivitätssteigerung der PKG nur etwa ein Prozent der durch gezielte Stimulation mit 100 μM 8-pCPT-cGMP erreichbaren betrug. Da jedoch auch durch Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS eine unphysiologisch hohe Aktivität der PKG generiert wird, kann eine gewisse Relevanz für die Stoffwechselfvorgänge in mit diesem Derivat stimulierten Zellen nicht sicher ausgeschlossen werden.

7. Zusammenfassung

Phosphodiesterasen sind in der Lage, auch chemisch modifizierte Analogsubstanzen der Cyclonukleotide cAMP und cGMP zu hydrolysieren. Mikrokalorimetrische Experimente zeigen, dass die PDEs 5A und 10A die Derivate 8-pCPT-cGMP und 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP ähnlich effektiv spalten wie ihr physiologisches Substrat. Der PKA-Aktivator 8-Br-cAMP wird von jeder der acht getesteten PDEs als gutes Substrat akzeptiert.

Hydrolysestabile Derivate dagegen entwickeln häufig inhibitorische Wirkung auf die PDEs und verursachen dadurch Veränderungen der intrazellulären Konzentration von cAMP und cGMP. Die Substanz Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS vermag in Experimenten mit dem ITC PDEs mit k_i -Werten im einstelligen mikromolaren Bereich zu inhibieren. In mit Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS stimulierten Thrombozyten steigt als Folge der Phosphodiesterasenhemmung die Konzentration an cGMP und dadurch die PKG-vermittelte Phosphorylierung von VASP. Ähnliche Effekte können die hydrolysestabilen Substanzen Sp-5,6-DCl-cBIMPS und 8-Br-PET-cGMP sowie Rp-modifizierte Derivate verursachen.

Die Mikrokalorimetrie ist eine einfache, schnelle und präzise Methode zur Durchführung von Hydrolyse- und Inhibitionsexperimenten. Neben der Berechnung der Inhibitionskonstanten ermöglichen die generierten Daten Aussagen über den Inhibitionsmechanismus. Einige Analoga inhibieren die GAF-Domänen tragenden PDEs 2A, 5A, 6_{cone} und 10A sowie die PDE 4D3 nach dem linear-mixed-Typ und beeinflussen daher neben den katalytischen vermutlich auch regulatorische Zentren dieser Enzyme.

Zusammenfassend erleichtern die ermittelten Daten mit Cyclonukleotiden forschenden Wissenschaftlern die Auswahl des für ihre Fragestellung am besten geeigneten Derivats.

8. Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylylcyclase
Ak	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
cGMP	cyclisches Guanosin-3',5'-Monophosphat
CNG	Cyclic Nucleotide Gated Channel
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Epac	Guaninaustauschfaktor direkt aktiviert durch cAMP
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
GST	Schistosoma japonicum Glutathione S-Transferase
h	Stunde
ΔH	freie Enthalpie
HCl	Salzsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ITC	Isothermal Titration Calorimeter
k	Kilo (10 ³)
kDa	kiloDalton
k _m	Affinitätskonstante
k _{m(app)}	Affinitätskonstante unter den gegebenen Bedingungen
k _i	Inhibitionskonstante
l	Liter
m	milli (10 ⁻³)
μ	mikro (10 ⁻⁶)
M	Molar (mol/Liter)
min	Minute
mRNA	messenger RNA

n	nano (10^{-9})
pCPT	Chlorophenylthio
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDE	Phosphodiesterase
pGC	partikuläre Guanylylcyclase
pH	pH-Wert
PNPS-1	<i>Pholiota Nameko</i> Polysaccharid 1
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PP 2A	Protein Phosphatase 2A
RIA	Radioimmunassay
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodium-dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
sGC	lösliche (soluble) Guanylylcyclase
U	Unit (Enzymeinheit)
UCR	Upstream Conserved Region
V	Volt
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
V_{\max}	maximale Umsatzrate
$V_{\max(\text{app})}$	maximale Umsatzrate unter den gegebenen Bedingungen
v/v	Volume per Volume
w/v	Weight per Volume

9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung der über Cyclonukleotide regulierten Signalewege:	3
Abb. 2: Schematischer Aufbau und Strukturelemente der PDEs:	5
Abb. 3: Schematischer Aufbau (A) und Fotografie (B) des Mikrokalorimeters:.....	15
Abb. 4: Elemente eines mikrokalorimetrischen Experiments:.....	16
Abb. 5: Skizze (A) und Fotografie (B) des ThermoVac:	17
Abb. 6: Laden der Injektionsspritze:.....	19
Abb. 7: Hauptfenster des Bedienungsmenüs des ITC:	20
Abb. 8: Mikrokalorimetrische Untersuchung der Hydrolyse von cGMP durch PDE 2A:	23
Abb. 9: Datenverarbeitung der Hydrolyse von cGMP durch PDE 2A:	24
Abb. 10: Kinetik der Hydrolyse von cGMP durch PDE 2A:.....	25
Abb. 11: Analyse des Inhibitionsverhaltens:	26
Abb. 12: Kurvenverlauf bei einem stabilen Derivat:	27
Abb. 13: Integration der Flächen von Derivat- und Hintergrundmessung:	28
Abb. 14: Fraktionen der Reinigung von PDE 6:	32
Abb. 15: Digitale Quantifizierung der Konzentration von PDE 10A:	37
Abb. 16: Bestimmung der Hydrolyseaktivität von PDE 5A mit der radiaktiven Methode nach Beavo:	39
Abb. 17: Western Blot der Phosphorylierung von VASP:	53
Abb. 18: Phospho-S239-VASP nach zwanzigminütiger Stimulation:.....	54

10. Literaturverzeichnis

Abel K., Mieskes G., Walter U., Dephosphorylation of the focal adhesion protein VASP in vitro and in intact human platelets, *FEBS let.* **370** (1995) 184-188.

Aravind L., Ponting C.P., The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins, *Trends Biochem. Sci.* **22** (1997) 458-459.

Ashmann D.F., Lipton R., Mellicow M.M., Price T.D., Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **11** (1963) 330-334.

Bain J., McLauchlan H., Elliott M., Cohen P., The specificities of protein kinase inhibitors: an update, *Biochem. J.* **371** (2003) 199-204.

Barnes A.P., Livera G., Huang P., Sun C., O'Neal W.K., Conti M., Jackson Stutts M., Milgram S.L., Phosphodiesterase 4D forms a camp diffusion barrier at the apical membrane of the airway epithelium, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 7997-8003.

Beavo J.A., Hansen R.S., Harrison S.A., Hurwitz R.L., Martins T.J., Mumby M.C., Identification and properties of cyclic nucleotide phosphodiesterases, *Mol. Cel. Endocrinol.* **28** (1982) 387-410.

Beavo J.A., Hardman J.G., Sutherland E.W., Hydrolysis of cyclic guanosin and adenosin 3',5'-phosphates by rat and bovine tissues, *J. Biol. Chem.* **245** (1970) 5649-5655.

Beltman J., Becker D.N., Butt E., Jensen G.S., Rybalkin S.D., Jastorff B., Beavo J.A., Characterization of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases with Cyclic GMP Analogs: Topology of the Catalytic Domains, *Mol. Pharmacol.* **47** (1995) 330-339.

Bender A.T., Beavo J.A., Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use, *Pharmacol. Rev.* **58** (2006) 488-520.

Bischoff E., Potency, selectivity, and consequences of nonselectivity of PDE inhibition, *Int. J. Impot. Res.* **16 (Supple 1)** (2004) 11-14.

Blount M.A., Zoraghi R., Ke H., Bessay E.P., Corbin J.D., Francis S.H., A 46-amino acid segment in phosphodiesterase-5 GAF-B domain provides for high vardenafil potency over sildenafil and tadalafil and is involved in phosphodiesterase-5 dimerization, *Mol. Pharmacol.* **70** (2006) 1822-1831.

Bos J.L., Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research, *Mol. Cell. Biol.* **4** (2003) 733-738.

Butcher R.W., Sutherland E.W., Adenosin 3',5'-phosphate in biological materials, *J. Biol. Chem.* **237** (1962) 1244-1250.

Butt E., Nolte C., Schulz S., Beltman J., Beavo J.A., Jastorff B. and Walter U., Analysis of the functional role of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets using a specific activator 8-para-chlorophenylthio-cGMP, *Biochem. Pharm.* **43** (1992) 2591-2600.

Butt E., Pöhler D., Genieser H.G., Huggins J.P. and Bucher B., Inhibition of cyclic GMP-dependent protein kinase-mediated effects by Rp-8-bromo-PET-cGMPS, *Br. J. Pharmacol.* **116** (1995) 3110-3116.

Butt E., Beltman J., Becker D.E., Jensen G.S., Rybalkin S.D., Jastorff B., Beavo J.A., Characterisation of cyclic nucleotide phosphodiesterases with cyclic camp analogs: topology of the catalytic sites and comparison with other cyclic AMP-binding proteins, *Mol. Pharmacol.* **47** (1995) 340-347.

Carvajal J.A., Germain A.M., Huidobro-Toro J.P., Weiner C.P., Molecular Mechanism of cGMP-Mediated Smooth Muscle Relaxation, *J. Cell. Physiol.* **184** (2000) 409-420.

Cheung W.Y., cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38** (1970) 533-538.

Christensen A.E., Selheim F., de Rooij J., Dremier S., Schwede F., Dao K.K., Martinez A., Maenhaut C., Bos J.L., Genieser H.G. and Døskeland S.O., cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension, *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 35394-35402.

Cortijo J., Bou J., Beleta J., Cardelus I., Llenas J., Morcillo E., Gristwood R.W., Investigation into the role of phosphodiesterase IV in bronchorelaxation, including studies with human bronchus, *Br. J. Pharmacol.* **108** (1993) 562-568.

D'Amico S., Sohler J.S., Feller G., Kinetics and energetics of ligand binding determined by microcalorimetry: insights into active site mobility in a psychrophilic α -amylase, *J. Mol. Biol.* **358** (2006) 1296-1304.

Dostmann W.R. and Taylor S.S., Identifying molecular switches that determine whether Rp-cAMPS functions as an antagonist or an agonist in the activation of cAMP-dependent protein kinase I, *Biochemistry* **30** (1991) 8710-8716.

Enserink J.M., Christensen A.E., de Rooij J., van Triest M., Schwede F., Genieser H.G., Døskeland S.O., Blank J.L. and Bos L., A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK, *Nat. Cell. Biol.* **4** (2002) 901-906.

Essayan D.M., Cyclic nucleotide phosphodiesterases, *J. Allergy Clin. Immunol. Nov.* **108** (2001) 671-680.

Francis S.H., Blount M.A., Zoraghi R., Corbin J.D., Molecular properties of mammalian proteins that interact with cGMP: protein kinases, cation channels, phosphodiesterases, and multi-drug anion transporters, *Front. Bioscience* **10** (2005) 2097-2117.

Garbers D.L., Dubois S.K., The molecular basis of hypertension, *Annu. Rev. Biochem.* **68** (1999) 127-155.

Gillespie P.G., Beavo J.A., cGMP is tightly bound to bovine retinal rod phosphodiesterase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** (1989) 4311-4315.

Greengard P., Rudolph S.A., Sturtevant J.M., Enthalpy of hydrolysis of the 3' bond of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate, *J. Biol. Chem.* **244** (1969) 4798-4800.

Hebert M.C., Schwede F., Jastorff B., Cote R.H., Structural features of the noncatalytic cGMP binding sites of frog photoreceptor phosphodiesterase using cGMP analogs, *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 5557-5565.

Herman S.B., Juilfs D.M., Fauman E.B., Juneau P., Menetski J.P., Analysis of a Mutation in Phosphodiesterase Type 4 that Alters Both Inhibitor Activity and Nucleotide Selectivity, *Mol. Pharmacol.* **57** (2000) 991-999.

Hoepfer M.M., Drug treatment of pulmonary arterial hypertension: current and future agents, *Drugs* **65** (2005) 1337-1354.

Hofmann F., The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 1-4.

Huang D., Hinds T.R., Martinez S.E., Doneanu C., Beavo J.A., Molecular determinants of cGMP binding to chicken cone photoreceptor phosphodiesterase, *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 48143-48151.

Humpl T., Reyes J.T., Holtby H., Stephens D., Adatia I., Beneficial effect of oral sildenafil therapy on childhood pulmonary arterial hypertension: twelve-month clinical trial of a single-drug, open-label, pilot study, *Circulation* **111** (2005) 3274-3280.

Jeoh T., Baker J.O., Ali M.K., Himmel M.E., Adney W.S., β -d-glucosidase reaction kinetics from isothermal titration microcalorimetry, *Anal. Biochem.* **347** (2005) 244-253.

Läemmler U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227** (1970) 680-685.

Lewis G.D., Semigran M.J., Type 5 phosphodiesterase inhibition in heart failure and pulmonary hypertension, *Curr. Heart Fail. Rep.* **1** (2004) 183-189.

Li H., Wang S., Kinetics of inhibition of ribonuclease A by pholiota nameko polysaccharide, *Int. J. Biol. Macromol.* **40** (2007) 134-138.

Lohmann S.M. and Walter U., Tracking functions of cGMP-dependent protein kinases (cGK), *Front. Bioscience* **10** (2005) 1313-1328.

Martinez S.E., Wu A.Y., Glavas N.A., Tang X.-B., Turley S., Hol W.G.J., Beavo J.A., The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** (2002) 13260-13265.

Martins T.J., Mumby M.C., Beavo J.A., Purification and Characterization of a Cyclic GMP-stimulated Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase from Bovine Tissues, *J. Biol. Chem.* **257** (1982) 1973-1982.

Moncada S., Higgs E.A., Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide, *FASEB J.* **9** (1995) 1319-1330.

Nikolaev V.O., Gambaryan S., Engelhardt S., Walter U., Lohse M.J., Real-time monitoring of PDE2 activity of live cells: hormone-stimulated cAMP hydrolysis is faster than hormone-stimulated cAMP synthesis, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 1716-1719.

Norton A.W., D'Amours M.R., Grazio H.J., Hebert T.L., Cote R.H., Mechanism of transducin activation of frog rod photoreceptor phosphodiesterase. Allosteric interactions between the inhibitory gamma subunit and the noncatalytic cGMP-binding sites, *J. Biol. Chem.* **275** (2000) 38611-38619.

Norton A.W., Hosier S., Terew J.M., Li N., Dhingra A., Vardi N., Baehr W., Cote R.H., Evaluation of the 17-kDa prenyl-binding protein as a regulatory protein for phototransduction in retinal photoreceptors, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 1248-1256.

Rappl C., Barbier P., Bourgarel-Rey V., Gregoire C., Gilli R., Carre M., Combes S., Finet J.P., Peyrot V., Interaction of 4-arylcoumarin analogues of combretastatins with microtubule network of HBL100 cells and binding to tubulin, *Biochemistry* **45** (2006) 9210-9218.

Rehmann H., Schwede F., Døskeland S.O., Wittinghofer A. and Bos J.L., Ligand-mediated activation of the AMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac, *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 38548-38556.

Rich T.C., Fagan K.A., Tse T.E., Schaack J., Cooper D.M., Karpen J.W., A uniform extracellular stimulus triggers distinct cAMP signals in different compartments of a simple cell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** (2001) 13049-13054.

Richter W., Conti M., Dimerization of the type 4 cAMP-specific phosphodiesterases is mediated by the upstream conserved regions (UCRs), *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 40212-40221.

Richter W., Conti M., The oligomerization state determines regulatory properties and inhibitor sensitivity of cAMP-specific phosphodiesterases, *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 30338-30348.

Rybalkin S.D., Rybalkina I.G., Shimizu-Albergine M., Tang X.B., Beavo J.A., PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain, *EMBO J.* **22** (2003) 469-478.

Schwede F., Maronde E., Genieser H. and Jastorff B., Cyclic nucleotide analogs as biochemical tools and prospective drugs, *Pharmacol. Ther.* **87** (2000) 199-226.

Sharma R.K., Wang J.K., Differential regulation of bovine brain calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes by cyclic AMP-dependent protein kinase and calmodulin-dependent phosphatase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** (1985) 2603-2607.

Smith J.B., Mills D.C., Inhibition of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase, *Biolchem. J.* **120** (1970) 20.

Smolenski A., Bachmann C., Reinhard K., Hönig-Liedl P., Jarchau T., Hoschuetzky H., Walter U., Analysis and Regulation of Vasodilator-stimulated Phosphoprotein Serin 239 Phosphorylation in Vitro and in Intact Cells Using a Phosphospecific Monoclonal Antibody, *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 20029-20035.

Soderling S.H., Bayuga S.J., Beavo J.A., Isolation and characterization of a dual-substrate phosphodiesterase gene family: PDE10A, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (1999) 7071-7076.

Steiner M.K., Preston I.R., Klinger J.R., Hill N.S., Pulmonary hypertension: inhaled nitric oxide, sildenafil and natriuretic peptides, *Curr. Opin. Pharmacol.* **5** (2005) 245-250.

Stroop S.D., Beavo J.A., Structure and function studies of the cGMP-stimulated phosphodiesterase, *J. Biol. Chem.* **266** (1991) 23802-23809.

Sutherland E.W., Rall T.W., The properties of an adenine ribonucleotide produced with cellular particles, ATP, Mg⁺⁺, and epinephrine or glucagons, *J. Am. Chem. Soc.* **79** (1957) 3608.

Szafranska A.E., Dalby K.N., Kinetic mechanism for p38 MAP kinase α . A partial rapid-equilibrium random-order ternary-complex mechanism for the phosphorylation of a protein substrate, *FEBS J.* **272** (2005) 4631-4645.

Takimoto E., Champion H.C., Li M., Belardi D., Ren S., Rodriguez E.R., Bedja D., Gabrielson K.L., Wang Y., Kass D.A., Chronic inhibition of cyclic cGMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophie, *Nat. Med.* **11** (2005) 214-222.

Thompson W.J., Terasaki W.L., Epstein P.M., Strada S.J., Assay of cyclic nucleotide phosphodiesterase and resolution of multiple molecular forms of the enzyme, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **10** (1979) 69-92.

Todd M.J., Gomez J., Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity?, *Anal. Biochem.* **296** (2001) 179-187.

Towbin H., Staehlin T., Gordon J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** (1979) 4350-4354.

Turko I.V., Francis S.H., Corbin J.D., Binding of cGMP to both allosteric sites of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE 5) is required for its phosphorylation, *Biochem. J.* **329** (1998) 505-510.

Vaandrager A.B., Edixhoven M., Bot A.G.M., Kroos M.A., Jarchau J., Lohmann S., Genieser H.G. and DeJonge H.R., Endogenous Type II cGMP-dependent protein kinase exists as a a dimer in membranes and can be functionally distinguished from the type I isoform, *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 11816-11823.

Vasta V., Sonnenburg W.K., Yan C., Soderling S.H., Shimizu-Albergine M., Beavo J.A., Identification of a new variant of PDE1A calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase expressed in mouse sperm, *Biol. Reprod.* **73** (2005) 598-609.

Yan C., Zhao A.Z., Bentley J.K., Loughney K., Ferguson K., Beavo J.A., Molecular cloning and characterization of a calmodulin-dependent phosphodiesterase enriched in olfactory sensory neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** (1995) 9677-9681.

Yuan L. Wu J., Aluko R.E., Ye X., Kinetics of renin inhibition by sodium houttuynonate analogs, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70** (2006) 2275-2280.

Zhang K.Y., Card G.L., Suzuki Y., Artis D.R., Fong D., Gillette S., Hsieh D., Neiman J., West B.L., Zhang C., A glutamine switch mechanism for nucleotide selectivity by phosphodiesterases, *Mol. Cell.* **15** (2004) 279-268.

Zoraghi R., Corbin J.D., Francis S.H., Properties and functions of GAF domains in cyclic nucleotide phosphodiesterases and other proteins, *Mol. Pharmacol.* **65** (2004) 267-278.

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle meinen ganz herzlichen Dank richten an alle, die mich bei der Durchführung der Experimente sowie der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben:

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank Frau PD Dr. Elke Butt-Dörje für die Bereitstellung des Themas und des hervorragenden experimentellen Umfeldes, für Ihre vielen wertvollen Anregungen zur Verbesserung der Versuche und dieser Arbeit sowie die überaus freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich danke Herrn Professor Dr. Joseph Beavo für die Bereitstellung von Material und technischen Geräten in seinem Labor in Seattle, für die inspirierenden Gespräche über das Versuchsprotokoll sowie all seine Hilfe vor und während meines Forschungsaufenthaltes in den USA.

Herrn Professor Dr. Ulrich Walter möchte ich insbesondere danken für die Vermittlung der hervorragenden Arbeitsgruppe in seinem Institut sowie die vielen hilfreichen Ratschläge während meiner wissenschaftlichen Orientierung.

Großen Dank schulde ich auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinische Biochemie und Pathobiochemie der Universität Würzburg sowie des Departments of Pharmacology der University of Washington in Seattle. Besonders bedanke ich mich bei Herrn Dr. Thomas Hinds, Frau Dr. Xiao-Bo Tang, Frau Elfriede Schulze und Frau Petra Thalheimer für Ihren unermüdlichen Einsatz bei den kleinen und großen Problemen des Laboralltags, für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente sowie für die gute und angenehme Zusammenarbeit, welche mir über drei Jahre die Freude an der Forschung bewahrte.

Herzlichen Dank auch an die Studienstiftung des deutschen Volkes sowie den Universitätsbund Würzburg für die finanzielle Unterstützung des Projekts und der Firma Biolog für die Bereitstellung des Forschungsmaterials.

Last not least aber möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Durch Ihre liebevolle Unterstützung und Ihr großes Verständnis haben mir meine Eltern und meine Lebensgefährtin Mona auch in anstrengenden Phasen stets den Rücken freigehalten und dadurch ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Meine Geschwister Björn und Natalie sowie mein Freundeskreis und meine Bundesbrüder aus der Unitas standen mir stets mit Rat und Tat zur Seite und sorgten für die notwendige Abwechslung, um in frustrierenden Momenten neue Motivation zu schöpfen. Danke!

Lebenslauf

Heiko Poppe

***07.12.1980 in Würzburg**

Staatsangehörigkeit: Deutsch

- STUDIUM:** 10/2001 – 06/2008
Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Humanmedizin
Physikum 08/2003 (Note: sehr gut)
2. Ärztliche Prüfung 06/2008 (Note: sehr gut)
- ARBEITSERFAHRUNG:** Seit 07/2008
Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie
und Allergologie der Universität Würzburg
Assistenzarzt
- EXPERIMENTELLE DOKTORARBEIT:** 10/2004 – 02/2009
Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie, Universität Würzburg (Prof. Dr. U. Walter, PD Dr. E. Butt-Dörje)
Thema: „Cyclic nucleotide analogs as probes of signaling pathways“
- 04/2005-09/2005
Forschungsaufenthalt
Department of Pharmacology der University of Washington in Seattle, USA (Professor J. Beavo, PhD)
- PRAKTISCHES JAHR:** 02/2007 – 04/2007
Innere Medizin: Royal Melbourne Hospital, Australien
- 04/2007 – 06/2007
Innere Medizin: Royal North Shore Hospital, Sydney, Australien
- 06/2007 – 10/2007,
Chirurgie: Universitätsspital Zürich, Schweiz
- 10/2007 – 01/2008,
Dermatologie: Universitätshautklinik Würzburg
- PUBLIKATION:** **Heiko Poppe**, Sergei D. Rybalkin, Holger Rehmann, Thomas R. Hinds, Xiao-Bo Tang, Anne E. Christensen, Frank Schwede, Hans-Gottfried Genieser, Johannes L. Bos, Stein O. Doskeland, Joseph A. Beavo und Elke Butt
Cyclic nucleotide analogs as probes of signaling pathways.
Nat Methodes, 5 (2008) 277-8
- FÖRDERUNG:** 2004 – 2008
Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes