

**Kinetische und strukturelle Untersuchungen
zur Funktion ausgewählter konservierter Aminosäurereste
der katalytischen Untereinheit C α der Proteinkinase A**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Thorsten Schneider

Heidelberg, Januar 2002

**Kinetische und strukturelle Untersuchungen
zur Funktion ausgewählter konservierter Aminosäurereste
der katalytischen Untereinheit C α der Proteinkinase A**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Thorsten Schneider

Heidelberg, Januar 2002

1	EINLEITUNG	1
1.1	Proteinkinasen	1
1.1.1	Die Proteinkinase A (PKA)	4
1.1.1.1	Aktivierung und Regulation	4
1.1.1.2	Die katalytische Untereinheit $C\alpha$	7
1.1.2	Das aktive Zentrum von Proteinkinasen am Beispiel von $C\alpha$	10
1.1.3	Strukturelle Aspekte der Regulation von Proteinkinasen	16
1.2	Ziele dieser Arbeit	19
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Material	21
2.1.1	Antikörper	21
2.1.2	Bakterienstämme	21
2.1.3	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	21
2.1.4	Enzyme für molekularbiologische Arbeiten	22
2.1.5	Kits für molekularbiologische Arbeiten	23
2.1.6	Laborgeräte	23
2.1.7	Nährmedien und Medienzusätze	23
2.1.8	Peptide	24
2.1.9	Plasmide	24
2.1.10	Software	25
2.2	Mikrobiologische Methoden	25
2.2.1	Anzucht der <i>E. coli</i> -Stämme	25
2.2.2	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Stämme	26
2.2.3	Transformation bzw. Cotransformation	27
2.2.4	Anzucht von <i>E. coli</i> -Stämmen zur Expression bzw. Coexpression rekombinanter Proteine	27
2.3	Molekularbiologische Methoden	28
2.3.1	Isolierung von DNA	28
2.3.1.1	Plasmid-Präparation	28
2.3.2	DNA-Analysen	29
2.3.2.1	Konzentrationsbestimmung	29
2.3.2.2	Restriktionsspaltungen	29

2.3.2.3	Agarosegelelektrophorese	29
2.3.3	DNA-Reinigung	30
2.3.3.1	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	30
2.3.3.2	Reinigung von PCR-Produkten	31
2.3.4	Mutagenesen	31
2.3.5	DNA-Sequenzierung	32
2.3.6	Klonierungen	32
2.3.6.3	DNA-Dephosphorylierung	32
2.3.6.4	Ligation von DNA-Fragmenten	33
2.4	Biochemische und biophysikalische Methoden	34
2.4.1	Expression bzw. Coexpression rekombinanter Proteine	34
2.4.2	Präparation rekombinanter Proteine	35
2.4.2.1	Zellaufschluß	35
2.4.2.2	Reinigung der katalytischen Untereinheit C α von PKA mittels PKI(5-24)-Affinitätschromatographie	35
2.4.2.3	Reinigung von His-tag-Protein aus PKI(5-24)-Affinitätschromatographie- eluaten mittels Ni ²⁺ -Affinitätschromatographie	38
2.4.2.4	Reinigung von PKI(5-24)-Affinitätschromatographieeluaten mittels Mono-S-Ionenaustauscherchromatographie	39
2.4.3	Ankonzentrieren und Umpuffern von Proteinen	41
2.4.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	42
2.4.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
2.4.6	Coomassie-Färbung	43
2.4.7	Western Blot	43
2.4.8	Massenspektrometrische Untersuchungen	45
2.4.9	Proteinkinase-Aktivitätsassay	46
2.4.10	Isotherme Titrationscalorimetrie (ITC)	48
2.4.11	Resonant Mirror Affinography (RMA)	49
2.4.12	Kristallisationsexperimente	56
2.5	Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen	59
3	ERGEBNISSE	60
3.1	Charakterisierung von rCαF185-Mutanten	61
3.1.1	Expression und Präparation	61
3.1.2	Michaeliskonstanten für ATP und Kempfid sowie spezifische Maximalgeschwindigkeiten	65
3.1.3	Mittels Resonance Mirror Affinography (RMA) ermittelte kinetische Parameter	72

3.1.3.1	Optimierung der Liganden-Immobilisierung	73
3.1.3.2	Etablierung und Optimierung des Bindungsassays	75
3.1.3.3	Geschwindigkeits- und Dissoziationsgleichgewichtskonstanten für ATP und PKI(5-24)	76
3.1.4	Kristallisation von rC α F185W	87
3.1.4.1	Expression und Präparation von rC α F185W	87
3.1.4.2	Die Kristallstruktur von rC α F185W	89
3.2	Charakterisierung von rCαE91-Mutanten	95
3.2.1	Mutagenese der C α -DNA-Sequenz, Expression und Präparation von rC α E91-Mutanten	95
3.2.2	Spezifische Reaktionsgeschwindigkeiten	99
3.2.3	Dissoziationsgleichgewichtskonstanten für ATP und PKI(5-24)	100
3.2.4	Kristallisation von rC α E91A-His	106
3.2.4.1	Präparation von rC α E91A-His	106
3.2.4.2	Die Kristallstruktur von rC α E91A-His	109
4	DISKUSSION	114
4.1	Einblicke in die Funktion von F185	115
4.1.1	Die kinetische Analyse der rC α F185-Mutanten ergibt ein komplexes Bild	116
4.1.2	Die Mutationen F185W und F185L führen bei rC α zu einer Vielzahl von strukturellen Effekten	121
4.1.3	Zusammenfassung und Schlußfolgerung	123
4.2	Einblicke in die Funktion von E91	125
4.2.1	Die rC α E91-Mutanten zeigen eine instabile Bindung an PKI(5-24) in Gegenwart von ATP sowie drastisch verringerte Aktivitäten	126
4.2.2	Die synergistische Bindung von PKI(5-24) und ATP an die rC α E91-Mutanten scheint beeinträchtigt	126
4.2.3	Erklärungsansätze für die instabile Bindung der rC α E91-Mutanten an PKI(5-24) in Gegenwart von ATP	128
4.2.4	Strukturelle Hinweise bei rC α E91A-His für eine beeinträchtigte ATP- Bindung	129
4.2.5	Zusammenfassung und Schlußfolgerung	132
4.3	Ausblick	134

5	ZUSAMMENFASSUNG	138
6	LITERATURVERZEICHNIS	139
7	ANHANG	152
7.1	Abkürzungsverzeichnis	152
7.2	Peptidsequenzen	153
7.3	Sequenzen der verwendeten Mutagenese-Primer	154
7.4	Limits [\AA] für van der Waals-Wechselwirkungen	154
7.5	Kavitäten unterschiedlicher $C\alpha$ bzw. $rC\alpha$-Formen	154
7.6	$C\alpha$-DNA- und Aminosäuresequenz	155
7.7	Grundeinstellungen des IAsys Auto⁺	156
7.8	Scripte für RMA-Messungen	156
7.8	Plasmidkarten	165

1 EINLEITUNG

Eine fundamentale Voraussetzung für das Überleben einer Zelle stellt die Fähigkeit zur Reaktion auf äußere Einflüsse dar. Diese können z.B. in einer Veränderung der Lebensbedingungen bestehen oder auch Teil interzellulärer Kommunikation sein. Um zu einer Reaktion zu führen, die auf das entsprechende Signal abgestimmt ist, sind in Zellen verschiedene Mechanismen verwirklicht. Dazu zählt einerseits der Auf- und Abbau und andererseits die posttranslationale Modifikation von Proteinen. Die Synthese und die Degradation von Proteinen stellt einen für die Zelle energieintensiven Vorgang dar, der darüber hinaus relativ langsam und nicht reversibel ist. Daher wird dieser Mechanismus in der Regel nicht für Feinabstimmungen oder häufige und schnell erforderliche Reaktionen genutzt. In diesen Situationen bietet die posttranslationale Modifikation von Proteinen eindeutige Vorteile. Sie kann mit der erforderlichen Schnelligkeit und ggf. auch reversibel vollzogen werden. Die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung ist wohl die bislang am häufigsten zu findende posttranslationale Modifikation von Proteinen. Die Phosphorylierungsreaktion wird von Proteinkinasen und die Dephosphorylierungsreaktion von Phosphoprotein-Phosphatasen katalysiert. Vor dem skizzierten Hintergrund ist die wesentliche Bedeutung dieser Enzymfamilien für die intrazelluläre Signaltransduktion und Regulation offensichtlich.

1.1 Proteinkinasen

Im Rahmen der Untersuchung des Glykogenstoffwechsels der Leber Mitte der 50er Jahre wurde die erste Proteinkinase entdeckt und charakterisiert (Fischer and Krebs, 1955; Sutherland and Wosilait, 1955; Fischer and Krebs, 1956). Es handelte sich hierbei um das Enzym Phosphorylase-Kinase. Im Laufe weiterer Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet wurde die Bedeutung von cAMP erkannt, welches als Signalvermittelndes Molekül zwischen spezifischen Hormonen und dem Glykogenmetabolismus fungiert (Rall and Sutherland, 1958). Das schließlich hieraus abgeleitete Konzept der Signaltransduktion durch second messenger (Sutherland and Robinson, 1966) gewann zunehmend an Bedeutung, so daß die cAMP-vermittelte Zellantwort heute als das am besten beschriebene second messenger-System in eukaryotischen Zellen gilt.

Die cAMP-abhängige Proteinkinase (cAPK) oder auch Proteinkinase A (PKA) spielt bei diesem Signaltransduktionssystem eine zentrale Rolle. 1968 konnten Walsh, Perkins und Krebs zeigen, daß durch den intrazellulären Anstieg von cAMP eine Proteinkinase aktiviert wird, die wiederum die Phosphorylase-Kinase aktivierend phosphoryliert. Damit war - zehn Jahre nach der Entdeckung der Phosphorylase-Kinase - PKA die zweite

beschriebene Proteinkinase. Darüber hinaus wurde bei der weiteren Charakterisierung von PKA erkannt, daß es sich hierbei um ein multifunktionelles Schlüsselenzym handelt, dem große Bedeutung bei der Signaltransduktion zur Regulation der Zelle zukommt (Zetterqvist *et al.* 1990). Nach Aktivierung durch Anstieg des cAMP-Spiegels phosphoryliert dieses Enzyms verschiedenste Substrate. Zu diesen zählen Komponenten des Metabolismus (Walsh and Van-Patten, 1994), der Transkription (Yamamoto *et al.*, 1988; Brindle *et al.*, 1995), des Zellzyklus (Grieco *et al.*, 1994) und der Apoptose (Gjertsen and Doskeland, 1995).

Heute bilden Proteinkinasen eine der größten Familien homologer Proteine in höheren Zellen und die Phosphorylierung durch Proteinkinasen sowie die Dephosphorylierung durch Phosphoprotein-Phosphatasen gilt als universeller Regulationsmechanismus (Fischer, 1983; Krebs, 1989; Hunter, 1995). Bei entsprechend vielen Signalübertragungsprozessen in eukaryotischen Zellen spielt die Phosphorylierung von Schlüsselenzymen eine wichtige Rolle. Durch die genannte Modifikation kann das extrazelluläre Signal nicht nur in der Zelle weitergeleitet, sondern auch durch Kaskaden verstärkt werden. Eine präzise Regulation von Proteinkinasen ist daher unerlässlich. Fehlfunktionen der Mitglieder dieser Enzymklasse führen in vielen Fällen zu einem unkontrolliertem Zellwachstum (Bishop, 1987; Pawson and Hunter, 1994).

Proteinkinasen lassen sich nach ihrer Spezifität für den zu phosphorylierenden Aminosäurerest in die Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen (S/T-Kinasen) und in die Gruppe der Tyrosin-Kinasen (Y-Kinasen) einteilen (Taylor *et al.*, 1995; Carrera *et al.*, 1994), wobei auch dualspezifische Proteinkinasen (S/T/Y-Kinasen) bekannt sind (Douville *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1994).

Bezüglich ihrer Substratspezifität, der Regulation und des Aktivierungsmechanismus zeigen Proteinkinasen eine starke Diversität. So hängt die Substratspezifität nicht nur von dem zu phosphorylierenden Aminosäurerest ab, sondern es nehmen auch Aminosäurereste Einfluß, die in der Sequenz vor oder hinter der Phosphorylierungsstelle liegen. Bei den Zyklin-abhängigen Proteinkinasen ist dies ein Prolin (Songyang *et al.*, 1994), bei Caseinkinasen sind es saure Aminosäurereste (Songyang *et al.*, 1996) und bei der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase und PKA basische Aminosäurereste (White *et al.*, 1998 bzw. Kemp *et al.*, 1977; Zetterqvist *et al.*, 1990). Abgesehen von der direkt durch die Phosphorylierungsstelle bedingten Substratspezifität kommt es darüber hinaus oftmals zu hochaffinen Wechselwirkungen zwischen einem Teil der Proteinkinase und einer kurzen Sequenz des Substrates. Diese sogenannten docking sites der Substrate (wie z.B. SH3-Domänen oder Prolinreiche Regionen) beeinflussen wesentlich die Substratwahl von Proteinkinasen in der Zelle (Holland and Cooper, 1999).

Die Regulation von Proteinkinasen kann entweder über intermolekulare Interaktionen mit entsprechenden zusätzlichen Untereinheiten oder auch über intramolekulare Wechselwirkungen mit autoinhibitorischen Domänen gewährleistet werden. Die

Aktivierung erfolgt häufig durch Binden eines sekundären Botenstoffes (z.B. cAMP, Ca^{2+}) oder durch (Auto-)Phosphorylierung eines entsprechenden Aminosäurerestes des Aktivierungssegmentes, so daß das aktive Zentrum für Substrate zugänglich wird und die für die Katalyse optimale Konformation einnimmt (Johnson *et al.*, 1996). Die Regulation von Proteinkinasen durch Lokalisation spielt ebenfalls eine wesentliche Rolle. So können die Enzyme z.B. direkt durch Wechselwirkung mit Membranen oder Elementen des Cytoskeletts oder indirekt durch die Assoziation mit spezifischen Ankerproteinen in bestimmten Zellkompartimenten in die Nähe des Substrates gebracht werden. Durch die Regulation der Ankerproteine wiederum ist so eine signalvermittelte Änderung der Lokalisation und eine verstärkte Aktivität der Proteinkinase z.B. an der Zellmembran oder im Zellkern möglich (Mochly-Rosen, 1995; Faux and Scott, 1996). Darüber hinaus kann die Expression einer bestimmten Proteinkinase in verschiedenen Zelltypen und zu verschiedenen Zeiten der Zellentwicklung stark variieren.

Trotz aller Unterschiede bezüglich Substratspezifität, Regulation und Aktivierung zeigen die eukaryotischen S/T-, Y- und S/T/Y-Kinasen einen hohen Homologiegrad im katalytischen Kern (Hanks *et al.*, 1988; Krebs, 1985). Diese Domäne, die je nach Proteinkinase aus ca. 250 bis 300 Aminosäuren besteht, bindet Substrat und Cosubstrat und katalysiert die Phosphorylierungsreaktion. Bestimmte Sequenzunterschiede in diesem Bereich sind für die Spezifität für Serin-/Threonin- oder Tyrosinreste verantwortlich (Hanks *et al.*, 1988; Hubbard and Till, 2000). Aufgrund einer vergleichenden Analyse der Aminosäuresequenzen bekannter Proteinkinasen wird der katalytische Kern in 12 Subdomänen gegliedert, die durch weniger konservierte Sequenzen getrennt werden (Hanks and Quinn, 1991). Diese enthalten abhängig von der jeweiligen Proteinkinasespezies Deletionen oder Insertionen. Außerhalb des katalytischen Kerns schließen sich sowohl N- als auch C-terminal regulatorische Domänen an. Durch diese Bereiche, die innerhalb einer Subfamilie Ähnlichkeiten in der Sequenz aufweisen können, aber im Vergleich mit anderen Subfamilien keine Homologie zeigen, werden die individuellen Eigenschaften von Proteinkinasen begründet. Diese Regionen sorgen zusammen mit einigen Resten des katalytischen Kerns für die Substratspezifität der Proteinkinase und für die Interaktion mit allosterischen Regulatoren (z.B. second messenger) oder Regulatorproteinen (z.B. Calmodulin, regulatorische Untereinheiten). Darüber hinaus können sie durch die Assoziation mit bestimmten Zellkomponenten (z.B. Membranen, Zellgerüst) oder über in der Sequenz enthaltene Kerntransportsignale für die subzelluläre Lokalisation sorgen. Ebenfalls bekannt ist, daß Teile dieser Bereiche Pseudosubstratsequenzen darstellen können, wodurch eine Autoinhibition der jeweiligen Proteinkinase bewirkt werden kann (Kemp and Pearson, 1991).

Wesentliche Erkenntnisse zum Verständnis von Proteinkinasen wurden anhand von Untersuchungen der Proteinkinase A gewonnen. Darüber hinaus kommt diesem Enzym eine zentrale Bedeutung bei einer Fülle von Signaltransduktions- und

Regulationsprozessen in eukaryotischen Zellen zu. Daher werden im Folgenden sowohl Proteinkinase-typische, als auch individuelle Eigenschaften dieses Enzyms beschrieben.

1.1.1 Die Proteinkinase A (PKA)

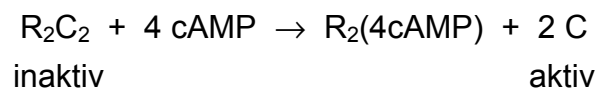
Die cAMP-abhängige Proteinkinase oder Proteinkinase A (PKA), welche in allen bislang untersuchten Gewebearten vorkommt, gilt heute als eine der am besten erforschten Proteinkinasen. Sie dient aus verschiedenen Gründen als Modellenzym bzw. als Prototyp für das Verständnis der generellen Funktionsweise der gesamten Enzymfamilie. Zu diesen Gründen zählen der historische Stellenwert sowie die zentrale Bedeutung dieses Proteins hinsichtlich der Signaltransduktion eukaryotischer Zellen. Ein anderer wesentlicher Aspekt ist die Möglichkeit der getrennten Charakterisierung der katalytischen und regulatorischen Domäne, da diese Bereiche auf verschiedenen Untereinheiten lokalisiert sind, die ggf. voneinander zu trennen sind. Darüber hinaus ist die katalytische Untereinheit mit 350 Aminosäuren (ca. 41 kDa) im Vergleich zu anderen Proteinkinasen nur wenig größer als der Bereich ihres konservierten katalytischen Kerns, der sich von den Aminosäuren 40 bis 300 erstreckt (siehe Abb.: 1.1). Dies erleichtert eine Untersuchung dieser Region ohne wesentliche Beeinflussung durch Effekte, die ihren Ursprung außerhalb des katalytischen Kerns haben. Hinzu kommt, daß die enzymatische Aktivität von $C\alpha$ im Gegensatz zu anderen Proteinkinasen unabhängig von weiteren Effektoren ist und daß nach Klonierung der zugehörigen DNA-Sequenzen aus unterschiedlichen Spezies (Uhler *et al.*, 1986a; Roth *et al.*, 1990; Wiemann *et al.*, 1991b; Wiemann *et al.*, 1992; Maeda *et al.*, 1994; Melendez *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 1995; Saito-Ito *et al.*, 1995; Clegg *et al.*, 1988; Olsen and Uhler, 1991a; Olsen and Uhler, 1991b) eine rekombinante Expression sowohl von $C\alpha$ als auch von den entsprechenden Regulatoren in *E. coli* möglich ist. Auf diese Weise kann $C\alpha$ zum einen frei von Kontaminationen durch endogene Proteinkinasen gewonnen werden, da *E. coli* eine PKA-homologe Proteinkinase nicht exprimiert, und zum anderen mit einer relativ hohen Ausbeute präpariert werden. Im übrigen ist durch die Klonierungen die Option gegeben, Mutanten herzustellen.

1.1.1.1 Aktivierung und Regulation

Durch die Bindung extrazellulärer Botenstoffe an den entsprechenden spezifischen Rezeptoren erfolgt zunächst die Aktivierung der Adenylylcyclase, die Teil eines membranständigen Multikomponentensystems ist (Reithmann *et al.*, 1990; Iwami *et al.*,

1995). Hierdurch wird die Bildung von cAMP aus ATP katalysiert, wodurch es zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration kommt (Krupinski, 1991; Iwami *et al.*, 1995).

Das PKA-Holoenzym besteht aus zwei regulatorischen Untereinheiten (R) und zwei katalytischen Untereinheiten (C). In Gegenwart eines erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegels werden vier Moleküle cAMP an den regulatorischen Untereinheiten gebunden. Hierdurch dissoziiert das Holoenzym zu einem Dimer der regulatorischen Untereinheiten und zu zwei freien aktiven katalytischen Untereinheiten (Gill and Garren, 1969).



Auf diese Weise wird die Phosphorylierung der PKA-Substrate ermöglicht, bei der die γ -Phosphatgruppe von ATP kovalent auf die Hydroxylgruppe eines Serin- oder Threoninrestes unter Bildung eines Phosphatesters übertragen wird. Die phosphorylierbaren Serin- oder Threoninreste sind dabei Bestandteil der Konsensussequenz R-R-X-S/T-Y, wobei X für eine beliebige und Y für eine hydrophobe Aminosäure steht (Kemp *et al.*, 1977; Zetterqvist *et al.*, 1990). Durch diese Phosphorylierungsreaktionen wird der Fortlauf der Signalkaskade gewährleistet, so daß die vielfältigen Zellantworten auf die entsprechenden extrazellulären Signale zustande kommen können.

Sowohl von der katalytischen als auch von der regulatorischen Untereinheit sind verschiedene Isoformen bekannt. Für die katalytische Untereinheit sind die genetisch codierten Formen C α , C β und C γ beschrieben (Shoji *et al.*, 1981; Uhler *et al.*, 1986b; Beebe *et al.*, 1990), wobei vom Typ β bisher die zusätzlichen Splicevarianten C β 2 und C β 3 gefunden wurden (Wiemann *et al.*, 1991a; Qi *et al.*, 1996; Guthrie *et al.*, 1997). Das C α -Protein wird in fast allen Geweben exprimiert und gilt als die am besten untersuchte Isoform. Dagegen zeigen die C β -Formen eine größere Gewebsspezifität (Thullner *et al.*, 2000), während C γ bisher sogar nur in humanem Hodengewebe nachgewiesen wurde (Beebe *et al.*, 1990).

Neben den im Folgenden näher beschriebenen Inhibitoren/Regulatoren spielt bei der Aktivierung und Regulation von PKA - wie auch vieler anderer Proteinkinasen - eine Phosphorylierung eines Restes im sogenannten Aktivierungssegment eine wesentliche Rolle. Dieser Aspekt wird unter 1.1.3 aufgegriffen.

Die regulatorischen Untereinheiten

Von der regulatorischen Untereinheit sind die Isoformen RI α , RI β , RII α und RII β bekannt (Takio *et al.*, 1982; Lee *et al.*, 1983; Jahnsen *et al.*, 1986; Scott *et al.*, 1987; Clegg *et al.*, 1988; Sandberg *et al.*, 1988). Von RI α wurden darüber hinaus noch weitere regulatorische Untereinheiten gefunden, die durch alternative mRNA-Prozessierung entstehen (Solberg *et al.*, 1997). Alle regulatorischen Untereinheiten binden die katalytischen Untereinheiten bei subnanomolaren Konzentrationen ($K_I = 0,2 - 0,3$ nM). Ein grundlegender Unterschied zwischen den RI- und den RII-Untereinheiten ist, daß die RI-Formen Pseudosubstrate darstellen, während die RII-Formen echte Substrate sind, die von den katalytischen Untereinheiten phosphoryliert werden können. Nach dieser Phosphorylierung kommt es jedoch trotz einer Verringerung der Affinität um eine Größenordnung nicht zu einer sofortigen Dissoziation, da alle R-Untereinheiten über den katalytischen Kern hinaus auch mit anderen Bereichen der katalytischen Untereinheiten interagieren. Ein weiterer Unterschied besteht darin, daß die Entstehung des Komplexes aus katalytischer Untereinheit, RI-Untereinheit und ATP einem Synergismus unterliegt (Herberg and Taylor, 1993). Darüber hinaus zeigen die Isoformen der R-Untereinheiten vom Typ I und II eine unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation. Während RI-Untereinheiten hauptsächlich frei im Cytoplasma zu finden sind, sind mehr als 75 % der in einer Zelle nachweisbaren RII-Untereinheiten über A-Kinase-Ankerproteine (AKAPs) an cytoplasmatische Strukturen und Organellen gebunden (Rubin, 1994; Scott and McCartney, 1994). Neben der Regulation der katalytischen Aktivität durch Inhibition zeigt sich hier ein Regulationsmechanismus, der durch Lokalisation der katalytischen Untereinheiten Einfluß auf die Selektivität der zellulären Antwort nimmt. Nach Aktivierung des Holoenzym kommt es so zu einer bevorzugten Phosphorylierung von Substraten in unmittelbarer Umgebung (Klauck *et al.*, 1996).

Die Dimerisierung erfolgt bei den R-Untereinheiten durch Interaktion der N-Termini, wobei vermutet wurde, daß sich nur Homodimere bilden können. Tasken *et al.* konnten allerdings 1993 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Heterodimere aus RI α und RI β nachweisen. Auch die biochemischen Eigenschaften der R-Untereinheiten unterscheiden sich kaum voneinander bis auf die Tatsache, daß die RI β -Untereinheit im Vergleich zu den anderen Untereinheiten sensitiver gegenüber cAMP ist. Auf diese Weise dissoziiert das entsprechende Holoenzym schon bei geringem Anstieg der cAMP-Konzentration, so daß eine frühe Reaktion auf den second messenger ermöglicht wird (Cadd *et al.*, 1990).

Die Regulation einzelner Isoformen der R-Untereinheiten kann wiederum u.a. der Aktivität der katalytischen Untereinheiten unterliegen. So besteht zwischen RI α und den C-Untereinheiten ein negativer Rückkopplungsmechanismus. Bei einer erhöhten

Konzentration an katalytischen Untereinheiten wird von diesen auch verstärkt der Transkriptionsfaktor CREB phosphoryliert. Dieser wiederum sorgt durch diese Aktivierung für eine verstärkte Expression von $R\alpha$ und damit für eine Inhibition der katalytischen Untereinheiten (Boshart *et al.*, 1991, Nowak *et al.*, 1987; Tasken *et al.*, 1991). Darüber hinaus zeigt die $R\alpha$ -Untereinheit in der Zelle einen höheren Umsatz als andere R-Untereinheiten, wodurch eine Pufferwirkung auf die katalytische Aktivität der C-Untereinheiten ermöglicht wird (Splauding, 1993).

Der Proteinkinaseinhibitor (PKI)

Ein weiteres Regulatorprotein der katalytischen Untereinheiten ist der hitzestabile Proteinkinaseinhibitor (PKI). Von diesem relativ kleinen (ca. 8 kDa) Protein sind die Isoformen α , $\beta 1$ und $\beta 2$ bekannt (Olsen and Uhler, 1991; Scarpetta and Uhler, 1993; Van Patten *et al.*, 1991). Wie bei der RI-Untereinheit kommt es bei diesem Inhibitor zusammen mit MgATP zu einer synergistischen Bindung. Die inhibitorischen Konstanten von PKI und RI sind dabei ebenfalls vergleichbar ($K_i\text{PKI} = 0,2 \text{ nM}$, $K_i\text{RI} = 0,2 - 0,3 \text{ nM}$). Wesentlich beteiligt an der inhibitorischen Komplexbildung sind seitens PKI die Aminosäuren 5 bis 24, die u.a. eine Pseudosubstratsequenz enthalten (Herberg and Taylor, 1993; Whitehouse and Walsh, 1983).

Der Proteinkinaseinhibitor ermöglicht zum einen, im Gegensatz zu den R-Untereinheiten, eine cAMP-unabhängige Regulation der C-Untereinheiten. Zum anderen trägt er ein Exportsignal, so daß die gebundene katalytische Untereinheit aus dem Kern transportiert wird (Fantozzi *et al.*, 1994) und damit die Expression cAMP-regulierter Gene aufgehoben werden kann. Da die Expression und Lokalisation von PKI zellzyklusabhängig ist (Wen *et al.*, 1995), wird vermutlich der Einfluß der cAMP-abhängigen Proteinkinase auf den Zellzyklus über PKI reguliert.

1.1.1.2 Die katalytische Untereinheit $C\alpha$

Wie bereits in anderem Zusammenhang erwähnt, besteht die katalytische Untereinheit $C\alpha$ aus 350 Aminosäuren (ca. 41 kDa) und ist damit nur wenig größer als ihr hochkonservierter katalytischer Kern, der den Bereich von Aminosäure 40 bis 300 umfaßt (siehe Abb. 1.1). Diese Region ist N- und C-terminal von Bereichen umgeben, die innerhalb der Proteinkinase-Familie nicht konserviert sind.

Der N-Terminus trägt eine **Myristylierung**, d.h. der N-terminale Glycinrest bildet eine Amidbindung mit der gesättigten C14-Fettsäure aus. Verantwortlich für diese cotranslationale Modifikation, die bei vielen eukaryotischen Proteinen bekannt ist

(Towler *et al.*, 1988; James and Olson, 1990), ist die N-Myristyltransferase (Wilcox *et al.*, 1987). Wie aus der Kristallstruktur von nativem $C\alpha$ hervorgeht, ist die Myristylsäure in einer hydrophoben Tasche, die u.a. von Resten der im N-terminalen Bereich liegenden amphipatischen A-Helix (S10 - E31) gebildet wird, lokalisiert (Bossemeyer *et al.*, 1993; Zheng *et al.*, 1993). Diese Modifikation trägt offenbar zur Erhöhung der thermischen Stabilität von $C\alpha$ bei (Yonemoto *et al.*, 1993). Darüber hinaus scheint sie keinen Einfluß auf die Aktivität der katalytischen Untereinheit bzw. die Inhibition durch PKI zu haben. Neuere Untersuchungen stützen die Vermutung, daß die Fettsäure zu einer Membranassoziation führen könnte. Gangal *et al.* konnten 1999 eine solche Assoziation bei gleichzeitiger Bindung der katalytischen Untereinheit an RII nachweisen.

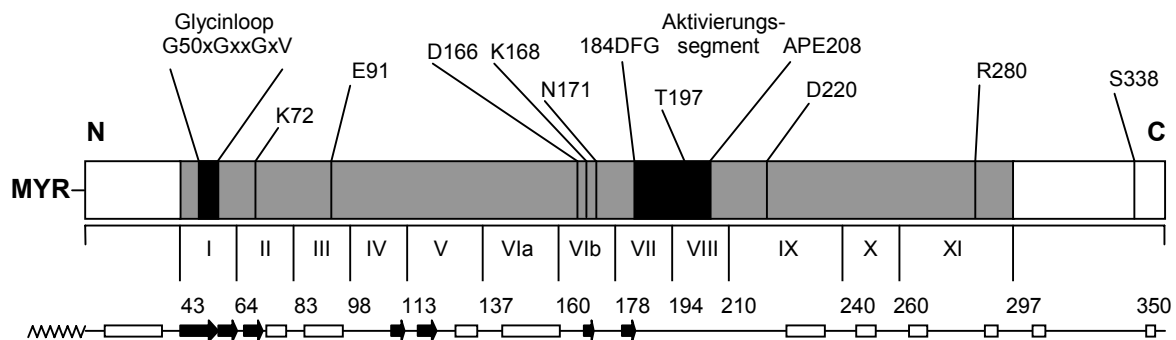


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von $C\alpha$ (nach Engh and Bossemeyer, 2001)

Der schraffierte Bereich zwischen dem N- und C-terminalen Bereich (N bzw. C) repräsentiert den konservierten katalytischen Kern mit einigen hochkonservierten bzw. invarianten Aminosäureresten. Der Glycinloop und das Aktivierungssegment sind schwarz dargestellt. Die Numerierung der konservierten Subdomänen (römische Ziffern) basiert auf dem Sequenzvergleich von Hanks und Quinn (1991), wobei die arabischen Ziffern den jeweiligen Aminosäureabschnitt der Domänen definieren. Darunter sind die der Primärstruktur entsprechenden Elemente der Sekundärstruktur zu erkennen, wobei α -Helices als helle Rechtecke und die β -Faltblattstrukturen als schwarze Pfeile dargestellt sind. Die Myristylsäure (MYR) wird durch eine Zickzack-Linie repräsentiert.

Neben der Myristylierung zeigt ca. ein Drittel von aus Gewebe isoliertem $C\alpha$ -Protein eine weitere Modifikation am N-Terminus. Der Rest Asparagin an Position zwei ist zu Aspartat deamidiert (Jedrzejewski *et al.*, 1998). Die physiologische Bedeutung dieser posttranslationalen **Deamidierung** ist noch unklar. Es konnte allerdings gezeigt werden, daß sie Einfluß auf die intrazelluläre Verteilung der katalytischen Untereinheit hat (Girod *et al.*, 1997; Pepperkok *et al.*, 2000).

Über die gesamte Aminosäuresequenz der katalytischen Untereinheit sind neben den bisher beschriebenen Modifikationen vier **Phosphorylierungsstellen** verteilt. Es handelt sich dabei um die Aminosäurereste Serin 10, Serin 139, Threonin 197 und

Serin 338. Sie werden bei rekombinanter Expression des Enzyms in *E. coli* von der katalytischen Untereinheit autokatalytisch phosphoryliert (Yonemoto *et al.*, 1997). Das native Enzym trägt Phosphorylgruppen an den Resten Threonin 197 und Serin 338. Der Threoninrest 197 befindet sich im sogenannten Aktivierungssegment, das wiederum im Herzen des katalytischen Kerns lokalisiert ist. Die Phosphorylgruppe dieses Restes spielt eine essentielle Rolle für die katalytische Aktivität, da sie Einfluß auf die korrekte Orientierung der katalytischen Reste des aktiven Zentrums sowie auf die Bindung des Protein- bzw. Peptidsubstrates nimmt (Adams *et al.*, 1995; Girod *et al.*, 1996; Yonemoto *et al.*, 1997; Engh and Bossemeyer, 2001). Auf die strukturelle Bedeutung dieser Phosphorylierung wird unter 1.1.3 ausführlicher eingegangen. Der zweite Phosphorylgruppen-tragende Rest des nativen Enzyms (S338) liegt außerhalb des katalytischen Kerns im nicht konservierten C-terminalen Bereich. Dieser enthält eine Häufung saurer Aminosäuren, die an der Substrat-/Pseudosubstraterkennung beteiligt sind (Chestukhin *et al.*, 1996). Die Phosphorylierung am Serinrest 338 beeinflußt möglicherweise die Löslichkeit von C α und die Stabilität des C-Terminus (Steinberg, 1991; Yonemoto *et al.*, 1997).

Die weiteren bisher durchgeführten Arbeiten zur Charakterisierung der katalytischen Untereinheit C α sollen im Folgenden nur kurz skizziert werden. So wurden u.a. die Interaktionen mit den regulatorischen Untereinheiten und dem Proteinkinaseinhibitor (PKI), bzw. dem synthetischen Peptid PKI(5-24) (Herberg and Taylor, 1993; Gibson *et al.*, 1997a/b; Gibson and Taylor, 1997; Baude, *et al.*, 1995; Cox and Taylor, 1994; Wen and Taylor, 1994) sowie der intrazelluläre Translokationsmechanismus untersucht (Picciolo, 2001). Daneben wurden u.a. die Michaelis-Konstanten für ATP und Peptid-Substrate bestimmt (Cook *et al.*, 1982; Whitehouse *et al.*, 1983) sowie Untersuchungen zur Substratspezifität durchgeführt (Zetterqvist *et al.*, 1990). Darüber hinaus finden sich in der Literatur Arbeiten zur Abhängigkeit der Katalyse vom pH-Wert (Adams and Taylor, 1993a; Qamar and Cook, 1993; Yoon and Cook, 1987) und von zweiwertigen Metallionen (Cook *et al.*, 1982; Qamar *et al.*, 1992; Kong and Cook, 1988; Adams and Taylor, 1993b) ebenso wie zur Erforschung des eigentlichen Reaktionsmechanismus bzw. des geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschrittes (Adams and Taylor, 1992; Grant and Adams, 1996; Lew *et al.*, 1997; Zhou and Adams, 1997a; Zhou and Adams, 1997b). Ergänzend hierzu wurden Mutagenesestudien am katalytischen Kern durchgeführt, um die Bedeutung einzelner Aminosäurereste zu hinterfragen. Dabei richtete sich das Interesse u.a. auf den sogenannten Glycinloop (Hemmer *et al.*, 1997; Girod, 1997; Grant *et al.*, 1998; Aimes *et al.*, 2000) und die aktivierende/regulierende Phosphorylierungsstelle am Rest Threonin 197 (Adams *et al.*, 1995; Yonemoto *et al.*, 1997). Andere Arbeiten untersuchten die an den Interaktionen mit den regulatorischen Untereinheiten und dem Proteinkinaseinhibitor (PKI) beteiligten Reste (Gibson and

Taylor, 1997; Wen and Taylor, 1994; Baude *et al.*, 1994a; Baude *et al.*, 1994b). Darüber hinaus konnte bereits dem im Herzen des katalytischen Kerns im sogenannten katalytischen Loop lokalisierten konservierten Rest Glutamat 170 Einfluß auf die Substraterkennung nachgewiesen werden (Tomoda *et al.*, 1993). Weitere Mutanten sind von C α -homologer TPK1 aus Hefe beschrieben (Gibbs and Zoller, 1991a/b; Gibbs *et al.*, 1992). Diese konnten aber nur in Zellhomogenaten charakterisiert werden.

1.1.2 Das aktive Zentrum von Proteinkinasen am Beispiel von C α

Die **Gesamtarchitektur** von nativem C α -Protein aus Schweineherz im ternären Komplex mit dem ATP-Analogon Adenylyl Imidodiphosphat (AMP-PNP) und dem Inhibitorpeptid PKI(5-24) (Bossemeyer *et al.*, 1993) stellt sich dar als ein kleiner Lobus, der hauptsächlich aus N-terminalen Aminosäureresten besteht, und als großer Lobus, der vorwiegend aus C-terminalen Aminosäureresten gebildet wird (siehe Abb. 1.2).

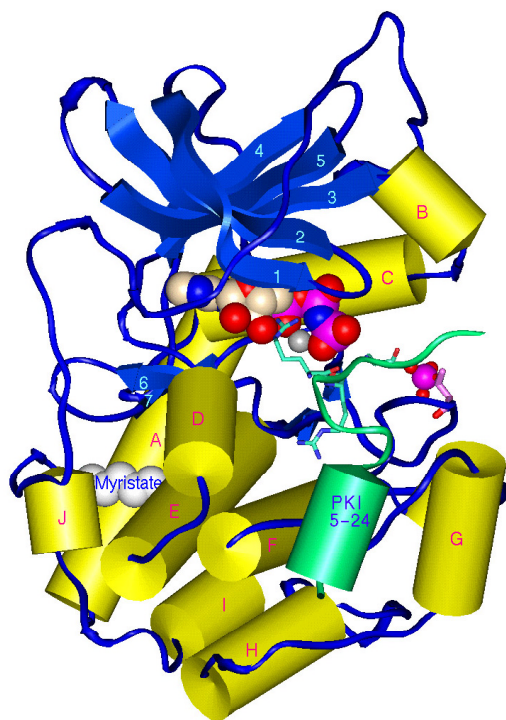


Abb. 1.2 Gesamtstruktur der nativen katalytischen Untereinheit C α aus Schweineherz im ternären Komplex mit PKI(5-24) und MnAMP-PNP (Bossemeyer *et al.*, 1993; Auflösung 2,0 Å)

Das Protein- bzw. Peptidrückgrat ist in der tube-Darstellung gezeigt. β -Faltblattstrukturen sind als Pfeile, α -helicale Strukturen als Zylinder zu erkennen. PKI(5-24) ist grün dargestellt. Für die Reste R14 und R15 des Inhibitorpeptids sowie für den phosphorylierten Rest T197 von C α wurde die stick-Darstellung gewählt. Das ATP-Molekül und die Myristylsäure sind als Klottenmodelle dargestellt.

Während der kleine Lobus hauptsächlich Faltblatt-Strukturen aufweist, wird der große Lobus durch helicale Strukturen geprägt. Beide Loben bilden einen Spalt. Das Nukleotid ist im Inneren des Spalts so positioniert, daß nur die γ -Phosphorylgruppe zum Eingang des Spalts gerichtet ist. Hier lagert sich das Pseudosubstrat an.

Die **Bindung des Nukleotids** (siehe Abb. 1.3) erfolgt über zahlreiche hydrophobe und ionische Wechselwirkungen sowie über Wasserstoffbrücken. Daran beteiligt sind hochkonservierte bzw. invariante Reste von $C\alpha$ und Reste des Pseudosubstrates. Darüber hinaus spielen Wassermoleküle (nicht gezeigt) und zwei Metallionen bei der Nukleotidbindung eine Rolle.

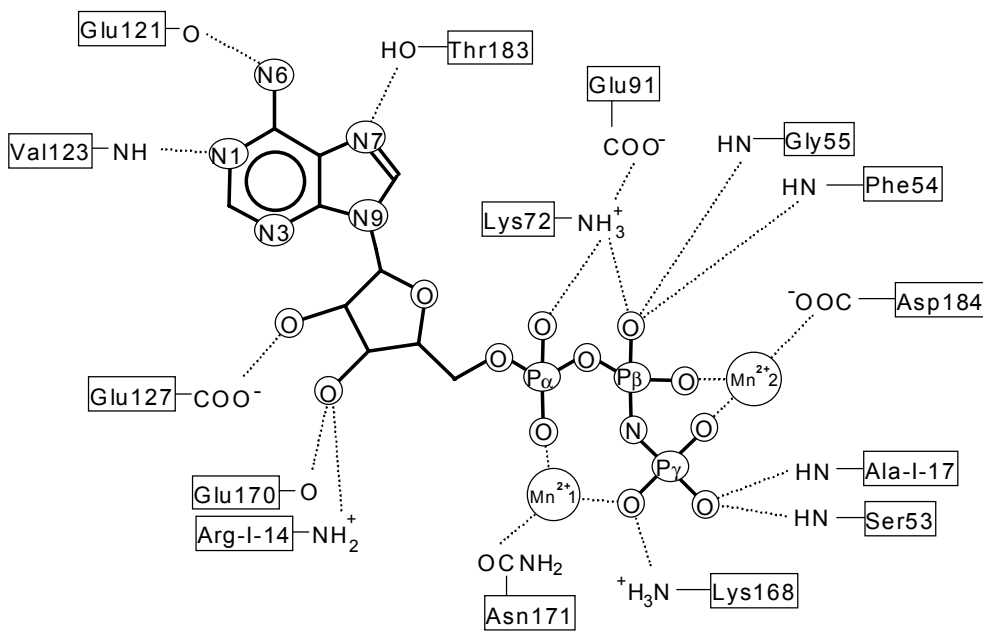


Abb. 1.3: Schematische Darstellung von Wechselwirkungen zwischen $C\alpha$, MnAMP-PNP und PKI(5-24) (nach Bossemeyer *et al.*, 1993)

Arg-I-14 und Ala-I-17 stellen Aminosäurereste des Inhibitorpeptids PKI(5-24) dar.

Die Puringruppe des Nukleotids unterliegt hydrophoben Interaktionen mit konservierten Resten und bildet Wasserstoffbrückenbindungen zu Hauptketten- und Seitenkettenatomen aus. Die Affinität des Nukleotids zum Gesamtkomplex wird vermutlich hauptsächlich durch den Adenosinanteil sowie die α - und β -Phosphorylgruppe bestimmt, da Bindungsstudien vergleichbare Dissoziationsgleichgewichtskonstanten für ATP, ADP und Adenosin liefern (Cook *et al.*, 1982). Die Triphosphatgruppe und damit die γ -Phosphorylgruppe wird u.a. durch Wechselwirkung des invarianten Lysinrestes 72 mit den Sauerstoffatomen der α - und β -Phosphorylgruppen in eine für die Katalyse günstige Position gebracht. Die essentielle Bedeutung des genannten Aminosäurerestes für die Katalyse wird durch Untersuchungen belegt, bei denen ein Austausch dieses Restes gegen Alanin bei der

C α -homologen TPK1 erfolgte. Die so hergestellten Mutanten waren fast vollständig inaktiv (Gibbs and Zoller, 1991b).

Neben den bisher beschriebenen Wechselwirkungen der Triphosphatgruppe mit der katalytischen Untereinheit kommt es zu weiteren Interaktionen durch die Komplexbildung von zwei zweiwertigen Metallionen, bei denen es sich *in vivo* in der Regel um Mg²⁺ handeln dürfte. Unterschieden wird hier zwischen dem für die enzymatische Aktivität essentiellen Metallion M2 (Mn²⁺ in Abb. 1.3) und dem sogenannten inhibitorischen Metallion M1 (Mn²⁺ in Abb. 1.3).

M2 wird von zwei Wassermolekülen (nicht gezeigt) sowie von den Sauerstoffatomen der β - und γ -Phosphorylgruppen koordiniert. Darüber hinaus geht es um Interaktionen mit den Sauerstoffatomen der Carboxylatgruppe des Aspartatrestes 184 ein. Dieser invariante Aminosäurerest ist für die Katalysereaktion essentiell. Gibbs *et al.* konnten 1992 zeigen, daß eine Alaninmutante dieses Restes bei C α -homologer TPK1 keine katalytische Aktivität mehr aufweist. Vermutet wird, daß Aspartat 184 über das essentielle Metallion eine Rolle bei der Positionierung der β - und γ -Phosphorylgruppen des Nukleotids spielt.

Die Bindung des zweiten sogenannten inhibitorischen Metallions M1 (Mn²⁺ in Abb. 1.3) ist von geringerer Affinität als die des essentiellen Metallions und erfolgt daher bei höheren Metallionenkonzentrationen. Während bei der essentiellen hochaffinen Bindungsstelle mehr als 90 % der Bindungsstellen bei einer Magnesiumkonzentration von 5 mM besetzt sind, liegt diese Situation bei der niedrigaffinen Bindungsstelle erst bei einer Magnesiumkonzentration von 30 mM vor (Adams and Taylor, 1993b). Die Interaktion zwischen dem inhibitorischen Metallion und C α erfolgt u.a. durch die Sauerstoffatome der α - und γ -Phosphorylgruppe und durch die Säureamidgruppe des Asparaginrestes 171. Durch diese Wechselwirkungen wird die katalytische Aktivität um ca. 80 % verringert (Adams and Taylor, 1993b) und gleichzeitig die Thermostabilität erhöht (Herberg *et al.*, 1999). Die Bedeutung des Restes Asparagin 171 liegt möglicherweise in einem Einfluß auf die hypothetische katalytische Base Aspartat 166, auf die weiter unten eingegangen wird. Expressionsversuche von Asparagin 171-Mutanten verliefen bislang erfolglos (Girod, 1997).

Ebenfalls von Bedeutung bei der Nukleotidbindung ist der sogenannte Glycinloop. Dieses Element liegt bei Proteinkinasen in der Konsensussequenz Y-G50-X-G52-X-X-G55-X-V57 (Numerierung nach C α -Sequenz; Y = hydrophober Rest, X = beliebiger Rest) vor und bildet im kleineren Lobus der katalytischen Untereinheit durch die Sekundärstruktur β -Strang 1-Turn- β -Strang 2 eine Schleife. Diese kann durch die Primärstruktur als flexible Klappe oberhalb des gebundenen Nukleotids fungieren, ohne daß es zu sterischen Konflikten kommt (Bossemeyer, 1994). Der Grund für die Konserviertheit der Glycinreste im Glycinloop wurde mit Hilfe von Mutagenesestudien untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Serin-Mutanten von Glycin 50 und 52 Defekte

sowohl bei der ATP- und Substratbindung als auch in der enzymatischen Aktivität aufweisen. Möglicherweise übernimmt Glycin 52 eine Funktion bei der Positionierung von Serin 53, das wiederum durch seine Hauptkettenamidgruppe einen für die Katalyse essentiellen Kontakt zur γ -Phosphorylgruppe des Nukleotids herstellt (Grant *et al.*, 1998). Glycin 55 könnte für die Flexibilität des Loops erforderlich sein (Girod, 1997); die Mutation von Glycin 55 zu Serin zeigte keinen Effekt bei der Nukleotidbindung (Grant *et al.*, 1998).

Wechselwirkungen der katalytischen Untereinheit $C\alpha$ mit **Substraten bzw. Pseudosubstraten** können ebenfalls durch Daten der Kristallstrukturanalyse beschrieben werden (Bossemeyer *et al.*, 1993; Madhusudan *et al.*, 1994). Eine wesentliche Rolle bei diesen Interaktionen spielen die innerhalb der S/T-Kinase-Familie konservierten Reste Glutamat 127, Glutamat 170 und Glutamat 230. Gibbs und Zoller (1991a) konnten zeigen, daß die entsprechenden Reste bei $C\alpha$ -homologer TPK1 in Hefe an der Erkennung der basischen Aminosäurereste eines Peptidsubstrates beteiligt sind. In der Kristallstruktur von $C\alpha$ ist erkennbar, daß der Rest Arginin 15 des Inhibitorpeptides PKI(5-24) ionische Interaktionen mit Glutamat 230 und Glutamat 170 der katalytischen Untereinheit eingeht. Zwischen dem anderen basischen Rest der Konsensussequenz von PKI(5-24), Arginin 14, und Glutamat 127 von $C\alpha$ besteht ebenfalls eine Salzbrücke (Bossemeyer *et al.*, 1993). Daneben interagiert der Rest Arginin 14 des Inhibitorpeptides über Wasserstoffbrücken mit der 3'-Hydroxylgruppe der Ribose des Nukleotids sowie mit Threonin 51 des Glycinloops von $C\alpha$. Ein weiterer Rest der Konsensussequenz ist eine hydrophobe Aminosäure, die auf die Phosphorylierungsstelle folgt (P+1-Position). Der entsprechende Rest von PKI(5-24) ist Isoleucin 18. Die Seitenkette dieses Aminosäurerestes liegt in einem hydrophoben Bereich von $C\alpha$, der aus den Resten Prolin 202, Leucin 205 und Leucin 198 gebildet wird.

Ergänzend zu Daten der Kristallstrukturanalyse wurden Mutagenesestudien durchgeführt. Die Arbeiten wiesen nach, daß Arginin 133, Glutamat 203, Tyrosin 235 und Phenylalanin 239 Anteil an der Bindung von PKI(5-24) haben (Wen and Taylor, 1994; Baude *et al.*, 1994a; Baude *et al.*, 1994b) und Tryptophan 196 bei der Interaktion mit der regulatorischen Untereinheit (R) eine Rolle spielt (Gibson and Taylor, 1997; Orellana and McKnight, 1992). Außerdem konnte gezeigt werden, daß auch Histidin 87 u.a. für die Interaktion mit RI von Bedeutung ist (Cox and Taylor, 1994; Orellana and McKnight, 1992)

Der **Katalysemechanismus**, dessen Beschreibung auf strukturellen und biochemischen Daten beruht, setzt mit der sequentiellen Bindung von Nukleotid und Substrat ein. Die Reihenfolge ist dabei zwar formell zufällig, jedoch wird unter

Bedingungen, bei denen das Substrat in limitierender Konzentration vorliegt, MgATP zuerst gebunden. Bei Überangebot des synthetischen Heptapeptides Kempetid konnte nachgewiesen werden, daß es zur Bildung eines unproduktiven Komplexes aus Enzym und Peptid kommt (Whitehouse *et al.*, 1983; Adams and Taylor, 1992). Darüber hinaus zeigte sich, daß es einen Synergismus bei der Bindung von Nukleotid (MgATP) und Pseudosubstrat (PKI, RI) gibt, so daß die Affinität jedes einzelnen Bindungspartners zur katalytischen Untereinheit in Anwesenheit des jeweiligen anderen Bindungspartners erhöht ist (Whitehouse and Walsh, 1983; Lew *et al.*, 1996). Nachdem Reed und Kinzel 1984 aufgrund von Circular dichroismmessungen eine Strukturflexibilität von C α bei der Bindung von Molekülen postulierten, wurde diese Hypothese durch Kristallstrukturdaten von Zheng *et al.* 1993 bestätigt. Daraus ging hervor, daß es mindestens zwei unterschiedliche Konformationen des Enzyms gibt. Während das Apoenzym eine offene Konformation einnimmt, bei der der Spalt zwischen den beiden Loben geöffnet ist, zeigt sich nach Bindung von MgATP und Pseudosubstrat eine geschlossene Konformation. Diese wird durch eine induced fit-Bewegung erreicht, bei der sich die beiden Loben durch eine Rotationsbewegung einander annähern und dadurch den Spalt verkleinern. Hieraus resultiert eine steigende Zahl von Kontakten zwischen den Bindungspartnern.

Die Struktur von nativem C α -Protein im ternären Komplex mit MnAMP-PNP und PKI(5-24) (Bossemeyer *et al.*, 1993) gibt weitere Einblicke hinsichtlich des beobachteten Bindungssynergismus. Denkbar ist zum einen, daß die Bindungspartner direkt untereinander Wechselwirkungen eingehen, die die Bindung wechselseitig verstärken. Zum anderen ist - alternativ oder ergänzend - u.a. auch vorstellbar, daß die Bindung mindestens eines Bindungspartners eine Konformationsänderung des Enzyms verursacht, die wiederum zu einer verstärkten Bindung des jeweils anderen Bindungspartners führt. Für beide Aspekte liefert die genannte Struktur Hinweise. Einerseits sind Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Nukleotid und PKI(5-24) zu erkennen. Andererseits zeigt eine Überlagerung der genannten Struktur mit einer Struktur des binären Komplexes aus C α und PKI(5-24) (Knighton *et al.*, 1991a/b), daß die Bindung des Nukleotids mit einer Bewegung des Glycinloops einhergeht. Hierdurch kommt es zu drei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Glycinloop und dem Inhibitorpeptid.

Weitere Untersuchungen der induced fit-Bewegung zwischen offener und geschlossener Konformation ergaben, daß hauptsächlich die Bindung von MgATP für das Einnehmen einer mehr geschlossenen Konformation maßgeblich ist, während die Bindung von PKI dabei eher eine untergeordnete Rolle spielt (Cheng *et al.*, 1998a) und daß sich durch die Komplexbildung mit den Bindungspartnern die Thermostabilität des Enzyms erhöht (Herberg *et al.*, 1999).

Nachdem Nukleotid und Substrat in der beschriebenen Weise einen Komplex mit dem Enzym gebildet haben, folgt der chemische Schritt der Katalyse. Dabei wird die γ -Phosphorylgruppe von ATP auf die Serin- oder Threonin-Hydroxylgruppe des Substrates übertragen. Nach dem sogenannten in-line-Mechanismus wird zunächst die Hydroxylgruppe des Substrates deprotoniert, bevor diese dann einen nukleophilen Angriff (nukleophile Additionsreaktion) auf das Phosphoratom der γ -Phosphorylgruppe des Nukleotids ausführt. Bei der Übertragung der Phosphatgruppe kommt es vermutlich zu einem pentakoordinierten Übergangszustand des entsprechenden Phosphoratoms (Whitehouse *et al.*, 1983; Adams and Taylor, 1992; Bossemeyer *et al.*, 1993; Madhusudan *et al.*, 1994). Für den initialen Schritt des beschriebenen Mechanismus, die Deprotonierung der Substrathydroxylgruppe, wird das Vorhandensein einer katalytischen Base vorausgesetzt. Dieses Postulat wird kontrovers diskutiert (Zhou and Adams, 1997a). Aufgrund struktureller Daten wird für Aspartat 166 eine entsprechende Funktion angenommen (Bossemeyer *et al.*, 1993; Madhusudan *et al.*, 1994). Mutagenesestudien, die an $C\alpha$ -homologer TPK1 aus Hefe (Gibbs and Zoller, 1991b) und an $C\alpha$ (Girod, 1997) durchgeführt wurden, zeigen, daß die D166-Mutanten moderate Effekte bei den Michaeliskonstanten für ATP und Substrat, aber einen dramatischen Rückgang der katalytischen Aktivität aufweisen. Die Ergebnisse dieser Arbeiten deuten auf eine essentielle Beteiligung des erwähnten Restes an der Katalyse hin. Allerdings steht dieser Hypothese der pKs-Wert einer Aspartat-Seitenkettencarbonylgruppe von 3,9 entgegen, da dieser Wert unter physiologischen pH-Bedingungen gegen eine ausreichende Affinität des Restes zum Proton spricht. Denkbar ist aber auch, daß bei $C\alpha$ die direkte Umgebung von Aspartat 166 Einfluß auf diesen Rest nimmt, so daß es zu einer Erhöhung des pKs-Wertes der Carbonylgruppe dieser Seitenkette kommt. Daten pH-abhängiger Kinetikstudien an $C\alpha$ fordern für die katalytische Base ein pKs-Wert von 6,2 (Yoon and Cook, 1987).

Nach erfolgter Übertragung der Phosphorylgruppe auf das Substrat kommt es zu einer elektrostatischen Abstoßung zwischen der Substratphosphatgruppe und dem ebenfalls negativ geladenen Aspartatrest 166 bzw. der β -Phosphorylgruppe des ADP. Dadurch wird das Phosphosubstrat freigesetzt. Anschließend erfolgt mit der Dissoziation des ADP der langsamste und damit geschwindigkeitsbestimmende Schritt des gesamten Katalysemechanismus (Whitehouse *et al.*, 1983; Adams and Taylor, 1992). Allerdings erscheint diese Zuordnung des Umsatz-limitierenden Schrittes nach neueren Untersuchungen deutlich komplexer. So scheint die ADP-Freisetzung nur bei hohen Magnesiumkonzentrationen der langsamste Schritt des gesamten Mechanismus zu sein, während unter physiologischen Magnesiumkonzentrationen (0,5 - 1 mM) die Umsatzlimitierung mit zwei Konformationsänderungen korreliert wird. Dabei erfolgt eine dieser Konformationsänderungen vor und eine nach dem Phosphorylgruppentransfer (Lew *et al.*, 1997; Shaffner and Adams, 1999a/b).

1.1.3 Strukturelle Aspekte der Regulation von Proteinkinasen

Bisher sind vier unterschiedliche strukturelle Regulationsmechanismen von Proteinkinasen bekannt, von denen mindestens einer bei allen bisher gelösten Strukturen inaktiver Proteinkinasen zu finden ist (Engh and Bossemeyer, 2001). Zu diesen Mechanismen, deren Angriffspunkte in Abb. 1.4 am Beispiel von $C\alpha$ dargestellt sind, zählt die Blockierung der ATP-Bindungstasche (1), die Verformung des Glycinloops (2), die Veränderung der Konformation des sogenannten Aktivierungssegmentes (3) und die Veränderung der Position von Helix C (4). Auf die Aspekte (3) und (4) wird im Folgenden näher eingegangen.

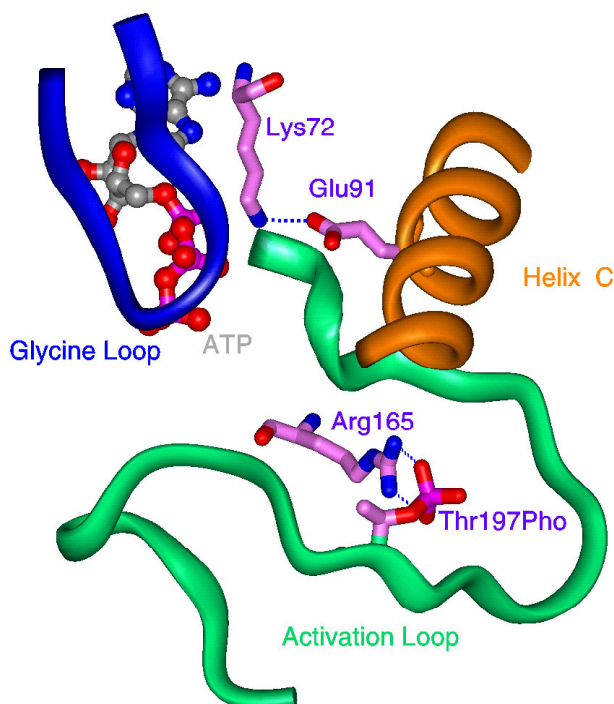


Abb. 1.4: Strukturelle Regulationsmechanismen von Proteinkinasen (Engh and Bossemeyer, 2001)

Gezeigt sind die Angriffspunkte struktureller Regulationsmechanismen am Beispiel der aktiven Konformation von $C\alpha$ (Bossemeyer et al., 1993; Auflösung 2,0 Å). Der Glycinloop, die Helix C und das Aktivierungssegment sind als tubular-Darstellung gezeigt. Für die Reste K72, E91, R165 und den phosphorylierte Rest T197 wurde die stick-Darstellung gewählt. Für die Aktivität des Proteins essentielle Interaktionen zwischen den genannten Resten sind als gepunktete Linien zu erkennen. Das ATP-Molekül ist als ball and stick-Modell dargestellt.

Das **Aktivierungssegment** von Proteinkinasen enthält bei vielen Mitgliedern der Enzymfamilie mindestens einen Aminosäurerest, der autokatalytisch oder durch eine andere aktivierende Proteinkinase phosphoryliert werden kann. Dadurch wird die katalytische Aktivität des Enzyms hergestellt (Johnson *et al.*, 1996). Bei $C\alpha$ stellt Threonin 197 diesen essentiellen Rest dar, der autokatalytisch oder durch PDK1 phosphoryliert werden kann (Girod *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 1998b). Mutagenesestudien an Threonin 197 belegen seine Bedeutung für die katalytische Aktivität und geben darüber hinaus Hinweise darauf, daß die Phosphothreoninregion eine Rolle bei der Interaktion mit den regulatorischen Untereinheiten spielt (Yonemoto *et al.*, 1997; Adams *et al.*, 1995). Strukturelle Daten (Bossemeyer *et al.*, 1993; Engh

and Bossemeyer, 2001) zeigen, auf welche Weise die Phosphorylierung von Threonin 197 die Funktionsfähigkeit von $C\alpha$ durch direkte oder indirekte Beeinflussung essentieller katalytischer Reste steuert. So stabilisiert die Phosphorylgruppe durch ihre dianionische Eigenschaft die basischen Reste Histidin 87, Arginin 165 und Lysin 189. Der Rest Arginin 165 wiederum nimmt möglicherweise über das Peptidrückgrat Einfluß auf die für die Katalyse notwendige Positionierung der postulierten katalytischen Base Aspartat 166 (Bossemeyer *et al.*, 1993; Madhusudan *et al.*, 1994). Darüber hinaus kann spekuliert werden, ob dadurch evtl. auch die Ausrichtung des Lysinrestes 168 beeinflußt wird, der durch seine Seitenketteninteraktion mit der γ -Phosphorylgruppe der Stabilisierung des Übergangszustandes bei der Phosphatübertragung dient. Die Interaktion des Threoninphosphates mit Lysin 189 wirkt sich möglicherweise auf Aspartat 184 aus. Die durch diesen Rest bewerkstelligte Metallionenkomplexierung hat ebenfalls großen Einfluß auf die katalytische Aktivität des Enzyms (Adams and Taylor, 1993b). Die dritte Wechselwirkung des phosphorylierten Restes Threonin 197 mit dem nicht konservierten Rest Histidin 87 ist für die katalytische Aktivität nicht erforderlich und kommt nur in der geschlossenen Konformation zustande.

Der C-terminale Teil des Aktivierungssegmentes bildet in Strukturen von aktiven Proteinkinasen die sogenannte P+1-Region, die eine essentielle Funktion bei der Substratbindung übernimmt. Die Struktur von aktivem $C\alpha$ -Protein (Bossemeyer *et al.*, 1993) zeigt in dem genannten Bereich des an Threonin 197 phosphorylierten Aktivierungssegmentes eine hydrophobe Tasche, welche aus den Resten Prolin 202, Leucin 205 und Leucin 198 besteht. In der Konsensussequenz von $C\alpha$ -Substraten folgt auf die Phosphorylierungsstelle ein hydrophober Aminosäurerest, d.h. dieser Rest ist in der P+1-Position lokalisiert. Die P+1-Region des Aktivierungssegmentes nimmt diesen Aminosäurerest bei der Bindung des Substrates auf.

Der Beginn des Aktivierungssegmentes von Proteinkinasen wird durch die **konservierte Aminosäuresequenz DFG** (DFG-Motiv) markiert (siehe Abb. 1.1). Die essentielle Bedeutung des zum DFG-Motiv gehörenden Aminosäurerestes Aspartat hinsichtlich der Bindung des für die Katalyse essentiellen Metallions wurde bereits am Beispiel von $C\alpha$ (Aspartat 184, siehe 1.1.2) erläutert. Eine bemerkenswerte Funktion des Phenylalaninrestes des DFG-Motivs zeigt die Struktur der inaktiven cytoplasmatischen Proteinkinase-Domäne des Insulinrezeptors (IRK) (Hubbard *et al.*, 1994). Das inaktive IRK-Protein weist neben anderen strukturellen Defekten fehlende aktivierende Phosphorylierungen an drei im Aktivierungssegment lokalisierten Tyrosinresten auf. Darüber hinaus ist die Position des Aktivierungssegment großräumig verändert. Diese Positionsveränderung erstreckt sich auch auf das DFG-Motiv. Der hierzu gehörige Rest Phenylalanin 1151 blockiert dadurch die Purinbindungstasche und verhindert damit die Nukleotidbindung. Eine ähnliche Situation zeigt auch eine Struktur der inaktiven katalytischen Domäne der Abelson Tyrosinkinase (Abl) (Schindler *et al.*,

2000) sowie eine Struktur der MAP-Kinase p38 (persönliche Mitteilung Dr. D. Bossemeyer). Der im DFG-Motiv konservierte Rest Phenylalanin scheint bei diesen Proteinkinasen also essentiellen Anteil an der Inaktivität und damit an der Regulation zu haben.

Die **Helix C** zeigt in Strukturen aktiver Proteinkinasen eine spezifische Position. Diese besteht in einer Orientierung in Richtung des katalytischen Spaltes. Dabei kommt es zur Ausbildung einer Salzbrücke zwischen zwei invarianten Aminosäureresten. Bei C α handelt es hierbei um Lysin 72 und Glutamat 91. Die essentielle Rolle von Lysin 72 hinsichtlich der Koordinierung der α - und β -Phosphorylgruppe bei der Nukleotidbindung wurde bereits erläutert (siehe 1.1.2); der Rest Glutamat 91 ist in der Mitte der Helix C lokalisiert. Während bei Strukturen aktiver Proteinkinasen die beschriebene Position der Helix C unter Ausbildung der ebenfalls genannten Salzbrücke zu verzeichnen ist, zeigen Strukturen inaktiver Proteinkinasen dagegen oftmals eine positionelle Veränderung der Helix C einhergehend mit einem Verlust der ionischen Interaktion zwischen den entsprechenden Resten Lysin und Glutamat. Die Ausbildung der beschriebenen Salzbrücke hat damit möglicherweise eine essentielle Bedeutung für die Aktivität von Proteinkinasen.

1.2 Ziele dieser Arbeit

Proteinkinasen spielen hinsichtlich eukaryotischer intrazellulärer Kommunikation, Regulation und Signaltransduktion eine zentrale Rolle. Die Proteinkinase A (PKA) dient als Modell für diese gesamte Enzymfamilie. Daher gilt das besondere Interesse dem Verständnis der katalytischen Untereinheit $C\alpha$ von PKA auf molekularer Ebene.

Ziel dieser Arbeit war es, Hinweise auf die Funktion zweier konservierter Aminosäurereste der katalytischen Untereinheit $C\alpha$ von PKA zu erhalten. Bei diesen beiden Aminosäureresten handelt es sich um Phenylalanin 185 und Glutamat 91.

Der Rest Phenylalanin 185 von $C\alpha$ ist Bestandteil des hochkonservierten DFG-Motivs, welches den Anfang des Aktivierungssegmentes von Proteinkinasen markiert. Bei der cytoplasmatischen Proteinkinase-Domäne des Insulinrezeptors (IRK), der katalytischen Domäne der Abelson Tyrosinkinase (Abl) sowie bei der MAP-Kinase p38 scheint das im DFG-Motiv konservierte Phenylalanin eine essentielle Rolle bei der strukturellen Regulation dieser Proteinkinasen zu übernehmen (Hubbard *et al.*, 1994; Schindler *et al.*, 2000; persönliche Mitteilung Dr. D. Bossemeyer). Bei $C\alpha$ liegt die Seitenkette von F185 in einer hydrophoben Tasche, die ihrerseits in einem hydrophoben, locker gepackten Bereich positioniert ist. Der benachbarte Rest D184 erfüllt eine essentielle Funktion bei der Metallionen - bzw. Nukleotidbindung. Daher wurde angenommen, daß F185 als eine Art hydrophober Anker fungiert. Dieser bringt möglicherweise einerseits den benachbarten Rest D184 in eine für die Nukleotidbindung optimale Position und könnte andererseits eine für die Katalysereaktion ausreichende Konformationsflexibilität erlauben. Zur Hinterfragung dieser Funktion dienten im Rahmen dieser Arbeit $C\alpha$ -Mutanten mit den Aminosäureaustauschen F185A, F185L und F185W. Es wurde angenommen, daß die Austausche Einfluß auf den Grad der Ausfüllung des locker gepackten Bereiches nehmen und so entsprechende Effekte hinsichtlich der Konformationsflexibilität in diesem Bereich und der Positionierung von D184 hervorrufen.

Der Glutamatrest 91 von $C\alpha$ ist in der Mitte der Helix C lokalisiert. Die Positionsveränderung dieses Strukturelementes stellt einen in vielen Proteinkinasen verwirklichten Mechanismus zur Modulation der Enzymaktivität dar (Engh and Bossemeyer, 2001). Strukturen von aktiven Proteinkinasen zeigen eine spezifische Ausrichtung dieser Helix, wobei es zur Ausbildung einer Salzbrücke zwischen zwei invarianten Resten kommt. Bei $C\alpha$ handelt es sich hierbei um den Rest Lysin 72, welcher hinsichtlich der Wechselwirkung mit dem Nukleotid eine essentielle Rolle spielt, und den Rest Glutamat 91. Strukturen inaktiver Proteinkinasen dagegen zeigen oftmals eine positionelle oder konformelle Beeinträchtigung der Helix C, welche in vielen Fällen mit dem Verlust der ionischen Interaktion zwischen den entsprechenden invarianten Resten einhergeht. Vor diesem Hintergrund stellte sich im Rahmen dieser Arbeit die

Frage, ob und in welcher Weise die Interaktion zwischen K72 und E91 Einfluß auf die strukturellen Voraussetzungen hinsichtlich der katalytischen Aktivität von $C\alpha$ hat. Zur Unterbrechung der genannten Wechselwirkung wurden $C\alpha$ -Mutanten mit den Aminosäureaustauschen E91Q und E91A hergestellt.

Erfolgreiche Mutagenesestudien an konservierten Resten von $C\alpha$ sind bislang selten. Grund hierfür scheint in vielen Fällen zu sein, daß die mutierten Proteine nicht mehr fähig sind, die für die Aktivität essentielle Autophosphorylierung (siehe 1.1.3) in ausreichendem Maße zu katalysieren. Daher kam im Rahmen dieser Arbeit das von Girod *et al.* (1996) etablierte Coexpressionsystem zur Anwendung. Dabei wird mutiertes $C\alpha$ -Protein gleichzeitig mit dem entsprechenden Wildtyp-Protein exprimiert. So kann die essentielle Autophosphorylierung intermolekular durch das Wildtyp-Protein erfolgen. Nach Expression und Aufreinigung der genannten $C\alpha$ -Mutanten war geplant, diese sowohl kinetisch als auch strukturell zu charakterisieren.

Ziel war es daher auch, zunächst dazu notwendige methodische Voraussetzungen zu schaffen. Zum einen gehörte hierzu die Etablierung eines Meßsystems auf Basis eines optischen Biosensors, um eine kinetische Analyse der Interaktionen zwischen ggf. mutiertem $C\alpha$ -Protein, ATP und einem Inhibitorpeptid zu ermöglichen. Zum anderen zählte dazu die Entwicklung säulenchromatographischer Aufreinigungsmethoden, um eine Isolierung bestimmter mutierter $C\alpha$ -Proteine mit hohem Reinheitsgrad zu erreichen und somit eine Kristallisation dieser Proteine zu ermöglichen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
anti-His-tag, His-probe (G-18)	Santa Cruz Biotechnology Dianova
anti-Kaninchen, aus Ziege, Peroxidase-gekoppelt, polyklonal (Sekundärantikörper)	
anti-PKA C α (C 20), aus Kaninchen, polyklonal (Primärantikörper)	Santa Cruz Biotechnology

2.1.2 Bakterienstämme

Der im Rahmen dieser Arbeit zur Expression verwendete *E. coli*-Stamm trägt das Gen der T7-RNA-Polymerase als Phagenintegration (DE3) im Chromosom. Dieses Gen wiederum steht unter der Kontrolle eines lacUV-Promotors, der durch IPTG induzierbar ist. Auf diese Weise kann die Transkription von DNA-Fragmenten, welche in dem genannten Stamm in Vektoren vorliegen und unter der Kontrolle eines T7-Promotors stehen, zum gewünschten Zeitpunkt durch IPTG-Zugabe gestartet werden. Darüber hinaus zeichnet sich der Stamm BL21(DE3) durch Mutationen in den Genen *ompT* (outer membrane protease) und *lon* (ATP-abhängige Protease) als Expressionsstamm aus. Durch diese Mutationen werden die entsprechenden Enzyme nicht mehr aktiv exprimiert, so daß während der Präparation von in diesem Stamm rekombinant exprimierten Protein bei rascher Arbeitsweise auf die Zugabe von Proteaseinhibitoren verzichtet werden konnte.

<i>Escherichia coli</i> -Stamm	Eigenschaften	Herkunft bzw. Referenz
BL21(DE3)	F ⁻ ; <i>ompT</i> ; <i>lon</i> ⁻ <i>hsdS</i> _B (r _B ⁻ m _B ⁻)	Novagen
XL1Blue	<i>recA1 lac</i> ⁻ ; F' ⁺ [<i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> Δ M15]; <i>endA</i> ; <i>hsR17</i>	Stratagene

2.1.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, bei den Firmen AGS, Aldrich, AppliChem, Gerbu, ICN, Merck und Sigma bezogen und

entsprechen dem Reinheitsgrad p.a. (*pro analysis*). Weitere verwendete Materialien und deren Bezugsquellen sind im Folgenden aufgeführt.

Material	Bezugsquelle
[γ - ³² P]ATP; 3000 Ci/mmol; 10 mCi/ml	Amersham
Affi-Gel® 10 Gel	Bio-Rad
Agarose-Gelelektrophoresekammern, GE-A2, GE-B1A, GE-B	AGS
Bacto Tryptone und Peptone	Difco
Bacto-Agar	Difco
Blotpapier; Whatman 3 MM	Whatman
Centricon 30	Millipore
Centriprep 30	Millipore
DNA-Molekulargewichtsstandard, 1 kb ladder	GIBCOBRL
DNA-Molekulargewichtsstandard, BioSizer™ II (HindIII-verdaute λ DNA)	AGS
ECL-Chemilumineszenz-Nachweissystem	Amersham
Ethidiumbromid	Biomol
Hefeextrakt	Difco
Leersäulen, Econo-Pac, 1,5x12 cm	Bio-Rad
Mono-S®-Kationenaustauscher-FPLC-Säulen, HR5/5 und HR10/10	Pharmacia
P81 Chromatographiepapier, Kationenaustauscher	Whatman
Polaroid professional 667, positiv Sofortbildfilm	Polaroid
Protein-Molekulargewichtsstandard, prestained, low range	Bio-Rad
Protogel: 30 % Acrylamid (w/v), 0,8 % Bis-Acrylamid-Lsg.	National Diagnostics
PVDF-Membran, Immobilon-P	Millipore
Röntgenfilm; Kodak X-Omat™ AR	Kodak
SDS-Gelelektrophoresekammer, Mini-PROTEAN II	Bio-Rad
Sterilfilter, 0,45 und 0,2 μ m Porengröße	Millipore
Scintillatorflüssigkeit, Aquasafe 500 plus	Zinsser Analytic

2.1.4 Enzyme für molekularbiologische Arbeiten

Enzym	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	MBI
<i>Bam</i> HI	AGS
<i>Bgl</i> II	AGS
<i>Eco</i> RI	AGS
<i>Eco</i> RV	AGS
<i>Hind</i> III	AGS
<i>Nde</i> I	AGS
T4-DNA-Ligase	AGS, MBI
<i>Taq</i> -Polymerase	AGS
<i>Xba</i> I	AGS

2.1.5 Kits für molekularbiologische Arbeiten

Kit	Bezugsquelle
QIAprep Spin Miniprep Kit (50)	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit (50)	Qiagen
QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene

2.1.6 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Autoreader EL310	Bio-Tek Instruments
Brutschrank Typ A	MELAG
DNA Thermal Cycler	Perkin Elmer
Entwicklermaschine	Amersham
Eppifuge Biofuge pico	Heraeus
FPLC: Gradient Programmer GP-250, Pump 500, Single Path Monitor UV-1, Fraction Collector Frac-100	Pharmacia
Äkta Explorer-System	Pharmacia
Geltrockner Modell 583	Bio-Rad
Inkubationsschüttler Multitron®	Infors
Liquid Scintillation Counter 1212 Rackbeta	LKB Wallac
MP4 ⁺ -Land Camera	Polaroid
Optisches Biosensor-System IAsys plus	Affinity Sensors
Rotationsschüttler Reax	Heidolph
Spektralphotometer Ultrospec 3000	Pharmacia
Tischzentrifuge 5804 R	Eppendorf
Ultra-Tischzentrifuge TL-100	Beckmann
Ultraschallsonde Sonifier B15	Branson
Ultrazentrifuge L8-55	Beckmann
Zentrifuge RC-3B	Sorvall/Du Pont Instruments
Zentrifuge RC-5B	Sorvall/Du Pont Instruments

2.1.7 Nährmedien und Medienzusätze

Nährmedien

Lennox Broth Base:

10,0 g/l Selecton Pepton 140
5,0 g/l Hefe Extrakt
5,5 g/l NaCl

Lennox Broth Agar:

10,0 g/l Selecton Pepton 140
5,0 g/l Hefe Extrakt
5,5 g/l NaCl
12,0 g/l Bacto-Agar

S.O.B.-Medium:

2,0 % (w/v)	Typton/Pepton
0,5 % (w/v)	Hefe-Extrakt
10,0 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
10,0 mM	MgSO ₄ *
10,0 mM	MgCl ₂ *

S.O.C.-Medium (Hanahan, 1983):

2,0 % (w/v)	Trypton/Pepton
0,5 % (w/v)	Hefe-Extrakt
10,0 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
10,0 mM	MgSO ₄ *
10,0 mM	MgCl ₂ *
20,0 mM	Glucose

*) Zugabe dieser Salze aus sterilen Stammlösungen nach dem Autoklavieren

Nährmedienzusätze

Zur Herstellung von Selektivmedien wurden den Nährmedien nach dem Autoklavieren entsprechende Antibiotika zugesetzt.

Antibiotikum	Abkürzung	Arbeitskonzentration [µg/ml]	Lösungsmittel für Stammlösung (1000x)
Carbenicillin	Cb	50	50 % Ethanol
Kanamycin	Kn	50	H ₂ O bidest

2.1.8 Peptide

Peptid	Bezugsquelle
Kemptid	Dr. R. Pipkorn, Peptidsyntheseinheit, DKFZ
PKI(5-24), Kaninchensequenz	Dr. R. Pipkorn, Peptidsyntheseinheit, DKFZ
PKI(5-24), Kaninchensequenz	Sigma

Die Sequenzen dieser Peptide sind im Anhang aufgeführt.

2.1.9 Plasmide

Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Vektoren steht die Transkription des klonierten C α -DNA-Fragmentes unter der Kontrolle eines T7-Promotors und ist damit abhängig von der Gegenwart der T7-RNA-Polymerase. Darüber hinaus bietet der pET-28b(+)-Vektor die Möglichkeit Fusionsproteine mit einem sogenannten His-tag herzustellen. Die Klonierung der zu exprimierenden DNA-Fragmente in die Vektoren erfolgte in allen Fällen über *Nde*I (5') und *Bam*HI (3'). Die Plasmidkarten sind im Anhang aufgeführt.

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pET-28b(+)	Km^{R} , f1^+ ori, pBR322 ori, lacI^{q} , T7-Promotor	Novagen, Madison
pT7-7	Ap^{R} , T7-Promotor, Co/EI ori	Tabor, S. (1990)

2.1.10 Software

Programm	Bezugsquelle
Clone Manager, Clone 4	S&E Software
Excel 97	Microsoft
Grafit 3.03	Erithacus Software Ltd.
IAsys Auto+	Affinity Sensors
IAsys FASTfit 2.03	Affinity Sensors
IAsys FASTplot 2.0	Affinity Sensors
Insight II, 2000	Accelrys
Origin 5.0	Microcal
Plasmid Map Enhancer, Enhance 2.5	S&E Software
Primer Designer, Primer 2	S&E Software
Swiss PdbViewer 3.7b2	Glaxo Wellcome Research (Shareware)
Word 6.0 bzw. Word 97	Microsoft

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Anzucht der *E. coli*-Stämme

Die *E. coli*-Flüssigkulturen wurden mit Einzelkolonien, die von Verdünnungsausstrichen auf Festmedien stammten, angeimpft und, wenn nicht anders angegeben, über Nacht (ü.N.) bei 37 °C und angemessener Schüttelrate inkubiert. Um eine Segregation zu vermeiden, wurden entsprechende Antibiotika zugesetzt. Die Volumina der Flüssigkulturen richteten sich nach dem Verwendungszweck. So reichten für die Isolierung von Plasmid-DNA in der Regel 10 ml einer ü.N.-Kultur aus, während für die rekombinante Expression von Proteinen im präparativen Maßstab bis zu 8 x 1 l eingesetzt wurden. Die Kontrolle des Zellwachstums fand anhand der Bestimmung der optischen Dichte der Kulturen bei einer Wellenlänge von 660 nm (o.D._{660}) statt. Gegebenenfalls wurden die Proben verdünnt, so daß die Meßwerte im linearen Bereich ($\text{o.D.}_{660} = 0,3 - 0,8$) lagen. Als Referenz wurde demineralisiertes Wasser eingesetzt.

2.2.2 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Stämme

Durch dieses im Weiteren beschriebene Verfahren (Hanahan, 1983) werden *E. coli*-Zellen, die ohne besondere Behandlung nicht in der Lage sind, freie DNA aufzunehmen, zur Transformation befähigt.

Puffer:

RF1-Puffer:

100 mM	RbCl
10 mM	CaCl ₂
50 mM	MnCl ₂ *
15 %(w/v)	Glycerin
30 mM	K-Acetat pH 5,8

RF2-Puffer:

10 mM	RbCl
75 mM	CaCl ₂
15 %(w/v)	Glycerin
10 mM	MOPS pH 6,8

*) Zugabe nach dem Autoklavieren aus steriler Stammlösung

Durchführung:

- Animpfen von 50 ml S.O.B.-Medium mit einer ü.N.-Kultur, so daß die o.D.₆₆₀ 0,02 - 0,03 beträgt
- Inkubation für ca. 2 h bei 37 °C und 140 rpm bis zur o.D.₆₆₀ 0,3 - 0,35
- Überführen von jeweils 25 ml Kultur in ein steriles Zentrifugenröhrchen
- Inkubation für 15 min auf Eis
- Zentrifugation für 20 min, 3000 - 4000 x g, 4 °C
- quantitatives Dekantieren des Überstandes
- Resuspendieren jeweils eines Pellets von 25 ml Kultur in jeweils 8,3 ml gekühltem (0 °C) RF1- Puffer
- Inkubation für 15 min auf Eis
- Zentrifugation für 20 min, 3000 - 4000 x g, 4 °C
- quantitatives Dekantieren des Überstandes
- Resuspendieren jeweils eines Pellets in jeweils 2 ml gekühltem (0 °C) RF2-Puffer
- Inkubation für 15 min auf Eis
- Aliquotieren zu je 100 µl in Eppendorf-Gefäße
- Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff
- Lagerung bei - 80 °C

2.2.3 Transformation bzw. Cotransformation

Bei der Cotransformation wird im Gegensatz zur einfachen Transformation die Aufnahme zweier unterschiedlicher Plasmide pro Bakterienzelle angestrebt. Dieses Verfahren und die sich daran anschließende Coexpression der Proteine wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um zur Autophosphorylierung nicht mehr befähigte Mutanten durch den coexprimierten Wildtyp zur aktivierenden Phosphorylierung an Threonin 197 zu verhelfen (siehe auch 2.4.1). Dabei wurde die rC α -Mutante üblicherweise durch den pET-28b(+)-Vektor codiert, während die Wildtypsequenz im pT7-7-Vektor vorlag. Eine Ausnahme hiervon bildete die Präparation von rC α -F185W für Kristallisationsexperimente (siehe 3.1.4.1).

Durchführung (modifiziertes Novagen-Protokoll):

- Auftauen von Aliquots (100 μ l) kompetenter Zellen auf Eis
- Zugabe der DNA-Lösung(en): Je 1 - 100 ng bzw. 1 μ l pro gewünschter Plasmid-DNA bzw. Plasmidlösung
- Inkubation für 5 - 60 min auf Eis
- Hitzeschock bei 42 °C für 30 sec
- Inkubation für 2 min auf Eis
- Zugabe von 700 μ l S.O.C.-Medium
- Inkubation für 1 h bei 37 °C und 250 rpm (Resistenzgenexpression)
- Ausplattieren von 20 - 200 μ l der Zellsuspension auf Selektionsagarplatten
- Inkubation bei 37 °C im Brutschrank über Nacht

2.2.4 Anzucht von *E. coli*-Stämmen zur Expression bzw. Coexpression rekombinanter Proteine

Die Kulturen zeigten je nach verwendetem Vektor bzw. verwendeten Vektoren ein unterschiedlich schnelles Wachstum. So war bei Expressionskulturen mit dem pET-28b(+)-Vektor (unerheblich, ob bei Einzel- oder bei Coexpression mit pT7-7 zusammen) meist eine höhere Verdopplungsrate zu verzeichnen als bei Expressionskulturen mit dem pT7-7-Vektor allein.

Die Absenkung der Kultivierungstemperatur von 37 °C auf 24 °C vor dem Expressionsstart diente der Erhöhung des löslichen Anteiles von exprimiertem Protein. Für die gesamte Anzucht wurde LB-Medium unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika verwendet.

Durchführung:

- Animpfen von Vorkulturen (10 ml Vorkultur je 1 l im Weiteren geplanter Hauptkultur) aus einer ü.N.-Kultur (siehe 2.2.1) unter Verwendung der entsprechenden Antibiotika
- Inkubation bei 37 °C und 225 rpm für ca. 2 h (bis zu einer o.O.₆₆₀ von ca. 0,3 – 0,5) im Schüttelinkubator
- Animpfen der Hauptkulturen (10 ml Vorkultur je 1 l Hauptkultur), Verwendung der entsprechenden Antibiotika
- Inkubation bei 37 °C und 120 rpm im Schüttelinkubator bis zu einer o.D.₆₆₀ von ca. 0,3
- Absenken der Temperaturvorgabe des Schüttelinkubators auf 24 °C, so daß diese Temperatur bei einer o.D.₆₆₀ der Kulturen von 0,7 – 0,8 erreicht wird
- Induktion der Kulturen durch Zusatz von IPTG, Endkonzentration 0,4 mM
- Inkubation ü.N. bei 24 °C und 120 rpm (für ca. 16 – 18 h)

Die so über Nacht inkubierten Kulturen wiesen typischerweise eine o.D.₆₆₀ zwischen 1,2 und 2,8 auf.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von DNA

2.3.1.1 Plasmid-Präparation

Die Plasmid-Präparation aus *E. coli*-Zellen erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (siehe 2.1.5). Die Methode beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse und einer anschließenden Bindung der DNA aus dem Zellhomogenat an ein Anionenaustauscherharz (Vogelstein and Gillespie, 1979), wobei die genaue Vorgehensweise dem QIAprep Miniprep-Handbuch zu entnehmen ist. Die Menge und Reinheit der aufgereinigten DNA ließen eine Verwendung zu Sequenzierungs-, Transformations-, Restriktionsanalyse- und Ligationszwecken zu.

2.3.2 DNA-Analysen

2.3.2.1 Konzentrationsbestimmung

DNA-Konzentrationen wurden mit Hilfe der optischen Dichte der Probe bei 260 nm und des Lambert-Beerschen-Gesetzes bestimmt. Dabei entspricht eine $o.D._{260}$ von 1 einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g dsDNA}/\mu\text{l}$ bzw. 33 $\mu\text{g sgDNA}/\mu\text{l}$.

Um den Grad der Verunreinigung der DNA-Lösung durch Proteine zu überprüfen wurde zusätzlich eine Bestimmung der $o.D._{280}$ vorgenommen. Ein Verhältnis von $o.D._{260}/o.D._{280}$ von 1,6 - 1,8 läßt auf einen akzeptablen Reinheitsgrad schließen.

2.3.2.2 Restriktionsspaltungen

Restriktionsendonukleasen wurden sowohl zu Restriktionsanalysen als auch zu präparativen Zwecken, z.B. bei Klonierungsexperimenten, eingesetzt. Die Spaltungen wurden mit verschiedenen Enzymen (siehe 2.1.4) unter den von dem jeweiligen Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Bei gleichzeitiger Spaltung mit zwei verschiedenen Enzymen wurde hinsichtlich der Reaktionsbedingungen ein Kompromiß eingegangen, der für beide Enzyme eine ausreichende Aktivität gewährleistete.

Ansatz:

0,2 - 1 μg	Plasmid-DNA
1 μl	Restriktionsenzym puffer 10x
5 - 10 U	Restriktionsenzym
x μl	Bidest.
<hr/>	
10 μl	

2.3.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Molekülen nach Größe und Konformation. Auf die Trennung einflußnehmende Faktoren sind die verwendete Agarosekonzentration des Gels, die Gesamtlaufstrecke und die angelegte Spannung. Als Laufpuffer wurde TAE- oder TBE-Puffer verwendet und die Agarosekonzentration betrug je nach der Größe der zu trennenden Fragmente zwischen 0,7 und 1,0 % (w/v) Agarose in TAE- bzw. TBE-Puffer.

Puffer:

TAE-Puffer:

40 mM	Tris
2 mM	EDTA
20 mM	Na-Acetat, pH 7,8
	Einstellen des pH mit konz. HAc

TBE-Puffer:

90 mM	Tris, pH 8,0
2 mM	EDTA
90 mM	Borsäure

DNA-Ladepuffer:

25 mM	Tris, pH 7,0
150 mM	EDTA
25 % (v/v)	Glycerin
0,05 % (w/v)	Bromphenolblau

Die Proben, die DNA-Mengen zwischen 0,2 und 2,0 µg DNA enthielten, wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt, so daß dessen Endkonzentration bei 20 % (v/v) der Gesamtprobe lag. Der Gellauf wurde bei 50 bis 100 V durchgeführt und das Gel anschließend in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) inkubiert, so daß die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden konnten. Zur Bestimmung der Größe linearer DNA-Fragmente diente ein DNA-Molekulargewichtsstandard mit bekannten Fragmentlängen (siehe 2.1.3), der als Referenz mit auf das Gel aufgetragen wurde. Da die Laufstrecke eines linearen DNA-Fragmentes im Gel dem Logarithmus seines Molekulargewichtes umgekehrt proportional ist, kann anhand bekannter Fragmentgrößen und deren Laufstrecken eine Eichgerade erstellt werden, aus der die Größe eines unbekanntes Fragments auf ca. 100 bp genau direkt ablesbar ist.

2.3.3 DNA-Reinigung

2.3.3.1 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Für bestimmte Zwecke, z.B. bei Klonierungsexperimenten, war es nötig, bestimmte DNA-Fragmente aus Restriktionsspaltungsansätzen zu isolieren. Dazu wurde das gewünschte Fragment nach erfolgter Agarosegelelektrophorese und kurzer Anfärbung mittels Ethidiumbromid unter langwelligem UV-Licht (365 nm) als Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Die Reinigung aus dem Agarosegel erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit, das auf einer spezifischen Bindung der gelösten DNA an eine Silikat-

Gelmembran mit entsprechendem Wach- und Elutionsschritt basiert. Details sind dem Protokoll des QIAquick Gel Extraction Kits zu entnehmen.

2.3.3.2 Reinigung von PCR-Produkten

Um PCR-Produkte von Primern, Nukleotiden, Salzen und Mineralöl zu reinigen, wurde das QIAquick Spin PCR Purification Kit verwendet, dessen Reinigungsprinzip mit dem des QIAquick Gel Extraction Kits identisch ist. Auch hier sind Details der Methode dem Protokoll des QIAquick Spin PCR Purification Kits zu entnehmen.

2.3.4 Mutagenesen

Für die Mutagenese-Experimente wurde das QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) verwendet. Damit ist es möglich, Punktmutationen, Codogenaustausche, Insertionen und Deletionen in eine DNA-Sequenz einzuführen, die doppelsträngig in einem bliebigem aus *E. coli* isoliertem Vektor vorliegt. Im Weiteren wird nur eine Übersicht der Vorgehensweise gegeben, experimentelle Details sind dem Handbuch des Kits zu entnehmen.

Zunächst werden die Mutagenese-Primer synthetisiert. Dies wurde von Herrn Wolfgang Weinig, Nukleotid-Synthese, DKFZ-Heidelberg, durchgeführt. Die Primer sind so designed, daß sie - bis auf die einzuführende Mutation - komplementär zu der zu mutierenden dsDNA-Sequenz einerseits, und damit zueinander andererseits sind. Die Primer-Sequenzen sind dem Anhang zu entnehmen.

Anschließend wird eine PCR durchgeführt, bei der die Primer mittels *PfuTurbo*TM DNA Polymerase verlängert und die mutierte dsDNA vervielfältigt wird. Die PCR-Ansätze waren wie folgt zusammengesetzt:

PCR-Ansatz:

10 - 50 ng	Vektor-DNA mit zu mutierendem Insert
125 ng	je Mutageneseprimer
1 µl	dNTP-Mix
1 µl	<i>PfuTurbo</i> TM DNA Polymerase (2,5 U)
5 µl	10x Reaktionspuffer
x µl	Bidest
<hr/>	
50 µl	

Alle Ansätze werden mit 30 µl Mineralöl überschichtet bevor die PCR gestartet wird.

Als PCR-Produkt erhält man die gewünschte mutierte dsDNA, die in jedem Strang jeweils einen Bruch trägt. Durch die versetzte Anordnung dieser Strangbrüche liegt die DNA jedoch zirkulär vor.

Um nun die Wildtyp-DNA aus dem Ansatz zu entfernen, wird ein Verdau mit *DpnI* durchgeführt. Diese Endonuklease weist eine Spezifität für methylierte DNA auf und spaltet somit nur die zuvor von *E. coli* methylierte, nicht mutierte Wildtyp-DNA. Schließlich kann die mutierte dsDNA in superkompetente *Epicurian coli*® XL1blue (Stratagene) transformiert werden, die auch dafür sorgen, daß die o.g. Strangbrüche geschlossen werden.

Der Erfolg der Mutagenese wurde jeweils durch Sequenzierung überprüft.

2.3.5 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen, die zur Kontrolle der Mutagenese-Experimente nötig waren, wurden von Herrn Dr. Andreas Hunziker (Abteilung Zellbiologie, DKFZ Heidelberg) durchgeführt.

2.3.6 Klonierungen

Um DNA-Inserts umzuklonieren, wurden diese zunächst mittels eines Restriktionsverdau (siehe 2.3.2.2) mit den geeigneten Enzymen aus dem Ursprungsvektor herausgespalten und mittels einer Agarosegelelektrophorese gereinigt (siehe 2.3.2.3 bzw. 2.3.3.1). Der Zielvektor wurde ebenfalls mit den geeigneten Restriktionsenzymen behandelt und einer Gelreinigung unterzogen.

2.3.6.3 DNA-Dephosphorylierung

Vor einer Insertionsligation wurden die Zielplasmide mit der *Calf Intestinale Phosphatase* dephosphoryliert. Diese Phosphomonoesterase ist in der Lage, die Phosphatgruppen am 3'- und 5'-Ende von DNA zu entfernen. Da die anschließend zur Ligation verwendete DNA-Ligase nur 5'-Phosphat-Enden mit 3'-OH-Enden verknüpfen kann, wurde somit ein Rezirkularisieren des Zielvektors während der Insertionsligation verhindert und damit die Insertionseffizienz gesteigert.

Reaktionsansatz:

1 - 20 pmol	Plasmid-DNA (ca. 1 - 20 µg)
1 - 2 µl	<i>Calf Intestinale Phosphatase</i> (ca. 0,1 U)
5 µl	OPA-Puffer (Pharmacia)
x µl	Bidest
<hr/>	
50 µl	

Die Ansätze wurden bei 37 °C für ca. 30 Minuten inkubiert bevor, die Phosphatase durch eine Inkubation bei 85 °C für 15 Minuten deaktiviert wurde.

2.3.6.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die für die Ligationsreaktionen verwendete T4-DNA-Ligase ist in der Lage, durch die ATP-abhängige Knüpfung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden doppelsträngige DNA-Fragmente zu verbinden. Es werden sowohl glatte als auch kohäsive kompatible Enden akzeptiert. Bei Insertionsligationen sollte das Insert im bis zu dreifachen molaren Überschuß vorliegen. Darüber hinaus steigert ein möglichst geringes Reaktionsvolumen die Reaktionseffizienz.

Reaktionsansatz:

100 fmol	gespaltene und dephosphorylierte Plasmid-DNA
100 - 300 fmol	Insert-DNA
1 - 5 U	T4-DNA Ligase
2 µl	Ligasepuffer
0,4 µl	DTT 50 mM
0,4 µl	ATP 50 mM
x µl	Bidest
<hr/>	
20 µl	

Die Inkubation erfolgte bei 14 °C über Nacht oder bei Raumtemperatur für 2 Stunden. Jeweils 5 µl des so erhaltene Ligationsgemisches wurden anschließend zur Transformation (siehe 2.2.3) eingesetzt und einer Restriktionsanalyse (siehe 2.3.2.2) unterzogen.

2.4 Biochemische und biophysikalische Methoden

2.4.1 Expression bzw. Coexpression rekombinanter Proteine

Bei der Kombination der verwendeten Plasmide (pT7-7 und pET-28b(+)) mit dem *E. coli*-Expressionsstamm BL21 (DE3) kann der Zeitpunkt der Proteinexpression durch die Zugabe von IPTG gesteuert werden (siehe 2.1.2 und 2.1.9).

Die Anzucht der Bakterien und die experimentelle Durchführung der Expression bzw. Coexpression sind unter 2.2.4 bzw. 2.4.1 beschrieben.

Für die Expression rekombinanter Proteine wurde üblicherweise der Vektor pT7-7 verwendet. Allerdings sind einige der im Verlauf dieser Arbeit charakterisierten Mutanten nicht mehr zur essentiellen enzymaktivierenden Autophosphorylierung an Threonin 197 befähigt. Damit ist die PKI(5-24)-Affinitätsreinigung dieser Proteine nicht mehr möglich, da die hierfür notwendige Bindung an das Peptid des Proteinkinaseinhibitors, PKI(5-24), durch die fehlende Threoninphosphorylierung nicht mehr zustande kommt. Um diese Mutanten dennoch in phosphorylierter Form zu erhalten, wurde eine Coexpression vorgenommen. Dabei wird das Wildtyp-Enzym, dessen DNA-Sequenz im pT7-7-Vektor vorliegt, und die jeweilige Mutante, die durch den pET-28b(+)-Vektor codiert wird, nach Cotransformation (siehe 2.2.3) gleichzeitig in den *E. coli*-Zellen exprimiert. Dadurch kann die essentielle Threoninphosphorylierung der Mutante intermolekular durch das Wildtyp-Enzym erfolgen und eine Affinitätsreinigung des Enzym-Gemisches vorgenommen werden.

Die Trennung der Mutante vom Wildtyp erfolgte anschließend durch eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie. Da die Mutante mit Hilfe von pET-28b(+) exprimiert wird, ist das Enzym N-terminal mit einem His-tag versehen und kann somit an das entsprechende Nickel-Säulenmaterial gebunden werden. Der Verlust an Protein durch diesen zusätzlichen Reinigungsschritt wird durch das im Vergleich zum pT7-7-Vektor erhöhte Expressionslevel des pET-28b(+)-Vektors mehr als ausgeglichen.

Die skizzierte Vorgehensweise wurde zur Isolierung von C α -Protein verwendet, welches anschließend kinetisch charakterisiert wurde. Bei der Präparation bestimmter C α -Mutanten zum Zwecke der Kristallisation lagen bei der Coexpression die DNA-Fragmente von C α -Wildtyp und -Mutante z.T. in anderer Kombination in den genannten Vektoren vor. Darüber hinaus wurden hier alternativ zur Ni²⁺-Affinitätschromatographie ionenaustauscherchromatographische Verfahren zur Trennung von Wildtyp und Mutante angewendet. Diese Besonderheiten sind unter 2.4.12 angegeben.

2.4.2 Präparation rekombinanter Proteine

2.4.2.1 Zellaufschluß

Nach der Zellernte der *E. coli*-Kulturen (Anzucht siehe 2.2.4) mittels eines Zentrifugationsschrittes (4000 x g, 30 min, 4 °C) wird das Pellet von 2 - 3 l Kultur in ca. 25 ml Lysepuffer (4 °C) resuspendiert.

Lysepuffer:

50 mM KCl
1 mM EDTA
30 mM MES pH 6,5
1 mM DTT (frisch zugeben)

Der Zellaufschluß erfolgt mittels Ultraschall (Branson Sonifier 250, Einstellungen: output control 5 - 6, duty cycle 40 - 50). Die Probe wird 10 x 30 Sekunden beschallt mit jeweils 30 Sekunden Pause zur Kühlung im Eisbad, um ein Überhitzen zu vermeiden. Die Zelltrümmer werden durch 45minütige Ultrazentrifugation (Beckmann L8-55; Rotor: TI 45) bei 250000 rpm und 4 °C entfernt.

2.4.2.2 Reinigung der katalytischen Untereinheit C α von PKA mittels PKI(5-24)-Affinitätschromatographie

Die PKI(5-24)-Affinitätschromatographie diente zur Einschnitt-Reinigung der katalytischen Untereinheit C α von PKA aus Bakterien-Lysat (Olsen and Uhler, 1989). Dabei wird zunächst ein synthetisches Peptid, PKI(5-24), an eine Gelmatrix gebunden. Dieses Peptid stellt eine Teilsequenz des physiologischen Proteinkinaseinhibitors PKI dar und bindet, nach erfolgter Immobilisierung, während der Affinitätschromatographie C α in Abhängigkeit von ATP und Mg²⁺ an das Säulenmaterial. Da für diese Bindung der katalytischen Untereinheit an den Inhibitor zwei Argininreste in der Pseudosubstratsequenz von entscheidender Bedeutung sind, ist es möglich, C α durch eine hohe Konzentration von freiem Arginin kompetitiv von dem Inhibitor zu verdrängen. Die Elution erfolgt daher nach zwei Waschschritten durch einen Puffer mit hoher Arginin-Konzentration.

Das so aufgereinigte Enzym ließ im Coomassie-gefärbtem SDS-Gel keine Kontaminationen durch andere Proteine erkennen.

Herstellen des PKI(5-24)-Affinitätssäulenmaterials

Als Säulenmaterial wurde ein quervernetztes Agarosegel (Affi-Gel, BioRad) verwendet, an welches das Inhibitorpeptid PKI(5-24) über seine N-terminale primäre Aminogruppe mittels Amidbindung gebunden werden konnte. Die Kopplung erfolgt über die mit *N*-Hydroxysuccinimid aktivierten Carboxylgruppen (Aktivester) eines neutralen Spacers am Agarosematerial.

Die einzelnen Arbeitsschritte sind im Folgenden beschrieben.

- Waschen von 25 ml Affi-Gel 10 mit Bidest und anschließend mit 50 mM HEPES pH 6,5
- Ligandenlösung herstellen: ca. 20 mg PKI(5-24)-Peptid in ca. 20 ml 50 mM HEPES pH 6,5 lösen
- Affi-Gel 10 und Ligandenlösung mischen und 4 h auf dem Rotationsschüttler bei 4 °C inkubieren
- Entfernen des Überstandes durch Zentrifugation bei max. 2000 x g; Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 2.4.4) des Überstandes zur Ermittlung der Kopplungseffizienz: Vergleich des Proteingehaltes der Ligandenlösung vor und nach der Inkubation mit dem Gel; evtl. nochmalige Verwendung des Überstandes möglich
- Inkubation des Affi-Gels 10 mit 2,5 ml Ethanolamin pH 8 für 1 h bei RT auf dem Rotationsschüttler zur Blockierung noch verbliebener Aktivester
- Entfernen der Ethanolamid-Lösung und Waschen des Materials mit TMN 50-Puffer (siehe PKI(5-24)-Affinitätschromatographie) zur Entfernung des nicht gebundenen Peptids; Kontrolle durch Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 2.4.4) der Waschlösung möglich
- Lagerung des Materials bei 4 °C in TMN 50-Puffer

Das so hergestellte Material hatte üblicherweise eine Bindungskapazität von ca. 1 mg C α -Protein pro 1 ml Säulenmaterial.

PKI(5-24)-Affinitätschromatographie

Die verwendeten Puffer sowie die Durchführung werden im Weiteren beschrieben.

TMN 50-Puffer:

50 mM NaCl
2 mM MgCl₂
20 mM Tris pH 7,4

TMN 250-Puffer:

250 mM NaCl
2 mM MgCl₂
20 mM Tris pH 7,4

Arginin-Elutionspuffer:

200 mM Arginin
50 mM NaCl
1 mM EDTA
20 mM Tris pH 7,4

- Nach Ernte und Zellaufschluß der Expressionskulturen einschließlich anschließender Entfernung der Zelltrümmer durch Ultrazentrifugation (siehe 2.4.2.1) erfolgt die Bindung von C α an das Säulenmaterial im Batch-Verfahren. Dazu den Überstand mit dem Affi-Gel mischen und ATP und MgCl₂ zusetzen, Endkonzentrationen: 2 mM ATP, 3 mM MgCl₂
- Inkubation auf dem Rotationsschüttler für ca. 1 h bei RT
- Packen einer leeren Säule mit dem Gemisch aus Bakterienlysat-Überstand und Säulenmaterial
- Waschen der Säule mit 5 Säulenvolumen (Volumen des gepackten Säulenmaterials) TMN 50-Puffer, dem 400 μ M ATP zugesetzt wurde (TMN 50-Waschschritt; dabei Sammeln von 5 Fraktionen mit dem Volumen eines Säulenvolumens)
- Waschen der Säule mit 6 Säulenvolumen TMN 250-Puffer, dem 400 μ M ATP zugesetzt wurde (TMN 250-Waschschritt; dabei Sammeln von 6 Fraktionen mit dem Volumen eines Säulenvolumens)
- Elution mit 5 Säulenvolumen Arginin-Elutionspuffer (Eluat)

Das gewonnene Eluat wurde mit Centriprep 30 oder Centricon 30 (Millipore) ankonzentriert und ggf. in einen geeigneten Puffer gebracht. Die Ausbeute bei dieser Reinigung betrug beim Wildtypenzym üblicherweise ca. 5 mg C α -Protein pro 1 l Expressionskultur. Dabei konnte dieser Wert bei Verwendung des pET-28b(+)-Vektors durch sein höheres Expressionsniveau teilweise erheblich ansteigen. Die Lagerung des Enzyms erfolgte üblicherweise in PBS bei 4 °C nachdem die Probe sterilfiltriert worden war.

Abweichend von dieser Vorschrift wurde bei den Mutanten rC α E91Q-His und rC α E91A-His nicht nur das Eluat sondern auch Fraktionen der jeweiligen Waschschriffe zur weiteren Reinigung verwendet. Grund hierfür war die niedrige Affinität der Mutanten zum PKI(5-24)-Säulenmaterial und die damit einhergehenden geringen Anreicherungsfaktoren.

Bei dem TMN 50-Waschschritt werden bei der hier beschriebenen Affinitätschromatographie fünf Säulenvolumen (Volumen des gepackten Säulenmaterials) und bei dem TMN 250-Waschschritt sechs Säulenvolumen des jeweiligen Puffers aufgetragen, der jeweils zuvor mit 400 μ M ATP versetzt wurde. Dementsprechend wurden bei dem TMN 50-Waschschritt fünf Fraktionen und bei dem

TMN 250-Waschschrift sechs Fraktionen gesammelt. Das Volumen einer dieser Fraktionen war somit äquivalent zu einem Säulenvolumen.

Im Falle von rC α E91Q-His wurde mit allen Fraktionen des TMN 250-Waschschriftes weitergearbeitet. Die weitere Reinigung dieses Proteins zum Zwecke der kinetischen Charakterisierung erfolgte mittels der im nächsten Kapitel beschriebenen Ni²⁺-Affinitätschromatographie. Für die weitere Reinigung von rC α E91A-His wurden neben dem Eluat die vierte und fünfte Fraktion des TMN 50-Waschschriftes und alle Fraktionen des TMN 250-Waschschriftes verwendet. Die anschließende Isolierung dieser rC α -Mutante erfolgte zum Zweck der kinetischen Charakterisierung ebenfalls mittels der Ni²⁺-Affinitätschromatographie. Für Kristallisationsexperimente wurde die Trennung dieser Mutante vom Wildtyp durch ionenaustauscherchromatographische Methoden (2.4.2.4) erreicht.

2.4.2.3 Reinigung von His-tag-Protein aus PKI(5-24)-Affinitätschromatographie-eluat mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie

Bei Coexpressionen war ein zusätzlicher Reinigungsschritt zur Isolierung von His-tag-Protein aus dem Eluat der PKI(5-24)-Affinitätschromatographie nötig (siehe 2.4.1). Dazu wurde u.a. das Ni-NTA-Superflow-System (Qiagen) verwendet. Hierbei wird zunächst das von dem pET-28b(+)-Vektor codierte Fusionsprotein mit seinem 6xHis-tag bei einem geeigneten pH-Wert an die am Säulenmaterial immobilisierten Nickelionen gebunden. Nach dem Waschen kann das an das Säulenmaterial gebundene Protein durch Zusatz von Imidazol kompetitiv verdrängt und somit eluiert werden. Zur Unterstützung dieses Effektes wird gleichzeitig der pH-Wert verringert, so daß die Histidinreste protoniert vorliegen und so für eine Bindung nicht mehr zur Verfügung stehen.

Das Verfahren sowie die erforderlichen Puffer werden im Folgenden beschrieben, weitere experimentelle Details sind dem Handbuch zu entnehmen.

Ni-NTA-Aufschlußpuffer:

500 mM	NaCl
10 mM	Imidazol
50 mM	Na-Phosphatpuffer pH 8,0

Ni-NTA-Waschpuffer:

500 mM	NaCl
20 mM	Imidazol
10 % (v/v)	Glycerin
50 mM	Na-Phosphatpuffer pH 6,45

Ni-NTA-Elutionspuffer:

500 mM	NaCl
100 mM	Imidazol
10 % (v/v)	Glycerin
50 mM	Na-Phosphatpuffer pH 7,3

- Umpuffern des PKI(5-24)-Affinitätschromatographieeluates in Ni-NTA-Aufschlußpuffer mittels Centriprep 30 oder Centricon 30 (Millipore); das zur Nickel-Affinitätschromatographie verwendete Protein sollte frei sein von DTT, da dieses in hohen Konzentrationen die Nickelionen reduziert und somit eine Bindung des His-tags verhindert
- Equilibrieren des Säulenmaterials mit ca. 5 bis 10 Säulenvolumen (Volumen des gepackten Säulenmaterials) Ni-NTA-Aufschlußpuffer (Bindungskapazität des Materials für His-tag-Proteine: ca. 5 bis 10 mg Protein pro ml Material)
- Binden des His-tag-Proteins an das Säulenmaterial im Batch-Verfahren: Mischen des umgepufferten Proteins und des Säulenmaterials, danach Inkubation für ca. 1 h bei 4 °C
- Packen einer leeren Säule mit dem Material
- Waschen mit 10 Säulenvolumen Ni-NTA-Waschpuffer (dabei Sammeln von 10 Fraktionen mit dem Volumen eines Säulenvolumens)
- Elution mit 10 Säulenvolumen Ni-NTA-Elutionspuffer (Eluat)

Das so isolierte His-tag-Protein zeigte im Coomassie-gefärbten SDS-Gel keine Kontamination durch Protein ohne His-tag und wurde zur Lagerung in PBS umgepuffert und sterilfiltriert.

2.4.2.4 Reinigung von PKI(5-24)-Affinitätschromatographieeluatens mittels Mono-S-Ionenaustauscherchromatographie

Die Eluate der PKI(5-24)-Affinitätschromatographie enthalten katalytische Untereinheit verschiedener Phosphorylierungsstufen. Diese können durch eine Ionenaustauscherchromatographie getrennt werden (Herberg *et al.*, 1993). Dazu wurden die Mono-S®-FPLC-Säulen HR 10/10 und HR 5/5, die beide ein starkes Kationenaustauscherharz enthalten und eine maximale Bindungskapazität von ca. 10 mg bzw. ca. 4 mg Protein haben, kombiniert mit einer FPLC-Anlage bzw. dem Äkta Explorer-System (siehe 2.1.6) verwendet. Gleichzeitig ist es möglich bei Verwendung des entsprechenden pH-Wertes und eines geeigneten Elutionsgradienten, mit diesem System C α -Protein mit His-tag von C α -Protein ohne His-tag zu trennen. Dazu wurden

die unten näher beschriebenen Verfahren I und II mit den entsprechenden Puffersystemen und Elutionsbedingungen entwickelt und eingesetzt.

Allgemein wurde die Säule zunächst mit Puffer A equilibriert. Nach der unten im Einzelnen aufgeführten Probenvorbereitung folgte ein Zentrifugationsschritt (je nach Probenvolumen in einer Eppifuge bei ca. 14000 x g, 5 min oder in einer Ultrazentrifuge, Beckmann L8-55, Rotor TI 45, 35000 rpm, 60 min, 4 °C). Die Auftragung des Überstandes erfolgte - wiederum abhängig von dem Probenvolumen - entweder manuell oder mittels einer Probenauftragsäule. Es wurde üblicherweise eine Flußrate von 0,5 - 1,0 ml/min gewählt. Nach der Chromatographie wurde die Säule durch mehrmaliges Auftragen von 1 N NaOH bei 50 % Puffer A bzw. B regeneriert und anschließend in 25 % Ethanol gelagert.

Verfahren I

Bei Anwendung dieses Verfahrens wird durch den pH-Wert des Puffersystems eine selektive Bindung von C α -Protein ohne His-tag an die Säulenmatrix erreicht. C α -Protein mit His-tag bindet nicht und befindet sich dementsprechend im Durchlauf, d.h. mit diesem Verfahren ist nur eine Gewinnung bzw. Reinigung von C α ohne His-tag möglich.

Die Probe wird zunächst mit Centriprep 30 ankonzentriert und dann 1:4 mit Bidest verdünnt, um die Salzkonzentration zu verringern und so eine Bindung an das Säulenmaterial zu ermöglichen. Das Auftragen der Probe erfolgt bei 100 % Puffer A.

Puffer A:

20 mM Bis-Tris-Propan pH 8,5

Puffer B:

20 mM Bis-Tris-Propan pH 8,5
1 M LiCl

Die Puffer wurden sterilfiltriert und entgast.

Elutionsgradient:
(für HR 10/10 bei
0,6 ml/min)

Volumen [ml]	Puffer B [%]
bei 0	0
50	25
60	100
70	100

Verfahren II

Durch diese Vorgehensweise wird sowohl $C\alpha$ mit His-tag als auch $C\alpha$ ohne His-tag an die Säulenmatrix gebunden. Das Verfahren bietet also neben der Reinigung die Möglichkeit des Trennens und gleichzeitigen Gewinnens sowohl von $C\alpha$ - als auch von $C\alpha$ -His-Protein.

Die Probe wird zunächst mit Centriprep 30 ankonzentriert und dann 1:4 mit MES/Bis-Tris-Puffer pH 6,2 verdünnt, so daß die Pufferendkonzentration bei 20 mM liegt. Das Auftragen der Probe erfolgt bei 5 % Puffer B.

Puffer A:

20 mM MES pH 6,2

Puffer B:

20 mM MES pH 6,2
1 M Arginin

Die Puffer wurden sterilfiltriert und entgast.

Elutionsgradient:
(für HR 5/5 bei
0,5 ml/min)

Volumen [ml]	Puffer B [%]
bei 0	5
25	100
28	100

Elutionsgradient:
(für HR 10/10 bei
1,0 ml/min)

Volumen [ml]	Puffer B [%]
bei 0	5
10	20
100	60
120	100
125	100

2.4.3 Ankonzentrieren und Umpuffern von Proteinen

Je nach Probenvolumen wurden Centriprep 30 oder Centricon 30 (Ausschlußgröße: 30 kDa; beide Millipore) in Kombination mit den entsprechenden Zentrifugationsschritten (Centriprep 30: 1500 x g; Centricon 30: 5000 x g) verwendet. Gegebenenfalls wurden die Konzentratoren mehrmals mit der Probe befüllt, bis das gesamte Probenvolumen auf das Minimalvolumen des Konzentratoren gebracht worden war. Zum Umpuffern wurde das Konzentrat dann in dem gewünschten Puffer aufgenommen. Dieser Vorgang wurde zur vollständigen Umpufferung mehrmals wiederholt.

2.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte nach Bradford (1976, modifiziert). Bei diesem Verfahren bindet der Farbstoff Coomassie G an das Protein und verursacht so eine Verschiebung des Farbstoff-Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm. Die Konzentration dieser nach ca. zwei Minuten entstandenen Farbstoffkomplexe ist der Proteinkonzentration proportional. Auf diese Weise kann durch die Bestimmung der Absorption bei 595 nm gegen eine Referenz unter Zuhilfenahme einer zuvor ermittelten Protein-Eichkurve auf die Proteinkonzentration der Probe geschlossen werden. Als Referenz diente ein Ansatz ohne Proteinprobenzusatz, d.h. mit dem entsprechenden Volumen Bidest bzw. Puffer.

Die Bestimmung der Absorption fand nach frühestens zwei Minuten statt. Es konnte mittels Dreifachbestimmungen eine Proteinmenge von maximal 8 µg pro Ansatz zuverlässig ermittelt werden.

Bradford-Reagenz:		Meßansatz:	
55 % (w/v)	Phosphorsäure	x µl	Probe (ggf. verdünnt)
15 % (w/v)	Methanol		bzw. Puffer
250 mg	Coomassie G	40 µl	Bradford-Reagenz
x ml	Bidest	160 - x µl	Bidest
<hr/>		<hr/>	
500 ml		200 µl	

2.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erlaubt die Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen und wird u.a. zur Molekulargewichtsbestimmung, zur Prüfung des Reinheitsgrades von Protein-Präparationen oder als Grundlage für einen sich anschließenden Western-Blot eingesetzt. Die Proben werden mit SDS und DTT versetzt und in der Regel für einige Minuten auf 95 °C erhitzt, so daß sich die Proteine entfalten, eine negative Nettoladung erhalten und Disulfidbrücken gelöst werden. Anschließend erfolgt unter Einfluß eines angelegten elektrischen Feldes die Auftrennung in der Gelmatrix. Die verwendete Tris/Glycin SDS-PAGE wurde nach einer leicht modifizierten Methode von Laemmli (Laemmli 1970; Laemmli and Favre, 1973) durchgeführt. Dabei werden die Trenneigenschaften zweier kombinierter Gele mit einem diskontinuierlichen pH- und Konzentrationsübergang genutzt.

Für die Elektrophorese wurde das modulare Mini-PROTEAN II Elektrophoresesystem von Bio-Rad verwendet. Die Gele besitzen dabei Abmessungen von 9 x 6 cm und eine Dicke von 0,75 mm. Die Trennung erfolgte bei 200 V und 120 mA.

5 %iges Sammelgel:

6,14 ml	Bidest
1,70 ml	30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid
2,00 ml	0,625 M Tris pH 6,8
0,10 ml	10 % SDS
0,10 ml	10 % APS
0,01 ml	TEMED
<hr/>	
ca. 10 ml	

12 %iges Trenngel:

0,8 ml	Bidest
4,0 ml	30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid
5,0 ml	0,75 M Tris pH 8,8
0,1 ml	10 % SDS
0,1 ml	10 % APS
4,0 µl	TEMED
<hr/>	
ca. 10 ml	

5x Probenpuffer:

250 mM	Tris/Glycin-Puffer pH 6,8
60 % (w/v)	Glycerin
20 % (w/v)	SDS
0,2 % (w/v)	Bromphenolblau
200 mM	DTT

1x Tris/Glycin-Laufpuffer:

25 mM	Tris
0,1 % (w/v)	SDS
250 mM	Glycin

Der Probenpuffer wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.4.6 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung stellt eine schnell durchzuführende Methode dar, um Proteine im SDS-Gel anzufärben und zu quantifizieren. Die Gele wurden für ca. 30 Minuten in der Färbelösung inkubiert und danach so lange mit Entfärber gewaschen, bis der Hintergrund Coomassie-frei war. Die Entfärbung kann durch ein Anheben der Temperatur auf 60 °C (Wasserbad) beschleunigt werden. Zur Dokumentation wurden die SDS-Gele getrocknet, fotografiert oder eingescannt.

Coomassie-Färbelösung:

0,2 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blau R 250
40 % (v/v)	2-Propanol
10 % (v/v)	Essigsäure

Entfärber:

7 % (v/v)	2-Propanol
7 % (v/v)	Essigsäure

2.4.7 Western Blot

Für immunologische Untersuchungen wurden Proteine nach erfolgter SDS-PAGE aus der Gelmatrix mittels Western Blot auf eine Membran gebracht. In dieser Arbeit wurde

dazu ein Semi-dry-System verwendet, bei dem die Proteine analog zur Gelelektrophorese in einem elektrischen Feld wandern und so auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid-Membran, Immobilon-P, Millipore) transferiert werden.

Blotaufbau

Auf die Anodenplatte (+) wurden die Komponenten in folgender Reihenfolge aufgelegt:

- drei Blottingpapiere (Whatman 3 MM, GB), getränkt mit Transferpuffer (s.u.)
- zwei Blottingpapiere, getränkt mit 1:10 verdünntem Transferpuffer
- PVDF-Membran, zuvor mit 2-Propanol und danach mit Bidest gespült
- SDS-Gel, zuvor 15 min in Transferpuffer inkubiert
- zwei Blottingpapiere, getränkt mit 1:10 verdünntem Transferpuffer
- drei Blottingpapiere, getränkt mit Transferpuffer, Katodenplatte (-)

Transferpuffer:

250 mM	Tris pH 10,4
20 % (v/v)	2-Propanol

Der Transfervorgang erfolgte bei 200 mA für 1,5 – 2 Stunden.

Immunologischer Nachweis

Um zunächst den Erfolg des Proteintransfers zu überprüfen, können die Proteine auf der Membran mit Amidoschwarz angefärbt und danach durch Wässern wieder entfärbt werden.

Amidoschwarz-Färbelösung:

0,01 % (w/v)	Amidoschwarz
40 % (v/v)	Methanol
10 % (v/v)	Essigsäure

TBS/T:

150 mM	NaCl
50 mM	Tris pH 7,4
0,05 % (v/v)	Tween 20

Die sich anschließenden Waschschriffe und Inkubationen mit den Antikörpern sind im Folgenden aufgeführt.

- Absättigen freier Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in 2 % (w/v) BSA in TBS/T (s.o.) für 1 h bei RT oder üN bei 4 °C
- 3 x 10minütiges Waschen mit TBS/T
- Inkubation mit dem Primärantikörper einer geeigneten Verdünnung in 2 % (w/v) BSA in TBS/T für ca. 30 min
- 3 x 10minütiges Waschen mit TBS/T
- Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung siehe Primärantikörper) für 30 - 60 min
- 3 x 10minütiges Waschen mit TBS/T
- Inkubation in der Detektionslösung (s.u.) für ca. 1 min

Für die Detektion wurde das ECL-Chemilumineszenz-System (Amersham) verwendet. Die Nachweislösung besteht aus Luminol, Wasserstoffperoxid und Phenolen, die Verstärkerfunktion haben. Das Prinzip beruht darauf, daß Luminol durch die Peroxidase des Sekundärantikörpers oxidiert wird, wodurch es in einen angeregten Zustand überführt wird. Beim Übergang in den Grundzustand wird Licht der Wellenlänge 428 nm emittiert, das mit Hilfe eines Röntgenfilmes (Kodak-X-Omat AR, Kodak) detektiert werden kann.

Um nach der Detektion die Antikörper von der Membran zu entfernen und eine erneute Inkubation mit Antikörpern zu ermöglichen, kann die Membran mit Stripping-Puffer behandelt werden. Dauer der Inkubation und die hierbei gewählte Temperatur sind von den jeweiligen Antikörpern abhängig. Als allgemeine Vorschrift kann jedoch eine Inkubation über Nacht bei 4 °C angesehen werden.

Stripping-Puffer:

0,2 M	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS
1,0 % (v/v)	Tween 20

2.4.8 Massenspektrometrische Untersuchungen

Die massenspektrometrischen Untersuchungen mittels Nano-ESI wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. W. D. Lehmann und Herrn A. Schlosser (Abteilung Zentrale Spektroskopie, DKFZ Heidelberg) durchgeführt. Die Proben wurden zunächst mit Hilfe von C₁₈-ZipTips entsalzt und dann an einem Q-TOF II (Micromass, UK) im Positivmodus gemessen.

2.4.9 Proteinkinase-Aktivitätsassay

Der Proteinkinase-Aktivitätsassay - im Folgenden kurz Aktivitätsassay genannt - diente der Ermittlung kinetischer Parameter wie der Michaelis-Konstanten (K_M) und der spezifischen Maximalgeschwindigkeit (v_{max}). Er fand als Blättchentest in Anlehnung an Glass *et al.* (1978) Anwendung. Die katalytische Untereinheit wird zunächst in Gegenwart von Magnesiumchlorid mit den Substraten Kemptid (synthetisches Peptid, Sequenz siehe Anhang) und $[\gamma^{32}P]$ -ATP inkubiert. Anschließend wird durch Zugabe von einmolarer nicht radioaktiv markierter ATP-Lösung und durch Überführen der Reaktionsansätze auf Eis die weitere Entstehung von radioaktiv markiertem Peptisubstrat weitestgehend unterdrückt und somit die meßbare Reaktion praktisch gestoppt. Nach der Bindung des Peptids an Phosphocellulose und nach wiederholten Waschschrinen zur Reduzierung nicht Peptid-gebundener Radioaktivität kann die Menge an radioaktivem Phosphosubstrat auf der Phosphocellulose durch Flüssigkeitsszintillationszählung und unter Zuhilfenahme einer Eichkurve bestimmt werden.

Der Assay wurde der jeweiligen Fragestellung angepaßt (siehe 3.1.2). Die Regression der Meßdaten erfolgte nach den folgenden Gleichungen unter Verwendung der Software Grafit 3.03.

Für Meßreihen zur zeitabhängigen Phosphorylierung:

$$A_t = A_{max} (1 - e^{-k t}) \quad (\text{Gleichung 2.1})$$

A_t : Menge des umgesetzten Substrates zum Zeitpunkt t

A_{max} : Menge des umgesetzten Substrates zum Zeitpunkt $t = \infty$

k : Geschwindigkeitskonstante

Für Meßreihen zur Bestimmung von K_M und v_{max} :

$$v = v_{max} \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Gleichung 2.2})$$

v : Reaktionsgeschwindigkeit

v_{max} : Spezifische Maximalgeschwindigkeit

$[S]$: Substratkonzentration

K_M : Michaeliskonstante

Grundsätzlich wurde für jeden Meßwert zur Ermittlung der radioaktiven Hintergrundstrahlung auch der entsprechende Blindwert (d.h. der identische Ansatz, aber ohne Enzym-Zusatz) gemessen. Es wurden pro Meßwert bzw. Blindwert Dreifachbestimmungen vorgenommen. Alle mit Hilfe dieser Methode ermittelten im Ergebnisteil angegebenen kinetischen Parameter (K_M und v_{max}) stellen Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Meßreihen dar.

Der in der $[\gamma^{32}P]$ -ATP-Stocklösung enthaltene Anteil an nicht radioaktiv markiertem ATP wurde beim Einstellen der ATP-Konzentration nicht berücksichtigt.

2x Aktivitätsassay-Puffer:

20 mM Mg-Acetat
100 mM MOPS pH 6,8

ATP/ $[\gamma^{32}P]$ -ATP-Mix:

x μ M ATP
0,001 - 0,4 μ Ci/ μ l $[\gamma^{32}P]$ -ATP

Der Puffer wurde aliquotiert und bei - 20 °C gelagert.

Aliquots unterschiedlicher Konzentrationen des ATP/ $[\gamma^{32}P]$ -ATP-Mix wurden im Szintillationszähler gemessen, um eine Eichgerade zu erstellen, die es erlaubte, die Korrelation zwischen einer definierten molaren Menge ATP und der entsprechenden Zahl gemessener radioaktiver Zerfälle pro Minute (cpm) herzustellen. Da davon ausgegangen werden kann, daß das Verhältnis zwischen markiertem und nicht markiertem ATP auch bei radioaktiv markiertem und radioaktiv nicht markiertem Phosphopeptid vorliegt, ist es möglich mit dieser Eichgerade über die ermittelten Zählwerte der Ansätze auf die molare Menge an phosphoryliertem Substrat pro Ansatz zu schließen.

Reaktionsansatz:

50 μ l	2x Aktivitätsassay-Puffer
1 mM	DTT
y μ M	Kemptid
20 - 50 ng	rC α
z μ l	Bidest
10 μ l	ATP/ $[\gamma^{32}P]$ -ATP-Mix (s.o.), Zugabe erst zum Start der Reaktion
<hr/> 100 μ l	

Die experimentelle Durchführung ist nachstehend beschrieben.

- Pipettieren der Reaktionsansätze ohne ATP/[γ ³²P]-ATP-Mix auf Eis
- Vorinkubation der Ansätze für genau 5 min bei 30 °C im Heizblock
- Start der Reaktion durch Zugabe von 10 µl ATP/[γ ³²P]-ATP-Mix
- Inkubation für genau 2 min bei 30 °C
- Abstoppen der meßbaren Reaktion durch Zugabe von 10 µl 1 M ATP pH 6,8, nicht radioaktiv markiert
- Pipettieren von 80 µl je Reaktionsansatz auf Phosphocellulose-Blättchen (P 81 Chromatographiepapier, Kationenaustauscher, Whatman; 2 x 2 cm), die mittels Nadeln zuvor auf eine Styroporplatte gesteckt wurden
- Trocknen der Blättchen für ca. 20 min bei RT
- wiederholtes Waschen der Blättchen mit 30 %iger Essigsäure (5 x 2 min) in einem Weithalslerlenmeyerkolben
- Überführen der Blättchen in 5 ml-Szintillatorröhrchen, Zugabe von 4 ml Szintillatorflüssigkeit (Aquasafe 500 plus, Zinsser Analytic)
- Messen der Proben im Szintillationszähler (Liquid Szintillation Counter Rackbeta 1212, LKB Wallac)

2.4.10 Isotherme Titrationscalorimetrie (ITC)

Experimente mit einem isothermen Titrationscalorimeter waren im Rahmen von Produktvorführungen der Firma MicroCal (Heath Scientific Company Ltd, UK) möglich. Dabei wurde mit dem VP Isothermal Titration Calorimetry System gearbeitet. Das Prinzip dieser Messungen beruht auf der Tatsache, daß bei jeder Art von kovalenten oder nicht-kovalenten Veränderung von Molekülen - also auch bei intermolekularen Interaktionen - Wärme entweder freigesetzt oder absorbiert wird. Dieser Vorgang kann mit dem o.g. Gerät detektiert werden. Dazu wird in einer Meßzelle einer der beiden Interaktionspartner zunächst vorgelegt und der andere anschließend zutitriert. Die Wärme, die in der Meßzelle durch eine Interaktion entweder freigesetzt oder absorbiert wird, wird gegen eine Referenzzelle, die nur Puffer enthält, gemessen. Beide Zellen sind dazu von einer adiabatischen Ummantelung umgeben, die einen Wärmeaustausch mit der Umgebung verhindert und darüber hinaus mit einem elektrischen Element versehen, das als Kühlung sowie als Heizung fungieren kann. Es wird nun die elektrische Energie bestimmt, die notwendig ist, die Temperatur der Meßzelle gegenüber der Referenzzelle konstant zu halten, während mittels einer computergesteuerten motorgetriebenen Präzisionspritze der zweite Bindungspartner zutitriert wird bis der in der Meßzelle vorgelegte erste Bindungspartner damit gesättigt ist. Das hierdurch erhaltene Muster elektrischer Impulse gibt nach Integration und Regression Auskunft über die Enthalpie (ΔH), die Entropie (ΔS) und die

Assoziationsgleichgewichtskonstante (K_A) bzw. die Dissoziationsgleichgewichtskonstante (K_D) der Bindung. Details sind nachzulesen z.B. bei Jelesarov and Bosshard (1999).

Es wurden Experimente zur Interaktion der katalytischen Untereinheit $C\alpha$ von PKA, mit ATP, ADP und PKI(5-24) bzw. mit Kombinationen dieser Komponenten durchgeführt. Die katalytische Untereinheit wurde hierzu in der Meßzelle in einer Konzentration von 50 μ M (Volumen ca. 2,2 ml) vorgelegt, die Bindungspartner wurden jeweils in einer Konzentration von 1 mM (Volumen ca. 0,7 ml) in die Präzisionspritze gefüllt. Als Puffer für die Experimente diente ein Phosphatpuffer, dem DTT und $MgCl_2$ zugesetzt war. Zur Vermeidung von Störungen des Meßsignals durch Verdünnungseffekte war es nötig, die Bindungspartner in exakt identischen Puffern einzusetzen. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von entweder 25 oder 30 °C durchgeführt.

ITC-Puffer:

10 mM	Na-Phosphat pH 7,4
150 mM	NaCl
10 mM	$MgCl_2$
1 mM	DTT

2.4.11 Resonant Mirror Affinography (RMA)

Die Resonant Mirror Affinography ist eine Methode, die auf einem optischen Biosensor basiert und die es erlaubt, Interaktionen zwischen einem auf der Sensoroberfläche immobilisierten Liganden und einem freien Analyten in Echtzeit zu untersuchen. Die Messungen wurden durchgeführt mit dem computergesteuerten robotergestützten IAsys Auto⁺-System (Affinity Sensors, UK). Es handelt sich hierbei um ein gerührtes Küvettenystem mit zwei Meßzellen, bei dem der Küvettenboden die sogenannte Resonant Mirror Optik enthält. Mit dieser ist es möglich, mittels eines Lasers Änderungen im Brechungsindex und/oder der Dicke der Matrix in einem Bereich von einigen hundert Nanometern an der Sensoroberfläche zu detektieren. Die Bindung von freiem Analyten an den auf der Matrix der Sensoroberfläche immobilisierten Liganden oder auch das Dissoziieren von zuvor gebundenen Analyten führt auf diese Weise zu einem Signal (Response, gemessen in Winkelsekunden: arc seconds), das zeitabhängig aufgenommen wird. Die so erhaltenen Assoziations- und Dissoziationskurven werden für verschiedene Konzentrationen des Analyten gemessen und anschließend kinetisch und/oder thermodynamisch ausgewertet (s.u.). Daraus lassen sich Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{diss}), Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{ass}) und Dissoziations-

gleichgewichtskonstanten (K_D) ableiten, die die Interaktion zwischen Ligand und Analyt beschreiben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit RMA-basierten Assays die Bindung zwischen rC α und PKI(5-24) in Gegenwart von Mg²⁺ und ATP (Ausnahme: siehe 3.2.3) und rC α und ATP in Gegenwart von PKI(5-24) und Mg²⁺ charakterisiert. Für die Bezeichnung der entsprechenden kinetischen Parameter wird - auch im Folgenden - z.B. K_D PKI(5-24) bzw. K_D ATP verwendet.

Details zum Geräteaufbau, zur Funktionsweise und Anwendung sowie zu den mathematischen Grundlagen der Datenauswertung sind den Gerätehandbüchern bzw. der Literatur zu entnehmen (z.B. Cush *et al.*, 1993; Buckle *et al.*, 1993; Edwards *et al.*, 1995).

Sowohl die Immobilisierungen als auch die anschließenden Messungen der Assoziations- und Dissoziationskinetiken wurden vollautomatisch mit Hilfe sogenannter Scripte durchgeführt. Diese Programme waren im Lieferumfang des IAsys Auto⁺ enthalten und sind entweder unverändert übernommen oder durch Veränderungen speziell auf die Bedürfnisse des Experimentes zugeschnitten worden. Im letzteren Fall tragen die Scripte das Kürzel "TS" vor der ursprünglichen Herstellerbezeichnung und ggf. am Ende des Namens eine Ziffer, die die Version angibt. Die verwendeten Scripte sind im Anhang aufgeführt. Ebenfalls dort zu finden sind die für alle Messungen geltenden Geräte-Grundeinstellungen des IAsys Auto⁺.

Immobilisierung des Liganden

Der typische Ablauf einer Immobilisierung des Liganden PKI(5-24) auf der Carboxymethyldextran-Matrix der verwendeten Küvetten sowie die eingesetzten Puffer und Lösungen sind im Folgenden aufgeführt. Die für die Immobilisierung wichtigen Parameter sind unter 3.1.3.1 näher beschrieben.

RMA-Laufpuffer:

10 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,4
150 mM NaCl
0,05 % (v/v) Tween 20

RMA-Immobilisierungspuffer:

5 mM Maleinsäure pH 6,0
3 mM EDTA

Aktivierungsstocklösungen:

400 mM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-
carbodiimid (EDC)
100 mM N-Hydroxysuccinimid (NHS)

Blockierungslösung:

1 M Ethanolamin pH 8,5

- Equilibrieren der CMD-Matrix mit Hilfe des Scriptes TScellsave.rms (siehe Anhang); Einstellung der Variablen vom INPUT-TABLE des Scriptes so daß alle ca. 20 min ein Pufferwechsel mit RMA-Laufpuffer erfolgt; Dauer des Equilibrierungsvorganges ca. 1,5 h
- Überprüfen der Qualität der Küvette mittels eines Resonance Scans (siehe Gerätehandbücher)
- Starten des Scriptes ImmoCMD.rms oder ImmoCMDboth.rms (siehe Anhang), Einstellung der Variablen vom INPUT-TABLE des Scriptes so daß der im Weiteren beschriebene Ablauf durchgeführt wird
- Aktivierung der Carboxylgruppen der CMD-Matrix durch Inkubation mit dem NHS/EDC-Mix (50 mM NHS, 200 mM EDC) für 2 x 7 min
- Umpuffer von RMA-Laufpuffer auf RMA-Immobilisierungspuffer
- Zugabe des Liganden in geeigneter Konzentration bei entsprechender Inkubationsdauer (Peptid von Herrn Dr. R. Pipkorn: 100 µg/ml Endkonzentration für 2,5 min; Peptid von Firma Sigma: 500 µg/ml Endkonzentration für 5 min)
- Umpuffer von RMA-Immobilisierungspuffer auf RMA-Laufpuffer
- Blockieren restlicher aktivierter Carboxylgruppen mit der Blockierungslösung für 3 min
- Lagerung der Küvette in RMA-Laufpuffer bei 4 °C

Die so hergestellten Küvetten konnten ca. vier bis acht Wochen lang für Messungen von Assoziations- und Dissoziationskinetiken verwendet werden.

Die Positionen im Gerät, an denen die verwendeten Reagenzien für den Ablauf des jeweiligen Scriptes anzuordnen sind, sind dem INPUT-TABLE des jeweiligen Scriptes bzw. den Gerätehandbüchern zu entnehmen.

Messen von Assoziations- und Dissoziationskinetiken

Die Messungen erfolgten unter Anwendung des Scriptes TSbindcontrol2.rms (siehe Anhang). Dabei wird in beiden Meßzellen parallel derselbe Versuchsablauf mit identischen Lösungen durchgeführt, wobei eine Meßzelle ggf. als Kontrolle, d.h. mit einer Matrix, auf der kein Ligand immobilisiert wurde, verwendet werden kann. Die Parameter des INPUT-TABLES wurden so eingestellt, daß der im Folgenden beschriebene experimentelle Ablauf unter Verwendung der ebenfalls aufgeführten Puffer durchgeführt wurde. Angaben zum generellen Aufbau der Bindungsassays sind unter 3.1.3.2 aufgeführt.

RMA-Assoziations-/Dissoziationspuffer:

10 mM	Na-Phosphatpuffer pH 7,4
150 mM	NaCl
0,05 % (v/v)	Tween 20
1 mM	DTT
15 mM	MgCl ₂
x nM/μM	ATP (je nach Ansatz bzw. Wahl des Analyten)

RMA-Regenerationspuffer:

20 mM	Tris pH 7,4
200 mM	Arginin
50 mM	NaCl
1 mM	EDTA

- Umpuffern der Meßzellen von RMA-Laufpuffer (siehe Immobilisieren des Liganden) auf RMA-Assoziations/Dissoziationspuffer; Anbieten von unterschiedlichen ATP-Konzentrationen (Bereich: ca. 0,1 x bis 10 x erwartete K_D) von Meßansatz zu Meßansatz falls ATP als Analyt verwendet wird; soll Protein als Analyt genutzt werden, liegt ATP im Überschuß (mindestens ca. 10 x K_D ATP) bei konstant 200 μM oder 1 mM vor
- Aufnahme der Basislinie für 5 min
- Start der Assoziation durch Zugabe von Protein (5 μl Proteinlösung auf 45 μl Assoziations/Dissoziationspuffer in den Meßzellen); Variation der Proteinkonzentration (Bereich: 0,1 x bis 10 x erwartete K_D), wenn Protein als Analyt dient; Messungen, bei denen ATP als Analyt verwendet wird, werden in Gegenwart eines konstanten Proteinüberschusses (ca. 10 x K_D PKI(5-24)) durchgeführt; die Proteinvorverdünnungen erfolgen ebenfalls in Assoziations/Dissoziationspuffer
- Aufnahme der Assoziationskinetik für 10 min
- Start der Dissoziation durch Entfernen von Protein, das nicht an den immobilisierten Inhibitor gebunden ist; dazu Waschen der Meßzellen mit Assoziations/Dissoziationspuffer
- Aufnahme der Dissoziationskinetik für 5 min
- Regeneration der Oberfläche durch kompetitives Verdrängen des Proteins von dem Inhibitor mit Hilfe einer hohen Argininkonzentration (siehe auch 2.4.2.2); dazu Umpuffern auf den RMA-Regenerationspuffer und anschließende 5minütige Inkubation
- Umpuffern von RMA-Regenerationspuffer auf RMA-Laufpuffer

Diese experimentelle Abfolge (Zyklus) kann - je nach Anzahl der zu untersuchenden unterschiedlichen Analytkonzentrationen - bei Verwendung von Eppendorf-Tubes zur Aufbewahrung der Proben bis zu 24 Mal durchlaufen werden. Die Reihenfolge, in der die Positionen in den geräteinternen Probenaufbewahrungs-Trays A und B (siehe Gerätehandbücher) von dem Programm abgearbeitet werden ist 1,1 - 4,1; 1,2 - 4,2; 1,3 - 4,3; 1,4 - 4,4. Dabei stellt die Ziffer vor dem Komma jeweils die x- und die Ziffer nach dem Komma die y-Koordinate in einem Koordinatensystem dar, das seinen Nullpunkt bei Aufsicht in der linken unteren Ecke des jeweiligen Trays hat. Tray A

beinhaltet die Proteinproben während Tray B die entsprechenden Proben des Assoziations/Dissoziationspuffers enthält. Die Proteinprobe und der zugehörige Assoziations/Dissoziationspuffer eines Meßansatzes weisen die gleichen x,y-Koordinaten in ihrem Aufbewahrungs-Tray auf, d.h. für die Proteinprobe mit der Position 1,1 in Tray A wird der Assoziations/Dissoziationspuffer mit der Position 1,1 in Tray B verwendet. Der Regenerationspuffer wird den Positionen Reagent A[1] und/oder Reagent A[2] (siehe Gerätehandbücher) entnommen.

Auswertung der Daten mit Hilfe der FASTfit-Software, Version 2.03

Die Daten, die bei den **Assoziationsmessungen** aufgenommen wurden, konnten einer *kinetischen* und/oder einer *thermodynamischen Auswertung* unterzogen werden. Beide Arten der Auswertung liefern letztlich einen Wert für die Dissoziationsgleichgewichtskonstante (K_D), der im Idealfall mit dem durch die jeweils andere Methode ermittelten identisch sein sollte. Im Folgenden werden diese Konstanten oder andere kinetische Parameter, die mit Hilfe unterschiedlicher Auswertungsmethoden ermittelt werden konnten, mit dem hochgestellten Zusatz "kin" oder "therm" versehen (z.B. K_D^{kin} oder K_D^{therm}), um auf die Art der Auswertung, aus denen diese Werte hervorgehen, hinzuweisen.

Bei der *kinetischen Auswertung* wurde mit den Bindungskurven (Winkelsekunden vs. Zeit) zunächst jeweils eine Regression durchgeführt, der eine der folgenden Funktionen zugrunde liegt. Dabei wurde ein 1:1 Bindungsmodell und eine einphasige bzw. zweiphasige Assoziation (siehe Gerätehandbücher) angenommen.

$$R_t = R_0 + E (1 - e^{-k_{on} t}) \quad (\text{Gleichung 2.3})$$

R_t (Response_t): RMA-Signal zum Zeitpunkt t
 R_0 (Response₀): RMA-Signal zum Zeitpunkt t = 0
 E (Extent): Betrag der assoziationsbedingten RMA-Signaländerung
 k_{on} : Apparente Assoziationsgeschwindigkeitskonstante

$$R_t = R_0 + E_1 (1 - e^{-k_{on1} t}) + E_2 (1 - e^{-k_{on2} t}) \quad (\text{Gleichung 2.4})$$

R_t (Response_t): RMA-Signal zum Zeitpunkt t
 R_0 (Response₀): RMA-Signal zum Zeitpunkt t = 0
 E_1 bzw. E_2 (Extent 1 bzw. Extent 2): Betrag der assoziationsbedingten RMA-Signaländerung der ersten Phase bzw. zweiten Phase
 k_{on1} bzw. k_{on2} : Apparente Assoziationsgeschwindigkeitskonstante der ersten bzw. zweiten Phase der Assoziation

Im Falle einer zweiphasigen Assoziation wurde lediglich die Apparente Assoziationsgeschwindigkeitskonstante der ersten "schnellen" Phase (k_{on1}) bei der weiteren Auswertung berücksichtigt. Die bestimmten apparenten Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{on} bzw. k_{on1}) wurden gegen die zugehörigen Analytkonzentrationen aufgetragen. Im linearen Bereich dieser Darstellung folgte eine Regression nach der Formel:

$$k_{on} \text{ bzw. } k_{on1} = k_{ass}^{kin} [\text{Analyt}] + k_{diss}^{kin} \quad (\text{Gleichung 2.5})$$

k_{on} bzw. k_{on1} : Apparente Assoziationsgeschwindigkeitskonstante (der ersten Phase der Assoziation)

k_{ass}^{kin} : Assoziationsgeschwindigkeitskonstante, ermittelt durch kinetische Auswertung

[Analyt]: Konzentration des Analyten

k_{diss}^{kin} : Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante, ermittelt durch kinetische Auswertung

Mit Hilfe der so ermittelten "kinetischen" Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten konnte die Dissoziationsgleichgewichtskonstante (K_D^{kin}) berechnet werden:

$$K_D^{kin} = \frac{k_{diss}^{kin}}{k_{ass}^{kin}} \quad (\text{Gleichung 2.6})$$

Bei der *thermodynamischen Auswertung* der Assoziationskinetiken wurde mit den Daten ebenfalls zunächst eine Regression auf Basis der Gleichung 2.3 oder 2.4 durchgeführt. Anschließend wurde E (Extent; Betrag der assoziationsbedingten RMA-Signaländerung) bzw. E_{total} (Summe aus E_1 und E_2 , d.h. aus dem Betrag der assoziationsbedingten RMA-Signaländerung der ersten Phase und dem Betrag der assoziationsbedingten RMA-Signaländerung der zweiten Phase) gegen die Analytkonzentration aufgetragen und es erfolgte eine Regression nach der folgenden Funktion, wodurch die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (K_D^{therm}) direkt bestimmt werden konnte.

$$E \text{ bzw. } E_{total} = E_{max} \frac{[A]}{K_D^{therm} + [A]} \quad (\text{Gleichung 2.7})$$

E bzw. E_{total} : Betrag der assoziationsbedingten RMA-Signaländerung bzw. Betrag der assoziationsbedingten RMA-Signaländerung der ersten und der zweiten Phase

E_{max} : Maximaler Betrag der assoziationsbedingten RMA-Signaländerung

[A]: Analyt-Konzentration

K_D^{therm} : Dissoziationsgleichgewichtskonstante ermittelt durch thermodynamische Auswertung

Die Daten, die durch Messung der **Dissoziationskinetiken** ermittelt wurden, konnten anhand der folgenden Gleichung ausgewertet werden.

$$R_t = R_{eq} + E_1 e^{-k_{diss1} t} + E_2 e^{-k_{diss2} t} \quad (\text{Gleichung 2.8})$$

R_t (Response_t): RMA-Signal zum Zeitpunkt t

R_{eq} (Response_{equilibrium}): RMA-Signal bei Erreichen des Bindungsgleichgewichtes nach der Gesamtdissoziation

E_1 (Extent 1): Betrag der dissoziationsbedingten RMA-Signaländerung der ersten Dissoziationsphase

E_2 (Extent 2): Betrag der dissoziationsbedingten RMA-Signaländerung der zweiten Dissoziationsphase

k_{diss1} : Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante der ersten Dissoziationsphase

k_{diss2} : Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante der zweiten Dissoziationsphase

Da die Dissoziationsphase gerätebedingt durch ein mehrmaliges Wechseln des Meßzelleninhaltes eingeleitet wurde, kam es zu einem sehr schnellen, schlagartigem Abfall des RMA-Meßsignales (Puffer-Shift). Dadurch war es nicht möglich zu beurteilen, wann das Absinken des Signales (noch) den Puffer-Shift und wann es (schon) die tatsächliche Dissoziation widerspiegelt. Daher wurden die gesamten Daten der Dissoziation inklusive Puffer-Shift zur Regression auf Basis der oben beschriebenen zweiphasigen Funktion herangezogen. Die so erhaltene Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante der ersten, "schnellen" Phase (k_{diss1}) beschreibt den Puffershift während die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante der zweiten, "langsamen" Phase (k_{diss2}) den eigentlichen Dissoziationsvorgang widerspiegelt.

Da die so direkt aus der Dissoziation erhaltene Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in vielen Fällen einen geringeren Fehler aufweist als die aus der kinetischen Auswertung der Assoziation (k_{diss}^{kin} , s.o.), kann k_{diss2} gegebenenfalls zur Berechnung von K_D^{kin} (s.o.) herangezogen werden:

$$K_D^{kin} = \frac{k_{diss2}}{k_{ass}^{kin}} \quad (\text{Gleichung 2.9})$$

Allgemein gilt, daß alle im Ergebnisteil angegebenen durch o.g. Auswertungsmethoden erhaltenen kinetischen Parameter den Mittelwert von mindestens drei voneinander unabhängigen Meßreihen mit den entsprechenden Standardabweichungen darstellen.

Auswertung der Daten mit Hilfe der Grafit-Software, Version 3.03

Bei einigen RMA-Meßdaten, die zur Charakterisierung der rC α E91-Mutanten erhoben worden waren, war eine Auswertung mit Hilfe der FASTfit-Software nicht möglich. Dafür gab es unterschiedliche Gründe (siehe 3.2.3).

In diesen Fällen wurde - in Anlehnung an die thermodynamische Auswertung mit Hilfe der FASTfit-Software - zunächst visuell der Betrag der assoziationsbedingten RMA-

Signaländerung nach fünfminütiger Assoziation (*E) ermittelt. Bei den Messungen zur Bestimmung von $K_{D\text{ATP}}$ der rC α E91-Mutanten wurden diese Werte um den entsprechend ermittelten Wert der Kontrollmessung, die ohne Gegenwart von ATP durchgeführt wurde, korrigiert. Aus der unter 3.2.3 gegebenen Begründung wurde angenommen, daß die Signale dieser Kontrollmessungen "unter" allen eigentlichen Signalen der Meßreihen zur Bestimmung von $K_{D\text{ATP}}$ für rC α E91-Mutanten liegen. Anschließend wurden die ggf. korrigierten Daten mit Hilfe der Grafit-Software 3.03 gegen die Analytkonzentration aufgetragen. Die Regression erfolgte nach der nachfolgend angegebenen Gleichung und lieferte einen Wert für die Dissoziationsgleichgewichtskonstante, der zur Unterscheidung von dem entsprechenden Wert, der durch die thermodynamische Auswertung mit Hilfe der FASTfit-Software ermittelt wurde (K_{D}^{therm}), mit $*K_{D}^{\text{therm}}$ bezeichnet wird.

$$*E = *E_{\text{max}} \frac{[A]}{*K_{D}^{\text{therm}} + [A]} \quad (\text{Gleichung 2.10})$$

*E (*Extent): Betrag der assoziationsbedingten RMA-Signaländerung nach fünfminütiger Assoziation

*E_{max} (Maximum *Extent): Maximaler Betrag der assoziationsbedingten RMA-Signaländerung nach fünfminütiger Assoziation

[A]: Analyt-Konzentration

*K_D^{therm}: Dissoziationsgleichgewichtskonstante ermittelt durch die oben beschriebene, an die thermodynamische Auswertung angelehnte Methode

Alle im Ergebnisteil angegebenen durch o.g. Auswertungsmethode erhaltenen kinetischen Parameter stellen den Mittelwert von mindestens drei voneinander unabhängigen Meßreihen mit den entsprechenden Standardabweichungen dar. Eine Ausnahme bilden hierbei die Werte, die die Affinität der jeweiligen Mutante bzw. von rC α -His zu PKI(5-24) ohne Gegenwart von ATP beschreiben. Diese Werte stellen die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen von lediglich zwei unabhängigen Meßreihen dar.

2.4.12 Kristallisationsexperimente

Um Informationen über die räumliche Struktur auf molekularer Ebene zu erhalten, wurden mit zwei Mutanten der katalytischen Untereinheit C α der Proteinkinase A Experimente zur Kristallisation durchgeführt. Dafür wurden die rC α -Mutanten mit den Aminosäureaustauschen F185W und E91A zunächst jeweils mit dem Wildtypenzym coexprimiert (siehe 2.4.1). Bei der Coexpression von rC α F185W lag das DNA-Fragment der Mutante im pT7-7-Vektor und die DNA-Sequenz des Wildtyps im pET-28b(+)-Vektor vor. Bei der Coexpression der rC α -Mutanten mit dem

Aminosäureaustausch E91A dagegen wurde die Mutante vom pET-28b(+)-Vektor und der Wildtyp vom pT7-7-Vektor codiert. Im Falle der rC α -Mutante F185W war das coexprimierte Wildtypenzym also N-terminal mit einem His-tag versehen, während im Falle der rC α -Mutante E91A die Mutante selbst den His-tag trug und im Folgenden daher auch mit rC α E91A-His bezeichnet wird.

Die Anzucht der *E. coli*-Stämme, die Coexpression, der Zellaufschluß und die folgende Reinigung der katalytischen Untereinheit C α von PKA mittels PKI(5-24)-Affinitätschromatographie erfolgte nach den unter 2.2.4, 2.4.1, 2.4.2.1 und 2.4.2.2 angegebenen Protokollen. Da rC α E91A-His jedoch nur mit geringer Affinität an das PKI(5-24)-Affinitätssäulenmaterial band, wurde hier nicht nur mit dem Eluat sondern auch mit Fraktionen der Waschschriffe weitergearbeitet.

Bei dem TMN 50-Waschschritt der PKI(5-24)-Affinitätschromatographie werden fünf Säulenvolumen (Volumen des gepackten Säulenmaterials) und bei dem TMN 250-Waschschritt sechs Säulenvolumen des jeweiligen Puffers aufgetragen, der jeweils zuvor mit 400 μ M ATP versetzt wurde. Dementsprechend wurden bei dem TMN 50-Waschschritt fünf Fraktionen und bei dem TMN 250-Waschschritt sechs Fraktionen gesammelt. Das Volumen einer dieser Fraktionen war somit äquivalent zu einem Säulenvolumen.

Zur weiteren Reinigung von rC α E91A-His wurden neben dem Eluat die vierte und fünfte Fraktion des TMN 50-Waschschriffes sowie alle sechs Fraktionen des TMN 250-Waschschriffes verwendet (siehe auch 2.4.2.2).

Das nach der PKI(5-24)-Affinitätschromatographie erhaltene Proteingemisch aus Wildtyp- und Mutantenzym wurde durch im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Verfahren der Ionenaustauscherchromatographie getrennt bzw. weiter aufgereinigt. Bei der rC α F185W-Mutante wurde dabei das Verfahren I und bei der rC α E91A-His-Mutante das Verfahren II verwendet (siehe 2.4.2.4).

Die so gewonnenen Präparate wurden mittels Centricon 30 so eingeeengt, daß sich im Minimalvolumen (ca. 35 μ l) eine Proteinkonzentration von ca. 18 - 20 mg/ml ergab. Anschließend erfolgte ein Umpuffern in L/C-Puffer (s.u.), indem das Minimalvolumen mit 1 ml dieses Puffers aufgefüllt wurde und die Centricons danach wiederum auf das Minimalvolumen gebracht wurde. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt.

L/C-Puffer:

75 mM	LiCl
5 mM	MES/Bis-Tris pH 6,9
1 mM	DTT
0,1 mM	EDTA

Die Kristallisationsansätze enthielten die folgenden Komponenten in den angegebenen Konzentrationen, wobei sich die Konzentrationen lediglich auf das Volumen der eingesetzten Proteinmenge bezieht; Volumenzuwächse durch Zusatz der Stammlösungen der anderen Komponenten des Ansatzes blieben unberücksichtigt.

18 - 20 mg/ml	Protein (ca. 2,9 µl pro Ansatz)		
25 mM	MES/Bis-Tris mit entsprechendem pH-Wert (s.u.)	Stock:	1 M
0,8 mM	PKI(5-24); Bezugsquelle: Calbiochem	Stock:	20 mM
1,5 mM	Mega 8	Stock:	20 mM

Zur Kristallisation wurden der pH-Wert, die Art des Fällungsmittels und die Fällungsmittelkonzentration variiert. Die Kristallisationsbedingungen für rC α F185W und rC α E91A-His sind im Folgenden aufgeführt.

rC α -Form	pH-Wert	Art des Fällungsmittels und dessen Konzentration
rC α F185W	6,4 - 6,6	Methanol in Bidest, 11 - 17 % (v/v)
rC α E91A-His	5,6 - 6,8	Polyethylenglycol 3350 in Bidest, 8 - 20 % (v/v)
	5,4 - 6,5	Methanol in Bidest, 12 - 18 % (v/v)

Die Ansätze wurden im Hanging Drop-Verfahren bei 4 °C gegen die Fällungsmittel equilibriert.

Die weitere Betreuung der Proteinkristalle (eventuell nötige Seedings und Ernte etc.) wurde von Dr. D. Bossemeyer (Abteilung für Pathochemie, DKFZ Heidelberg) übernommen. Die Röntgenstrukturanalyse wurde im Rahmen einer Kooperation von Dr. R. A. Engh (Roche) am MPI für Biochemie in Martinsried, Abteilung Strukturforschung, durchgeführt.

2.5 Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen

Mittelwert:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (\text{Gleichung 2.11})$$

Standardabweichung:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{Gleichung 2.12})$$

Für einen Wert $z = \frac{x}{y}$ mit den Standardabweichungen s_x und s_y gilt:

$$s_z = z \sqrt{\left(\frac{s_x}{x}\right)^2 + \left(\frac{s_y}{y}\right)^2} \quad (\text{Gleichung 2.13})$$

3 ERGEBNISSE

Mutagenesestudien an hochkonservierten Aminosäureresten der katalytischen Untereinheit $C\alpha$ der Proteinkinase A (PKA) lieferten bislang nur wenig Informationen. Grund hierfür war oftmals, daß die Mutanten nicht mehr zur autokatalytischen Phosphorylierung im Aktivierungssegment (siehe 1.1.3) fähig waren. Daraus ergab sich z.B. eine Unlöslichkeit des mutierten Proteins (Tomoda *et al.*, 1993) oder der Verlust der Fähigkeit zur Bindung an das für die Reinigung verwendete Affinitätsmaterial (Girod, 1997). Gleichzeitig waren beobachtete veränderte Eigenschaften der Mutanten nicht mehr eindeutig lediglich mit der eingeführten Mutation in Zusammenhang zu bringen, da sich Effekte der Mutation und der fehlenden Phosphorylierung möglicherweise überlagerten.

Mit Hilfe der Coexpression (Girod *et al.*, 1996) kann die essentielle Phosphorylierung im Aktivierungssegment von $C\alpha$ -Mutanten durch den Wildtyp erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Gruppen von rekombinanten, an hochkonservierten Aminosäureresten mutierten $C\alpha$ -Proteinen exprimiert bzw. ggf. coexprimiert und nach der Reinigung kinetisch und ggf. strukturell charakterisiert. Ziel war es, hierdurch die spezifische Funktion der mutierten Reste zu hinterfragen.

Die erste Gruppe der mutierten $C\alpha$ -Proteine war bereits im Vorfeld dieser Arbeit hergestellt worden (Girod, 1997). Die Mutationen betreffen hier **Phenylalanin 185**, welches Teil des sog. DFG-Motivs ist (siehe 1.1.3). Die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Gruppe von rekombinant hergestellten F185-Mutanten der katalytischen Untereinheit $C\alpha$ von PKA sind im Teil 1 (3.1.X) dargestellt.

Die zweite Gruppe der mutierten $C\alpha$ -Proteine wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Die in diesem Fall gesetzten Mutationen betreffen **Glutamat 91**, das innerhalb der Helix C liegt (siehe 1.1.3). Die aus den Untersuchungen dieser Gruppe von rekombinant hergestellten E91-Mutanten der katalytischen Untereinheit $C\alpha$ von PKA resultierenden Ergebnisse sind im Teil 2 (3.2.X) aufgeführt.

Die Bezeichnung der unterschiedlichen Proteine wird im Weiteren wie folgt gehandhabt. Die rekombinant hergestellte katalytische Untereinheit $C\alpha$ von PKA (nicht myristyliert) wird als $rC\alpha$ bezeichnet. Die entsprechenden Mutanten werden demzufolge z.B. mit $rC\alpha$ F185L benannt. Falls ein Fusionsprotein vorliegt, das N-terminal einen sog. His-tag trägt, lautet die Bezeichnung dann z.B. $rC\alpha$ F185W-His. Wenn nicht anders angegeben, sind alle genannten Proteine von der $C\alpha$ -DNA-Sequenz des Rindes (Wiemann *et al.*, 1992) abgeleitet.

3.1 Charakterisierung von rC α F185-Mutanten

Die Funktion von Phenylalanin 185 als Teil des hochkonservierten DFG-Motivs ist, ausgehend von Kristallstrukturdaten, nur bedingt zu erklären. Die Seitenkette dieses Restes liegt in einer Tasche, die wiederum in einem locker gepacktem hydrophoben Bereich lokalisiert ist. Die Aufgabe von F185 liegt daher möglicherweise darin, den benachbarten essentiellen Rest D184 in eine für die Katalyse günstige Position zu bringen bei gleichzeitiger Gewährleistung einer für den Reaktionsverlauf ausreichenden Konformationsflexibilität (Bossemeyer *et al.*, 1993; Bossemeyer, 1994). Um diese Hypothese zu hinterfragen, wurden im Vorfeld dieser Arbeit rC α -Mutanten hergestellt, die an Stelle von F185 die Aminosäuren Leucin, Tryptophan bzw. Alanin aufweisen (Girod, 1997). Es ist denkbar, daß die unterschiedlich starke Ausfüllung des beschriebenen lose gepackten Bereiches mittels der genannten Aminosäuren bei diesen Mutanten eine veränderte Konformationsflexibilität und ggf. auch Positionierung von D184 bewirkt, was möglicherweise wiederum zu entsprechenden kinetischen und evtl. auch strukturellen Effekten führt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die genannten Mutanten daher kinetisch und im Falle von rC α F185W und rC α F185L auch strukturell analysiert.

3.1.1 Expression und Präparation

Alle Expressionen wurden mit Hilfe der Vektoren pT7-7 und/oder pET-28b(+) im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) durchgeführt. Dabei waren die zu exprimierenden DNA-Fragmente in allen Fällen über NdeI (5') und BamHI (3') in die Plasmide kloniert (Vektorkarten siehe Anhang).

Die Mutante rC α F185L konnte nach Expression mit Hilfe des pT7-7-Vektors in ausreichenden Mengen isoliert werden. Bei rC α führt eine fehlende aktivierende Phosphorylierung an Threonin 197 dazu, daß das Protein nicht mehr an das zur Reinigung verwendete PKI(5-24)-Affinitätsmaterial bindet. Daher kann davon ausgegangen werden, daß rC α F185L ausreichend aktiv ist, um sich autokatalytisch zu phosphorylieren.

Bereits im Rahmen früherer experimenteller Arbeiten hatte sich gezeigt, daß die Ausbeute bei der Präparation (siehe 2.4.2) von rC α F185W und rC α F185A sehr gering war, wenn diese Proteine allein mit Hilfe des pT7-7-Vektors (siehe 2.4.1) exprimiert wurden (Girod, 1997). Grund hierfür war das Unvermögen dieser Mutanten zur Bindung an das PKI(5-24)-Affinitätsmaterial. Dieser Befund deutet darauf hin, daß diese Mutanten nicht mehr zur essentiellen Autophosphorylierung an Threonin 197 fähig sind

(Girod, 1997). Diese Phosphorylierung ist aber sowohl für eine sinnvolle Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften der Mutante (siehe 1.1.3), als auch für die verwendete Reinigungsmethode unabdingbar. Daher wurden die Mutanten rC α F185W und rC α F185A zusammen mit dem Wildtyp coexprimiert (siehe 2.4.1), so daß die essentielle Phosphorylierung an Threonin 197 bei der jeweiligen Mutante intermolekular durch den Wildtyp erfolgen konnte. Üblicherweise lag bei diesem Coexpressionssystem das DNA-Fragment der jeweiligen Mutante im pET-28b(+)-Vektor und das des Wildtyps im pT7-7-Vektor vor (eine Ausnahme von dieser Kombination von Vektoren und Inserts stellte die Coexpression zur Kristallisation von rC α F185W dar; siehe 3.1.4.1).

Die Expression mit Hilfe des pET-28b(+)-Vektors sorgte dafür, daß die jeweilige Mutante im Gegensatz zu dem mittels pT7-7-Vektor coexprimierten Wildtypenzym N-terminal einen His-tag trug (Vektorkarten bzw. Sequenz des His-tag: siehe Anhang). Dieser His-tag diente nach der zunächst durchgeführten rC α -spezifischen PKI(5-24)-Affinitätschromatographie in einer sich anschließenden Ni²⁺-Affinitätschromatographie der Trennung von rC α -Mutante und rC α . Eine direkte Isolierung der His-tag-tragenden Proteine aus dem Gesamtzellextrakt mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie ohne eine "Vorreinigung" mittels PKI(5-24)-Affinitätschromatographie zeigte im Vorfeld dieser Arbeit, daß das Eluat dieser Einschnitt-Reinigung viele Fremdproteine enthielt (Girod, 1997).

Nach der Präparation der His-tag-tragenden rC α -Mutanten wurde versucht, den His-tag mittels Thrombin proteolytisch abzuspalten. Dies gelang jedoch nicht (Daten nicht gezeigt). Grund hierfür war möglicherweise, daß das den His-tag tragende Protein eine Konformation aufweist, welche ein Binden der Protease an der Erkennungssequenz verhindert.

Experimente, bei denen das Wildtyp-Enzym mit einem His-tag versehen wurde, um eine Ni²⁺-affinitätschromatographische Trennung von Mutante und Wildtyp zu ermöglichen, und um so die Mutante ohne evtl. störenden His-tag isolieren zu können, wurden bereits im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführt. Bei dieser Strategie zeigte sich allerdings, daß der Durchlauf der Ni²⁺-Affinitätschromatographie immer neben der Mutante auch einen geringen Anteil an N-terminal degradiertem Wildtyp enthielt (persönliche Mitteilung Dr. D. Bossemeyer, DKFZ), der die Ergebnisse der kinetischen Charakterisierung der Mutanten verfälschte.

Aus den genannten Gründen wurden die Mutanten rC α F185W und rC α F185A deshalb, im Gegensatz zu rC α F185L, im weiteren Verlauf dieser Arbeit als His-tag-Fusionsproteine charakterisiert (eine Ausnahme hiervon stellt die Kristallisation von rC α F185W dar; siehe 3.1.4.1). Für vergleichende Analysen wurde daher sowohl rC α

als auch rC α -His benötigt. Die Expression des DNA-Fragment des Wildtypenzym erfolgte deshalb sowohl mit Hilfe des pT7-7- als auch des pET-28b(+)-Vektors.

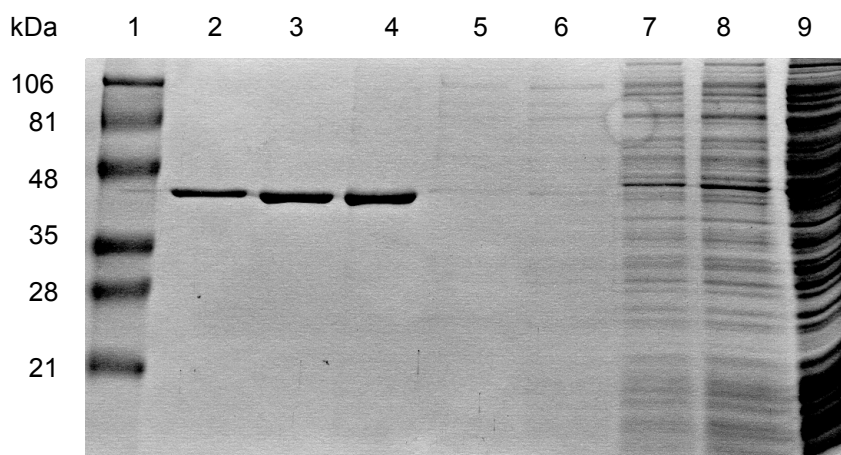


Abb. 3.1: Isolierung von rC α F185L mittels PKI(5-24)-Affinitätschromatographie

Das Protein rC α F185L wurde in *E. coli* exprimiert (2.4.1). Der Überstand des Zell-Lysates nach Zentrifugation wurde für eine PKI(5-24)-Affinitätschromatographie verwendet (2.4.2.2). Anschließend wurden verschiedene Proben dieses Reinigungsschrittes in einem 12 %igen SDS-Gel elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie angefärbt. Das *E. coli*-Lysat einer induzierten pT7-7-Expressionskultur läßt auf der Höhe von rC α keine prominente Bande erkennen (Daten nicht gezeigt). Für die einzelnen Spuren sind jeweils angegeben: Art der Probe; aufgetragenes Volumen bzw. aufgetragene Proteinmenge

- 1: Molekulargewichtsstandard; 9,4 μ g
- 2: Eluat(rC α F185L); 0,5 μ g
- 3: Eluat (rC α F185L); 1,0 μ g
- 4: rC α -Standard; 1,0 μ g
- 5: TMN 250-Waschschrötte, Fraktionen 1 - 6; 15 μ l
- 6: TMN 250-Waschschrötte, Fraktionen 1 - 6; 30 μ l
- 7: TMN 50-Waschschrötte, Fraktionen 1 - 5; 15 μ l
- 8: TMN 50-Waschschrötte, Fraktionen 1 - 5; 30 μ l
- 9: Durchlauf der PKI(5-24)-Affinitätsäule; 2,5 μ l

Alle Mutanten sowie rC α und rC α -His wurden nach dem unter 2.2.3, 2.2.4 und 2.4.1 aufgeführten Verfahren exprimiert und anschließend mit Hilfe der PKI(5-24)-Affinitätschromatographie (siehe 2.4.2.2) aufgereinigt. Bei den Mutanten mit den Aminosäureaustauschen F185W und F185A, die jeweils zusammen mit rC α coexprimiert wurden, folgte auf diese PKI(5-24)-Affinitätschromatographie eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie (siehe 2.4.2.3), um die jeweilige Mutante, die mit einem Histag versehen war, von dem coexprimierten Wildtypenzym zu trennen. Die Kontrolle der Expression und Reinigung der Proteine erfolgte anhand der gelelektrophoretischen Auftrennung ausgewählter Proben und anschließender Coomassie-Färbung. Exemplarisch ist eine solche SDS PAGE-Analyse einer PKI(5-24)-Affinitätschromatographie zur Reinigung von rC α F185L in Abb. 3.1 gezeigt. Eine Analyse einer Ni²⁺-Affinitätschromatographie ist exemplarisch in Abb. 3.2 dargestellt.

Hier ist die Isolierung von rC α F185A-His aus dem nach der PKI(5-24)-Affinitätschromatographie erhaltenen Gemisch von rC α F185A-His und rC α erkennbar. Darüber hinaus zeigen die Intensitätsunterschiede zwischen den Banden des His-tag-Proteins und des nicht-His-tag-Proteins in den Spuren 7 und 8 deutlich das höhere Expressionsniveau des pET-28b(+)-Vektors im Vergleich zum pT7-7-Vektor.

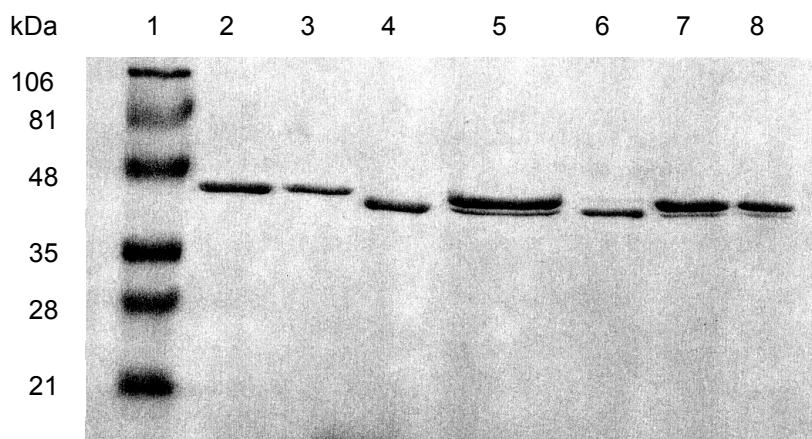


Abb. 3.2: Isolierung von rC α F185A-His mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie

Die Proteine rC α F185A-His und rC α wurden in *E. coli* coexprimiert (2.4.1). Der Überstand des Zell-Lysates nach Zentrifugation wurde für eine PKI(5-24)-Affinitätschromatographie verwendet (2.4.2.2). Das Eluat dieses Reinigungsschrittes, ein Gemisch aus von rC α F185A-His und rC α , wurde einer Ni²⁺-Affinitätschromatographie unterzogen (2.4.2.3). Anschließend wurden verschiedene Proben dieser Chromatographie in einem 12 %igen SDS-Gel elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie angefärbt. Für die einzelnen Spuren sind jeweils angegeben: Art der Probe; aufgetragenes Volumen bzw. aufgetragene Proteinmenge

- 1: Molekulargewichtsstandard; 9,4 μ g
- 2: Eluat der Ni²⁺-Affinitätschromatographie; 1,0 μ g
- 3: Eluat der Ni²⁺-Affinitätschromatographie; 0,5 μ g
- 4: rC α -Standard; 1,0 μ g
- 5: Waschschrift der Ni²⁺-Affinitätschromatographie, Fraktionen 1 - 10; 30 μ l
- 6: Durchlauf der Ni²⁺-Affinitätschromatographie; 2 μ l
- 7: Eluat der PKI(5-24)-Affinitätschromatographie (rC α F185A-His + rC α); 1,0 μ g
- 8: Eluat der PKI(5-24)-Affinitätschromatographie (rC α F185A-His + rC α); 0,5 μ g

Das wie beschrieben präparierte rekombinante, nicht myristylierte rC α -Protein wurde, wenn nicht anders angegeben (siehe 3.1.4 und 3.2.4), für alle weiteren Charakterisierungsexperimente verwendet. Auf eine ionenaustauscherchromatographische Auftrennung der Proben in die unterschiedlichen Phosphorylierungsstufen (zweifach, dreifach, vierfach) wurde weitestgehend verzichtet, da lediglich die Phosphorylierung an Threonin 197 eine essentielle Bedeutung für die katalytische Aktivität des Enzyms zu haben scheint (Adams *et al.*, 1995; Girod *et al.*, 1996; Yonemoto *et al.*, 1997; Steinberg, 1991; Yonemoto *et al.*, 1997).

3.1.2 Michaeliskonstanten für ATP und Kemptid sowie spezifische Maximalgeschwindigkeiten

Eine erste kinetische Charakterisierung der isolierten rC α F185-Mutanten erfolgte mit Hilfe des unter 2.4.9 beschriebenen Aktivitätsassays. Mit dieser Methode konnten Michaeliskonstanten für ATP bzw. für das synthetische Heptapeptid Kemptid (K_M ATP bzw. K_M Kemptid) sowie spezifische Maximalgeschwindigkeiten (v_{max}) ermittelt werden.

Der Assay wurde der jeweiligen Fragestellung angepaßt. Zur Bestimmung der Michaeliskonstanten für ein Substrat (K_M ATP oder K_M Kemptid) wurde dieses Substrat in seiner Konzentration variiert (üblicherweise ungefähr zwischen dem 0,1fachen und 10fachen des erwarteten Wertes für K_M) während das zweite Substrat konstant im Überschuß bzw. in einer sättigenden Konzentration (ca. 10fach K_M) angeboten wurde. Mit dem Begriff "sättigende Konzentration" wird - auch im Folgenden - eine Substratkonzentration bezeichnet, bei der nach der Michaelis-Menten-Gleichung ca. 90 % der Bindungsstellen des Enzyms mit diesem Substrat besetzt sind.

Bei der Planung und Durchführung der Assays mußte berücksichtigt werden, daß für die katalytische Untereinheit eine Substratinhibierung bei hohen Kemptid-Konzentrationen gezeigt worden war. Diese ist laut Literatur für das Wildtypenzym etwa ab einer Kemptid-Konzentration von 100 μ M erkennbar (Whitehouse *et al.* 1983; Olsen and Uhler, 1989; Adams and Taylor, 1992). Dieser Effekt konnte jedoch bei keiner der untersuchten rC α -Proteine bis zu einer Kemptid-Konzentration, die ca. dem zehnfachen des jeweiligen Wertes für K_M Kemptid entsprach beobachtet werden. So zeigte z.B. rC α F185A-His mit einem Wert für K_M Kemptid von $164,2 \pm 29,7 \mu$ M selbst bei Kemptid-Konzentrationen von 2,5 mM keinen Aktivitätsverlust (siehe Abb. 3.4). Möglicherweise liegt der Grund für das Fehlen der Substratinhibierung in der Verwendung von mehrfach lyophilisiertem Kemptid. Denkbar ist, daß die in der Literatur beschriebenen Befunde dadurch hervorgerufen wurden, daß das verwendete Kemptid Verunreinigungen bzw. Rückstände z.B. von der Peptidsynthese aufwies. Diese könnten möglicherweise bei hohen Peptidkonzentrationen für den Rückgang der katalytischen Aktivität verantwortlich sein.

Allen Messungen voraus ging jeweils ein Experiment zur Optimierung der nachfolgenden Assays in bezug auf die pro Ansatz eingesetzte Enzymmenge und die gewählte Reaktionsdauer. Bei diesem Kontrollexperiment wurde das in Folgeexperimenten in seiner Konzentration zu variierende Substrat in der geringsten zu messenden und das in seiner Konzentration konstante Substrat in sättigender Konzentration eingesetzt. Durch die Bestimmung der zeitabhängigen Phosphorylierung unter diesen Bedingungen konnte zum einen das später zu erwartende Verhältnis zwischen Meßwert und Hintergrund (siehe 2.4.9) ermittelt bzw. optimiert werden. Zum

anderen wurde kontrolliert, ob es bei den nachfolgenden Experimenten während der gewählten Reaktionszeit zu einer übermäßigen Verarmung d.h. Konzentrationsänderung des in seiner Konzentration zu variierenden Substrates kommen würde. Die Bedingungen (eingesetzte Enzymmenge, Reaktionszeit, etc.) bei den Experimenten zur Bestimmung von $K_{M\text{ATP}}$, $K_{M\text{Kemptid}}$ sowie von v_{max} wurden anhand dieser Kontrollelexperimente üblicherweise so gewählt, daß nur ca. 10 - 20 % der Gesamtmenge des in seiner Konzentration zu variierenden Substrates in einem Reaktionsansatz während der Reaktionszeit umgesetzt wurden.

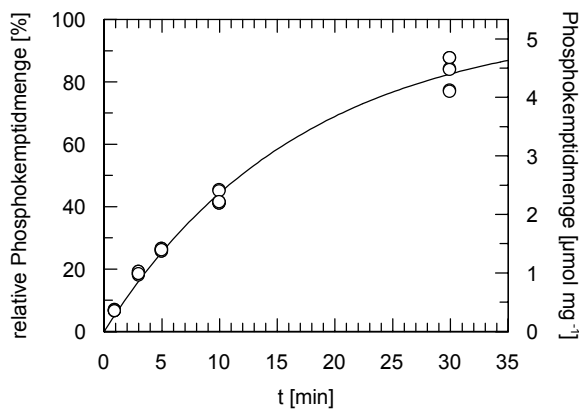


Abb. 3.3: Kontrolle der Substratverarmung

Gezeigt ist die (relative) Menge des Produktes (Phosphokemptid) in Abhängigkeit von der Zeit. Der Aktivitätsassay wurde mit 50 ng rC α F185W-His, 5 μM ATP und 200 μM Kemptid wie unter 2.4.9 angegeben durchgeführt.

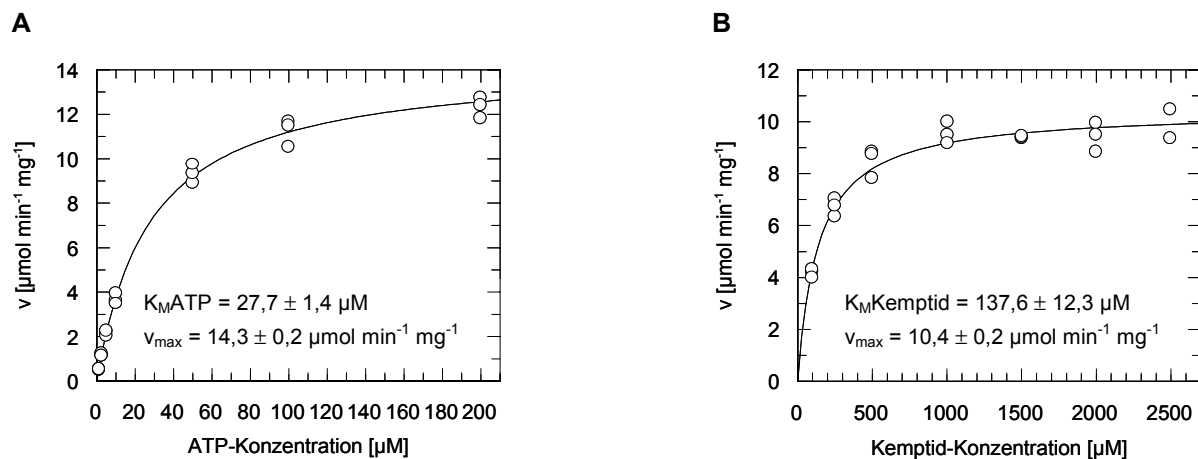


Abb. 3.4: Bestimmung von Michaeliskonstanten (K_M) und spezifischer Maximalgeschwindigkeit (v_{max})

Gezeigt ist jeweils die Kemptidphosphorylierungsrate in Abhängigkeit von der Konzentration von ATP bzw. von Kemptid. Die Aktivitätsassays wurden wie unter 2.4.9 angegeben durchgeführt und ausgewertet. Die Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit entspricht der Michaeliskonstanten. **A:** Bestimmung von $K_{M\text{ATP}}$ und v_{max} für rC α F185L **B:** Bestimmung von $K_{M\text{Kemptid}}$ und v_{max} für rC α F185A-His

Exemplarisch ist ein solches Kontrollexperiment, das im Vorfeld einer Bestimmung von K_M ATP durchgeführt wurde, in Abb. 3.3 dargestellt. Erkennbar ist hier, daß unter den gewählten Bedingungen (50 ng rC α F185W-His, 5 μ M ATP, 200 μ M Kempetid) und nach der üblicherweise gewählten Reaktionszeit von zwei Minuten die Verarmung an ATP vernachlässigbar ist.

Beispiele für die Messungen, die mit den rC α F185-Mutanten sowie mit rC α und rC α -His zur Bestimmung von K_M ATP, K_M Kempetid sowie v_{max} durchgeführt wurden, sind in Abb. 3.4 gezeigt. Die Regression der ermittelten Daten erfolgte auf der Basis der unter 2.4.9 angegebenen Gleichungen.

Im weiteren Verlauf sind die mit Hilfe von Aktivitätsassays ermittelten kinetischen Parameter tabellarisch (Tabellen 3.1 - 3.4) und in Form von Diagrammen (Abb. 3.5) zusammenfassend dargestellt.

	K_M ATP [μ M]	K_M Kempetid [μ M]	v_{max} [μ mol min ⁻¹ mg ⁻¹]
rC α	7,8 ± 0,3	4,3 ± 0,3	1,7 ± 0,1
rC α F185L	28,1 ± 1,2	16,5 ± 1,7	14,6 ± 0,6
rC α F185W-His	58,1 ± 3,6	27,5 ± 3,0	8,8 ± 1,1
rC α F185A-His	60,1 ± 3,0	164,2 ± 29,7	12,2 ± 1,0
rC α -His	21,9 ± 0,8	20,6 ± 4,3	5,2 ± 1,0

Tab. 3.1: Übersicht über K_M ATP, K_M Kempetid und v_{max} der untersuchten rC α -Proteine

Die Werte wurden mit den unter 2.4.9 beschriebenen Methoden und Gleichungen ermittelt.

Beim Vergleich von rC α und rC α -His ist erkennbar, daß unter den gewählten Assaybedingungen Unterschiede bezüglich der ermittelten Parameter zu verzeichnen sind (siehe Tab. 3.1 bzw. Tab. 3.2 und Abb. 3.5 A).

	K_M ATP	K_M Kempetid	v_{max}
rC α	1,00 ± 0,04	1,00 ± 0,07	1,00 ± 0,06
rC α -His	2,81 ± 0,10	4,79 ± 1,00	3,06 ± 0,59

Tab. 3.2: Vergleich von K_M ATP, K_M Kempetid und v_{max} von rC α und rC α -His

Die Werte sind in Relation zu den entsprechenden Werten von rC α angegeben. Die absoluten Werte sind in Tab.3.1 aufgeführt.

So ist die Affinität für ATP von rC α -His im Vergleich zu rC α ca. um etwa Faktor drei geringer. Auch die Michaeliskonstante für Kempetid ist bei rC α -His größer als bei rC α .

Hier liegt der Faktor zwischen den beiden Werten bei ca. fünf. Darüber hinaus ist die spezifische Maximalgeschwindigkeit von rC α -His ca. dreimal so hoch wie die von rC α . Möglicherweise sind diese veränderten kinetischen Eigenschaften von rC α -His im Vergleich zu rC α auf eine konformelle Beeinflussung des Fusionsproteins durch den His-tag zurückzuführen. Deshalb werden im Folgenden die Mutanten, die als His-tag-Fusionsproteine gewonnen wurden (rC α F185W-His, rC α F185A-His) im Vergleich zu rC α -His charakterisiert, während das Protein rC α F185L, welches ohne His-tag isoliert werden konnte, vergleichend zu rC α beschrieben wird (siehe Tab. 3.3 bzw. Tab. 3.4 und Abb. 3.5 B und C).

	K _M ATP	K _M Kemptid	v _{max}
rC α	1,00 ± 0,04	1,00 ± 0,07	1,00 ± 0,06
rC α F185L	3,60 ± 0,15	3,84 ± 0,40	8,59 ± 0,35

Tab. 3.3: Vergleich von K_MATP, K_MKemptid und v_{max} von rC α und rC α F185L

Die Werte sind in Relation zu den entsprechenden Werten von rC α angegeben. Die absoluten Werte sind in Tab.3.1 aufgeführt.

	K _M ATP	K _M Kemptid	v _{max}
rC α -His	1,00 ± 0,04	1,00 ± 0,21	1,00 ± 0,19
rC α F185W-His	2,65 ± 0,16	1,33 ± 0,15	1,69 ± 0,21
rC α F185A-His	2,74 ± 0,14	7,97 ± 1,44	2,34 ± 0,19

Tab. 3.4: Vergleich von K_MATP, K_MKemptid und v_{max} von rC α -His, rC α F185W-His und rC α F185A-His

Die Werte sind in Relation zu den entsprechenden Werten von rC α -His angegeben. Die absoluten Werte sind in Tab.3.1 aufgeführt.

Abb. 3.5 (folgende Seite): Vergleich der Michaeliskonstanten für ATP (K_MATP) und Kemptid (K_MKemptid) sowie der spezifischen Maximalgeschwindigkeiten (v_{max}) der untersuchten rC α -Proteine

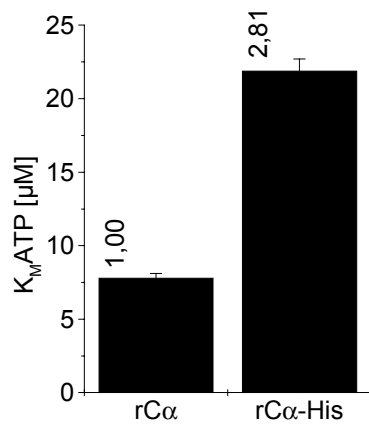
Die Werte wurden mit den unter 2.4.9 beschriebenen Methoden und Gleichungen ermittelt und sind in Tab.3.1 aufgelistet. Über den Säulen sind die den absoluten Werten entsprechenden relativen Werte aus Tab. 3.2 - 3.4 angegeben.

A: Vergleich von rC α und rC α -His (**A1:** K_MATP, **A2:** K_MKemptid, **A3:** v_{max})

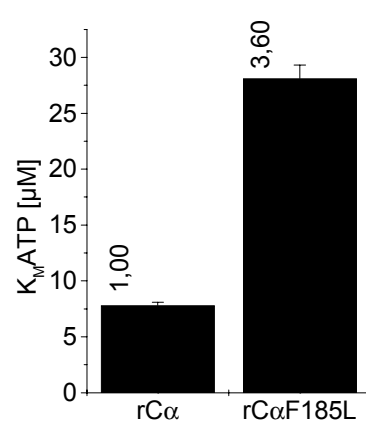
B: Vergleich von rC α und rC α F185L (**B1 - B3** entsprechend **A1 - A3**)

C: Vergleich von rC α -His, rC α F185W-His und rC α F185A-His (**C1 - C3** entsprechend **A1 - A3**)

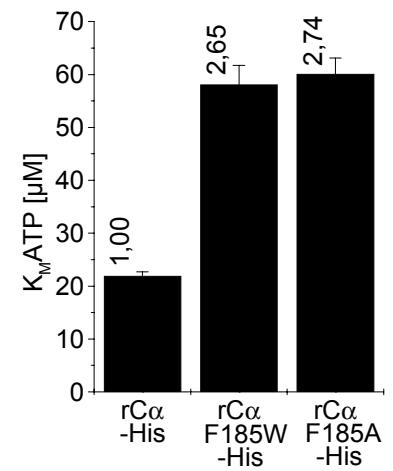
A1



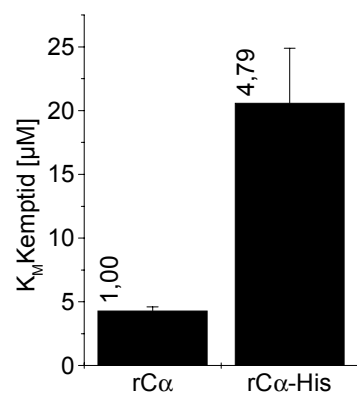
B1



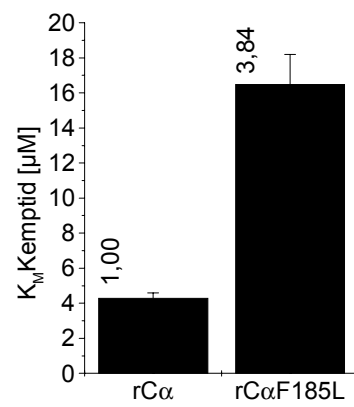
C1



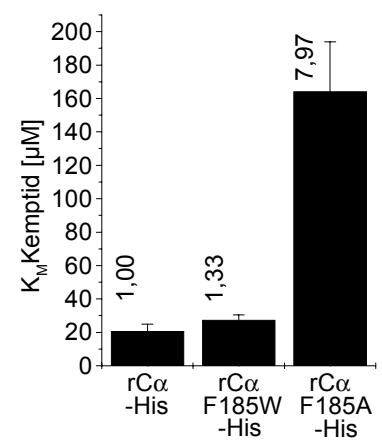
A2



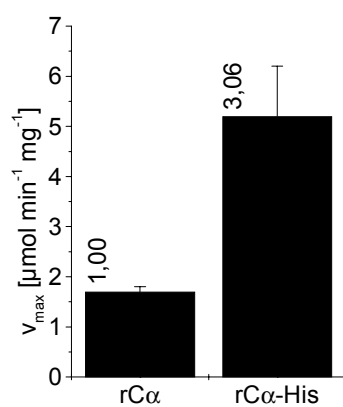
B2



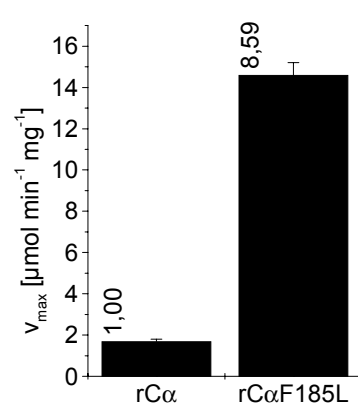
C2



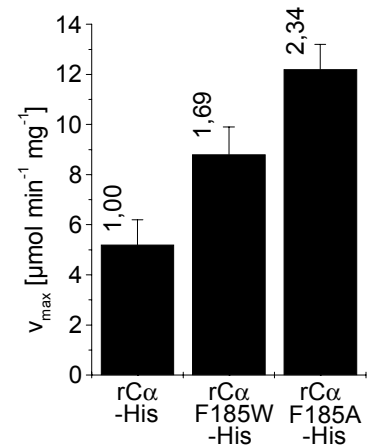
A3



B3



C3



Bezüglich der Affinität zu ATP zeigen alle untersuchten Mutanten im Vergleich zum entsprechenden Wildtypprotein (rC α bzw. rC α -His) Effekte. Die rC α F185L-Mutante zeigt im Vergleich zu rC α einen ca. um den Faktor 3,6 erhöhten Wert für $K_{M\text{ATP}}$ und damit innerhalb der rC α F185-Mutanten die geringste Affinität zu ATP. Bei rC α F185W-His und rC α F185A-His liegen die Werte für $K_{M\text{ATP}}$ beide beim ca. 2,7fachen des entsprechenden Wildtypenzym (rC α -His).

Die Affinität zu Kempfid ist bei allen hier behandelten rC α -Mutanten im Vergleich zum jeweiligen Wildtypenzym (rC α bzw. rC α -His) unterschiedlich stark eingeschränkt. Den geringsten Effekt zeigt hier rC α F185W-His mit einem um ein Drittel erhöhten Wert für $K_{M\text{Kempfid}}$. Dieser Befund ist jedoch unter Berücksichtigung der entsprechenden Fehler lediglich als Tendenz zu bewerten. Die Mutante rC α F185L, die bezüglich $K_{M\text{ATP}}$ den stärksten Effekt aufweist, zeigt bei $K_{M\text{Kempfid}}$ eine fast vierfache Erhöhung des Wertes im Vergleich zu rC α . Die größte Veränderung bezüglich der Affinität zu Kempfid ist bei rC α F185A-His zu verzeichnen. Hier liegt die entsprechende Michaeliskonstante beim ca. achtfachen der Referenz (rC α -His).

Bei den ermittelten Werten für die spezifischen Maximalgeschwindigkeiten zeigt sich bei allen Mutanten eine höhere Umsatzrate als beim vergleichbaren Wildtypenzym. Dieser Befund ist wiederum bei rC α F185L mit einem um ca. Faktor 8,6 größeren Wert für v_{max} am stärksten ausgeprägt. Die Mutanten rC α F185W-His und rC α F185A-His zeigen dagegen mit den entsprechenden Faktoren von ca. 1,7 bzw. 2,3 geringere Effekte.

	$v_{\text{max}}/K_{M\text{ATP}}$	$v_{\text{max}}/K_{M\text{Kempfid}}$
rC α	1,00 ± 0,07	1,00 ± 0,09
rC α F185L	2,39 ± 0,14	2,24 ± 0,25

Tab. 3.5: Vergleich der katalytischen Effizienz $v_{\text{max}}/K_{M\text{ATP}}$ bzw. $v_{\text{max}}/K_{M\text{Kempfid}}$ von rC α und von rC α F185L

Die Werte sind in Relation zu den entsprechenden Werten von rC α angegeben. Die absoluten Werte für v_{max} , $K_{M\text{ATP}}$ und $K_{M\text{Kempfid}}$ sind in Tab.3.1 aufgeführt.

	$v_{\text{max}}/K_{M\text{ATP}}$	$v_{\text{max}}/K_{M\text{Kempfid}}$
rC α -His	1,00 ± 0,19	1,00 ± 0,28
rC α F185W-His	0,64 ± 0,09	1,27 ± 0,21
rC α F185A-His	0,85 ± 0,08	0,29 ± 0,06

Tab. 3.6: Vergleich der katalytischen Effizienz $v_{\text{max}}/K_{M\text{ATP}}$ bzw. $v_{\text{max}}/K_{M\text{Kempfid}}$ von rC α -His, rC α F185W-His und rC α F185A-His

Die Werte sind in Relation zu den entsprechenden Werten von rC α -His angegeben. Die absoluten Werte für v_{max} , $K_{M\text{ATP}}$ und $K_{M\text{Kempfid}}$ sind in Tab.3.1 aufgeführt.

Die bisher beschriebenen kinetischen Parameter werden im Folgenden unter dem Gesichtspunkt der katalytischen Effizienz ($v_{\max}/K_M\text{ATP}$ bzw. $v_{\max}/K_M\text{Kemptid}$) in Relation zum entsprechenden Wildtypenzym betrachtet (Tab. 3.5 und Tab. 3.6 bzw. Abb. 3.6).

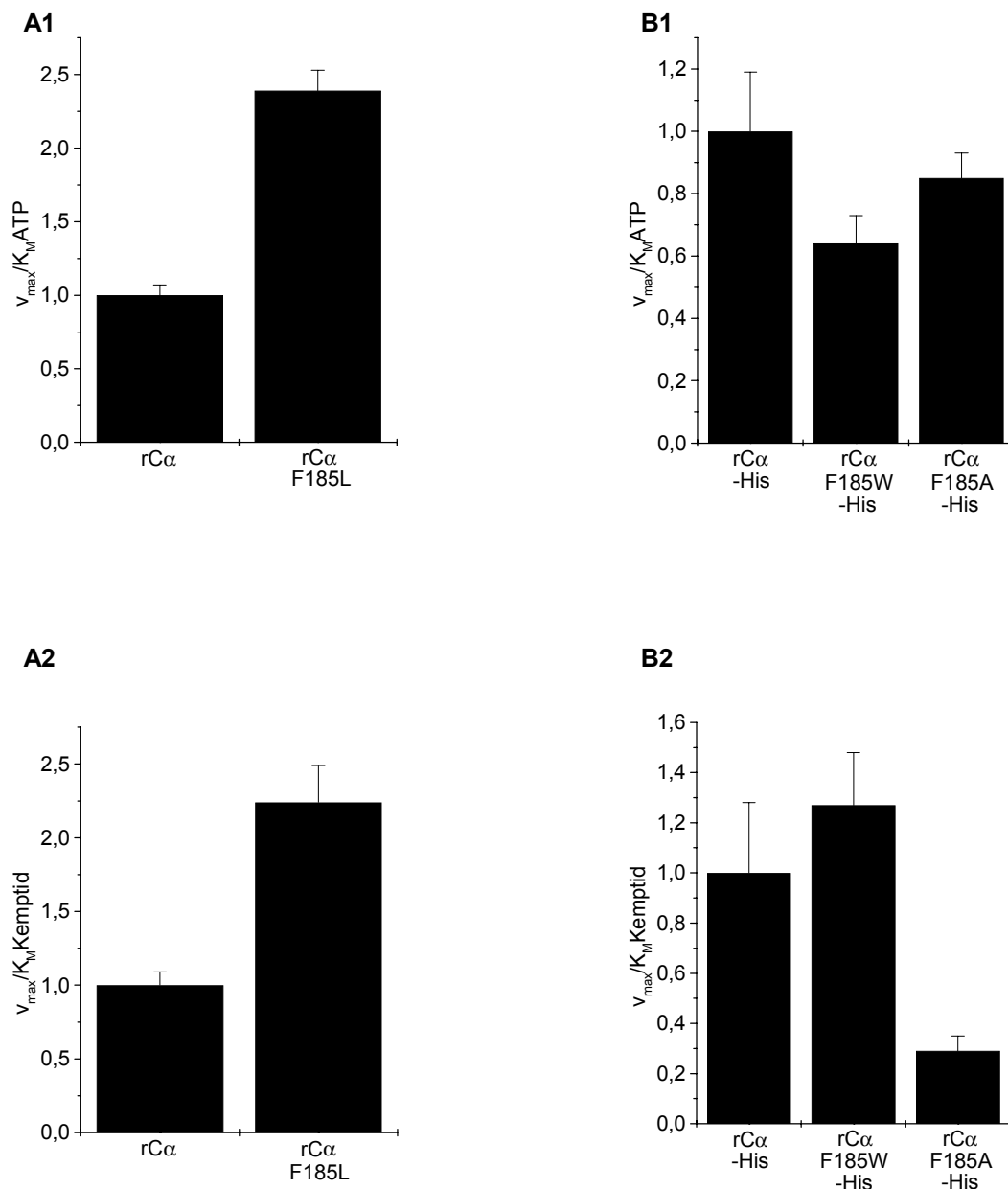


Abb. 3.6: Vergleich der katalytischen Effizienz $v_{\max}/K_M\text{ATP}$ bzw. $v_{\max}/K_M\text{Kemptid}$ der rCαF185-Mutanten in Relation zu rCα bzw. rCα-His

Die Werte sind den Tabellen 3.5 und 3.6 entnommen. Die absoluten Werte für v_{\max} , $K_M\text{ATP}$ und $K_M\text{Kemptid}$ sind in der Tabelle 3.1 aufgeführt.

1: Vergleich $v_{\max}/K_M\text{ATP}$

2: Vergleich $v_{\max}/K_M\text{Kemptid}$

A: Vergleich zwischen rCα und rCαF185L

B: Vergleich zwischen rCα-His, rCαF185W-His und rCαF185A-His

Es ist zu erkennen, daß rC α F185L sowohl hinsichtlich ATP als auch hinsichtlich Kemptid eine um mehr als den Faktor 2 erhöhte katalytische Effizienz aufweist. Die verringerten Affinitäten für ATP und Kemptid (ca. Faktor 3,6 bzw. ca. Faktor 3,8) werden also durch die erhöhte spezifische Maximalgeschwindigkeit dieses Proteins (ca. Faktor 8,6) überkompensiert. Das Protein rC α F185W-His zeigt hinsichtlich des Nukleotidsubstrates eine verringerte (ca. Faktor 0,6) und hinsichtlich des Peptidsubstrates eine im Rahmen der entsprechenden Standardabweichungen vergleichbare bis tendenziell leicht erhöhte katalytische Effizienz (ca. Faktor 1,3). Die um ca. Faktor 1,7 erhöhte spezifische Maximalgeschwindigkeit gleicht also zwar die tendenziell verringerte Affinität dieser Mutante zu Kemptid (ca. Faktor 1,3) aus, nicht aber die verringerte Affinität zu ATP (ca. Faktor 2,7). Die Mutante rC α F185A-His schließlich weist hinsichtlich v_{\max}/K_M ATP zwar einen dem entsprechenden Wildtyp vergleichbaren Wert auf, jedoch ist v_{\max}/K_M Kemptid auf ca. 30 % gesunken. Grund dafür ist eine um ca. Faktor 2,3 erhöhte spezifische Maximalgeschwindigkeit dieses Proteins, die zwar die um ca. Faktor 2,7 verringerte Affinität zu ATP ausgleicht, nicht aber die um ca. Faktor 8 verringerte Affinität zu Kemptid.

Es läßt sich zusammenfassen, daß die rC α F185-Mutanten im Vergleich zum jeweiligen Wildtypenzym folgende kinetische Eigenschaften aufweisen. Alle Mutanten zeigen eine verringerte Affinität zu ATP. Hinsichtlich der Affinität zu Kemptid weisen rC α F185L sowie rC α F185A-His Verringerungen auf; rC α F185W-His zeigt die Tendenz zu einer Verringerung. Die geringeren Affinitäten gehen bei allen Mutanten einher mit erhöhten Umsatzraten. Hinsichtlich der katalytischen Effizienz zeigt jede Mutante eine eigene spezielle Verteilung von Effekten.

3.1.3 Mittels Resonance Mirror Affinography (RMA) ermittelte kinetische Parameter

Zur Ergänzung der mittels Aktivitätsassays gewonnenen kinetischen Daten, wurden weitere kinetische Parameter mit Hilfe der Resonance Mirror Affinography (RMA) ermittelt. Die Methode erlaubt die direkte Charakterisierung von Interaktionen zwischen Bindungspartnern, ohne daß eine nach Eintreten der Bindung evtl. sich anschließende enzymatische Reaktion dafür nötig wäre (wie z.B. beim Aktivitätsassay). Einer der Bindungspartner, der sogenannte Ligand, wird zunächst auf einer Sensoroberfläche immobilisiert. Anschließend wird der andere Bindungspartner, der sogenannte Analyt, in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und die entsprechenden Assoziations- und Dissoziationskinetiken gemessen. Auf diese Weise können verschiedene

kinetische Parameter der Bindung bestimmt werden. Details zu dieser Methode sind unter 2.4.11 aufgeführt.

Zunächst wurde das Meßsystem als solches etabliert bzw. optimiert. Aspekte hierzu sind in den Kapiteln 3.1.3.1 und 3.1.3.2 beschrieben bevor unter 3.1.3.3 die mit dieser Methode ermittelten Parameter als solche behandelt werden.

3.1.3.1 Optimierung der Liganden-Immobilisierung

Alle im Ergebnisteil aufgeführten RMA-Daten wurden unter Verwendung von Küvetten ermittelt, die als Matrix eine Carboxymethyldextranschicht (CMD-Schicht) aufwiesen. Als Ligand wurde PKI(5-24), ein synthetisches Peptid des physiologischen hitzestabilen Proteinkinaseinhibitors, an der CMD-Schicht immobilisiert. Dies geschah mittels *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC). Diese Art der Kopplung verbindet spezifisch die durch NHS/EDC aktivierten Carboxylgruppen der CMD-Schicht mit den N-terminalen primären Aminogruppen von PKI(5-24), wodurch eine homogene Immobilisierung erreicht wird.

Durch das Variieren verschiedener Parameter kann die Effizienz der Kopplung beeinflusst werden. Diese Parameter werden so gewählt, daß einerseits ausreichend Ligand immobilisiert wird, um bei den nachfolgenden Assoziations- und Dissoziationsmessungen ein Signal von ausreichender Stärke im Verhältnis zum gerätebedingten unspezifischen Rauschsignal des Meßsystems zu gewährleisten. Andererseits wird nicht zuviel Ligand gekoppelt, um eine gegenseitige sterische Behinderung einzelner Ligand-Moleküle bei der Bindung des Analyten zu vermeiden. Darüber hinaus können bei einer zu hohen Dichte des Liganden auf der Sensoroberfläche nach Zugabe des Analyten sogenannte Massentransfereffekte auftreten. Diese werden dadurch hervorgerufen, daß der Durchmischung des Küvettenvolumens physikalische Grenzen gesetzt sind. Ist die Bindung zwischen Ligand und Analyt hochaffin und liegt der Ligand in hoher Dichte vor, kann es in einer Flüssigkeitsschicht direkt am Liganden zu einer Verarmung an Analyt kommen. Die Bindungsreaktion wird dann nicht mehr durch die Affinität der Bindungspartner zueinander, sondern durch die vergleichsweise "langsame" Nachlieferung von Analyt limitiert.

Hinweise für das Auftreten von sterischer Behinderung oder von Massentransfereffekten bei einer Meßreihe liefert der Vergleich der durch thermodynamische Auswertung ermittelten Dissoziationsgleichgewichtskonstanten (K_D^{therm}) mit der durch kinetische Auswertung ermittelten Dissoziationsgleichgewichtskonstanten (K_D^{kin}) (siehe 2.4.11). Die thermodynamische Auswertungsmethode stützt sich lediglich auf das Bindungsgleichgewicht als solches,

während die kinetische Auswertungsmethode berücksichtigt, wie schnell das Bindungsgleichgewicht erreicht wird. Daher wird die thermodynamische Auswertung durch die oben beschriebenen Effekte nicht tangiert, während die kinetische Auswertung zu verfälschten Ergebnissen führt. Ein im Vergleich zu K_D^{therm} sehr viel größerer Wert für K_D^{kin} läßt so auf sterische Behinderung oder Massentransfereffekte bei der entsprechenden Meßreihe schließen.

Um geeignete Meßbedingungen zu erhalten, wurden bei der Immobilisierung von PKI(5-24) auf der CMD-Oberfläche der Meßküvetten (2.4.11) die folgenden Parameter variiert: Anzahl und Dauer der NHS/EDC-Aktivierungsschritte, pH des verwendeten Puffersystems, Konzentration des angebotenen Liganden und Dauer der Inkubation des Liganden mit der aktivierten CMD-Oberfläche. Es zeigte sich, daß von Peptid, das von der Firma Sigma bezogen worden war, eine größere Menge an der CMD-Matrix immobilisiert werden konnte, ohne die oben beschriebenen, für Massentransfereffekte bzw. sterische Behinderung typischen Befunde zu beobachten als von Peptid, das freundlicherweise von Herrn Dr. R. Pipkorn (Peptidsyntheseeinheit, DKFZ), zur Verfügung gestellt wurde (Daten nicht gezeigt). Da mit der Änderung der Herkunft des Peptides jedoch auch die Verwendung einer anderen Küvetten-Charge verbunden war, kann dieser Effekt nicht eindeutig auf einen der beiden veränderten Faktoren zurückgeführt werden.

Denkbar ist einerseits, daß das Lyophilisat des von Herrn Dr. R. Pipkorn stammenden PKI(5-24) (Pipkorn-Peptid) im Vergleich zu dem Lyophilisat des von der Firma Sigma bezogenen PKI(5-24) (Sigma-Peptid) eine größere Konzentration von PKI(5-24)-Fragmenten enthielt. Diese könnten vermehrt bei der Peptidsynthese entstanden sein und/oder durch eine wenig effektive Reinigung des synthetisierten Materials in dem Lyophilisat enthalten gewesen sein. Da die Konzentrationen der für die Immobilisierung verwendeten Peptidlösungen durch Einwiegen des entsprechenden Lyophilisates eingestellt wurden, ist denkbar, daß diese Fragmente in Lösung im Vergleich zu PKI(5-24) mit vollständiger Sequenz in nicht unerheblicher Konzentration vorlagen. Diese Fragmente könnten bei der Immobilisierung ebenfalls an die CMD-Oberfläche gebunden haben, ohne jedoch eine nennenswerte Affinität zu $rC\alpha$ zu zeigen. Beim Immobilisieren einer auf Basis der Lyophilisatmasse vergleichbaren Menge von Sigma-Peptid und Pipkorn-Peptid würde dies eine sterische Behinderung der Bindung zwischen Analyt und Ligand bei dem immobilisierten Pipkorn-Peptid erklären.

Alternativ oder ergänzend ist andererseits aber auch möglich, daß eine unterschiedliche räumliche Struktur des Carboxymethyldextran der unterschiedlichen verwendeten Küvetten-Chargen dafür verantwortlich war, daß in einem Fall eine größere immobilisierte Peptidmenge ohne störende sterische Effekte mit $rC\alpha$ interagieren konnte als im anderen Fall.

Der Erfolg der Kopplung und die relative Menge des immobilisierten Peptides wurde durch die Intensität des Bindungssignals in Gegenwart von 100 nM rC α sowie 200 μ M ATP und 15 mM MgCl $_2$ überprüft. Diese Signalintensität wurde nach Einstellen des Bindungsequilibriums bestimmt und lag bei Pipkorn-Peptid und der hierfür verwendeten Kopplungsprozedur üblicherweise zwischen 130 und 200 Winkelsekunden. Sigma-Peptid lieferte nach der hierfür verwendeten Kopplungsprozedur ein Signal von ca. 1000 bis 1500 Winkelsekunden. Der Versuchsablauf zur Bestimmung des Bindungssignals sowie die jeweiligen Kopplungsprozeduren sind unter 2.4.11 angegeben.

3.1.3.2 Etablierung und Optimierung des Bindungsassays

Zur Etablierung des Bindungsassays wurde zunächst das bei Verwendung einer mit immobilisierten PKI(5-24) versehenen Sensoroberfläche in Gegenwart von rC α , ATP und Mg $^{2+}$ detektierte Signal charakterisiert. Es zeigte sich eine essentielle Abhängigkeit der Signalintensität von den Komponenten (Daten nicht gezeigt). Dies ließ darauf schließen, daß PKI(5-24), rC α , ATP und Mg $^{2+}$ auf der Sensoroberfläche den bereits in der Einleitung beschriebenen Komplex bilden (siehe 1.1.2) und daß die Methode eine quantitative Bestimmung dieses Komplexes erlaubt.

Als Analyt bei den Bindungsassays zur Messung von Assoziations- und Dissoziationskinetiken (experimentelle Durchführung siehe 2.4.11) wurde entweder die rekombinant exprimierte katalytische Untereinheit von PKA, rC α , bzw. deren Mutanten oder ATP eingesetzt. Dabei wurde die Konzentration des zu untersuchenden Analyten zwischen dem 0,1- und 10fachen der erwarteten Dissoziationsgleichgewichtskonstanten (K_D) variiert, während die jeweils anderen Komponenten, die zur Entstehung des letztendlich vom Gerät detektierten Komplexes nötig sind, im Überschuß (ca. 10fach K_D) angeboten wurden. Die genannte Vorgehensweise wurde in Anlehnung an die unter 3.1.2 zur Bestimmung der Michaeliskonstanten beschriebenen gewählt. Dementsprechend wurde mit den RMA-basierten Assays wenn nicht anders angegeben die Interaktion zwischen rC α und PKI(5-24) in Gegenwart von Mg $^{2+}$ und ATP oder zwischen rC α und ATP in Gegenwart von PKI(5-24) und Mg $^{2+}$ charakterisiert. Für die Bezeichnung der entsprechenden kinetischen Parameter wird - auch im Folgenden - z.B. K_D PKI(5-24) bzw. K_D ATP verwendet. Weitere Zusätze bei diesen Bezeichnungen (z.B. K_D^{kin} ATP oder K_D^{therm} ATP) weisen auf die Art der Auswertung der Daten hin, aus denen die entsprechenden Werte hervorgegangen sind. Erläuterungen dazu sind unter 2.4.11 zu finden.

Zur optimalen Durchführung der RMA-Messungen im Hinblick auf hohe Reproduzierbarkeit und hohen Probendurchsatz, wurden zur Automatisierung der

Versuchsabläufe sogenannte Scripte entwickelt. Diese Programme sind speziell z.B. auf die Durchführung der Immobilisierung des Liganden oder auf den Versuchsablauf des Bindungsassays zugeschnitten (siehe 2.4.11) und im Anhang aufgeführt.

3.1.3.3 Geschwindigkeits- und Dissoziationsgleichgewichtskonstanten für ATP und PKI(5-24)

Die RMA-Messungen zur Bestimmung verschiedener kinetischer Parameter (Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{ass} , Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{diss} , Dissoziationsgleichgewichtskonstanten K_D) wurden mit Hilfe des o.g. Bindungsassays und der zugehörigen Scripte durchgeführt. Die Auswertung der entsprechenden Daten für $rC\alpha$, $rC\alpha$ -His und die $rC\alpha$ F185-Mutanten erfolgte unter Verwendung der FASTfit-Software, Version 2.03 (siehe 2.4.11).

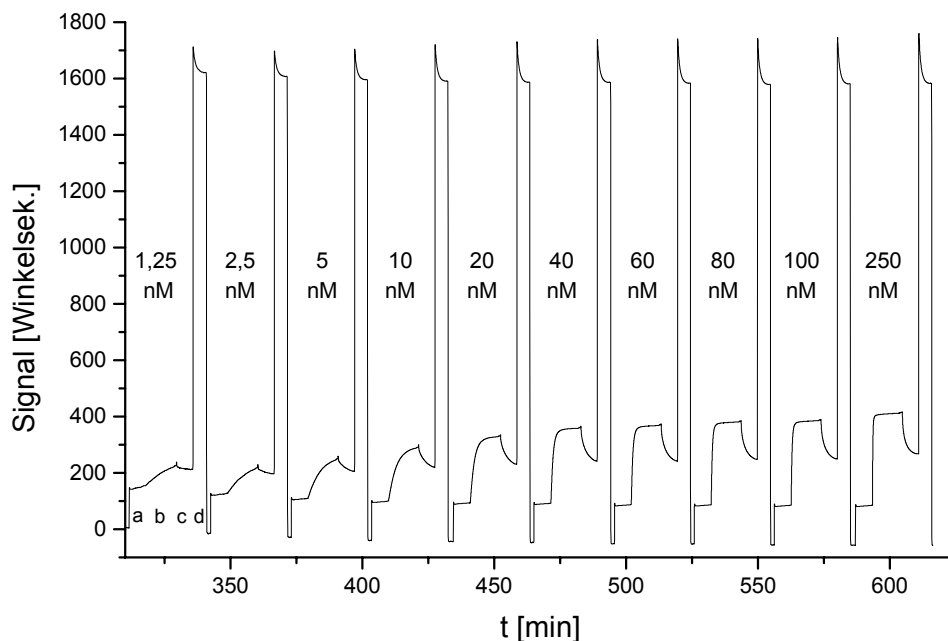


Abb. 3.7: RMA-Meßdaten zur Charakterisierung der Interaktion zwischen $rC\alpha$ und PKI(5-24) in Gegenwart von ATP

Die Messung wurde mit der unter 2.4.11 beschriebenen Methode durchgeführt. Die Abbildung zeigt zehn vom Script durchgeführte Meß-Zyklen. Diese bestehen jeweils aus vier Phasen: a) Umpuffern zum jeweiligen Assoziations-/Dissoziationspuffer, b) Assoziation des Proteins, c) Dissoziation des Proteins, d) Regeneration der Sensoroberfläche. Die jeweils verwendete Proteinkonzentration ist über den Zyklen angegeben.

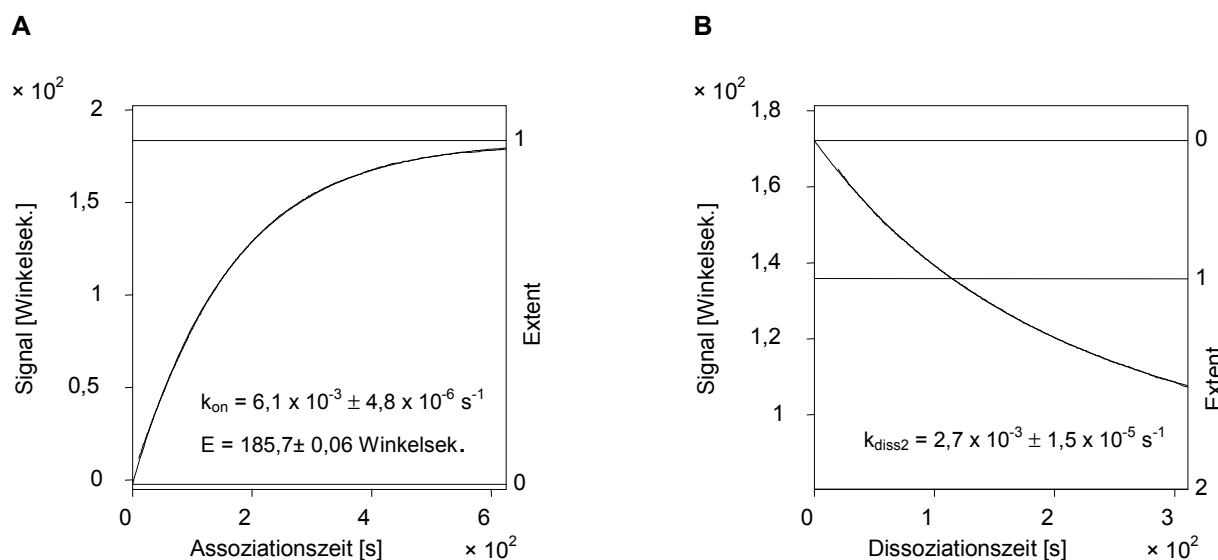


Abb. 3.8: Regression von RMA-Meßdaten

Mit RMA-Meßdaten, die zur Charakterisierung der Interaktion zwischen rC α und PKI(5-24) in Gegenwart von ATP bei einer Proteinkonzentration von 10 nM aufgenommen wurden (siehe Abb. 3.7), wurde eine Regression mittels FASTfit 2.03 (siehe 2.4.11) durchgeführt. Das Meßsignal bei Assoziation (**A**) sowie das Meßsignal bei Dissoziation (**B**) und die jeweilige Regressionsfunktion sind deckungsgleich. Die aus der Regression des Assoziations-Signals abgeleiteten Parameter, die apparente Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{on} und der Betrag der assoziationsbedingten RMA-Signaländerung E (Extent) sind angegeben. Die Regression des Dissoziations-Signals erlaubt die direkte Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{diss2} .

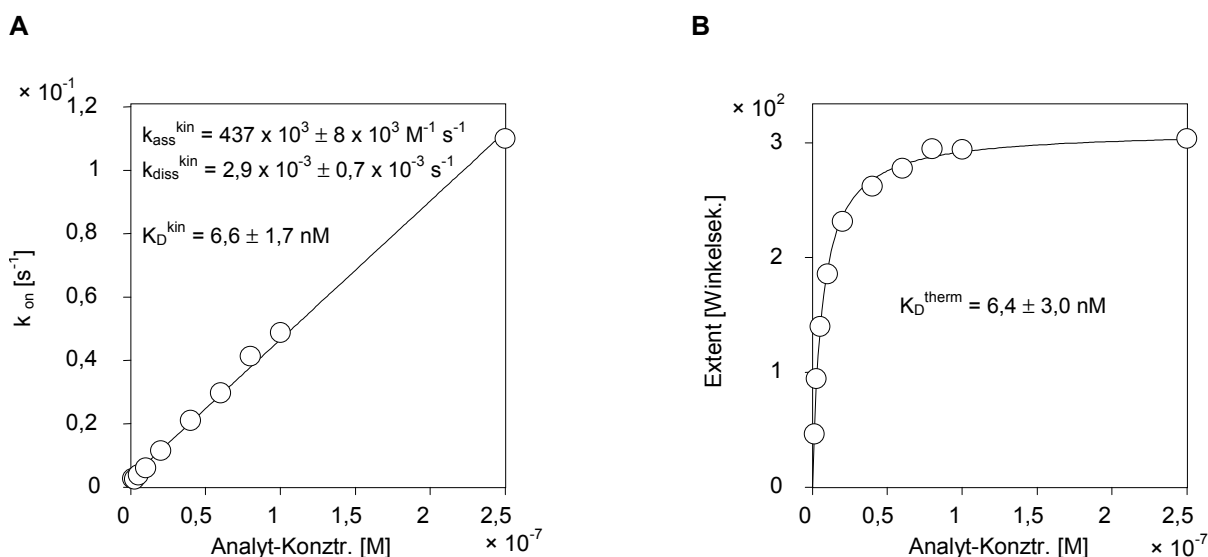
Exemplarisch für die durchgeführten Messungen sind RMA-Meßdaten (Abhängigkeit der RMA-Signalintensität von der Zeit) zur Bestimmung von K_D PKI(5-24) in Gegenwart von ATP für rC α , die Regression sowie die kinetische und thermodynamische Auswertung in den Abbildungen 3.7 - 3.9 gezeigt. Details hierzu sind im Material und Methoden-Teil (2.4.11) aufgeführt.

Abb. 3.9 (folgende Seite): Kinetische und thermodynamische Auswertung von durch Regression der RMA-Meßdaten erhaltenen Parametern

Die RMA-Meßdaten, die dieser Auswertung zugrunde liegen sind in Abb.3.7 und die Regression ist exemplarisch in Abb. 3.8 gezeigt. Die im Folgenden beschriebenen Auswertungsverfahren liefern im Idealfall einen identischen Wert für die Dissoziationsgleichgewichtskonstante (K_D).

A: Kinetische Auswertung. Die durch die Regression der RMA-Meßdaten erhaltenen Werte für die apparente Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{on} werden gegen die Analyt-, d.h. in diesem Falle gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und wie unter 2.4.11 angegeben ausgewertet. Die Steigung der Geradenfunktion beschreibt die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{ass}^{kin} und der Schnittpunkt mit der Y-Achse die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{diss}^{kin} (vergl. k_{diss2} , Abb.3.8). Der Quotient aus k_{diss}^{kin} und k_{ass}^{kin} ergibt die Dissoziationsgleichgewichtskonstante K_D^{kin} .

B: Thermodynamische Auswertung. Die durch die Regression der RMA-Meßdaten erhaltenen Werte für den Betrag der assoziationsbedingten RMA-Signaländerung E werden gegen die Analyt-, d.h. in diesem Falle gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und wie unter 2.4.11 angegeben ausgewertet. Die Analytkonzentration bei halbmaximalem Wert für E entspricht der Dissoziationsgleichgewichtskonstanten K_D^{therm} .



Die für rC α , rC α -His und die rC α F185-Mutanten mit Hilfe der Resonant Mirror Affinography (RMA) ermittelten kinetischen Parameter sind nachfolgend tabellarisch und in vergleichenden Diagrammen zusammenfassend dargestellt. Dabei gelten die die jeweilige Interaktion beschreibenden Parameter für den ternären Komplex aus Protein, ATP und PKI(5-24) in Gegenwart von Mg²⁺.

Die Daten wurden durch Messungen ermittelt, bei denen als Ligand PKI(5-24) unterschiedlicher Herkunft verwendet, damit eine unterschiedliche Immobilisierungsprozedur angewandt und infolgedessen auch eine unterschiedliche Sensitivität der Sensoroberflächen erreicht wurde (siehe 3.1.3.1). Der Vergleich von Messungen zur Charakterisierung der Interaktion von rC α mit PKI(5-24) in Gegenwart von ATP unter den oben genannten unterschiedlichen Bedingungen zeigt, daß die ermittelten Dissoziationsgleichgewichtskonstanten (K_D^{kin} und K_D^{therm}) übereinstimmen. Jedoch sind sowohl die ermittelte Assoziations- als auch die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{ass}^{kin} und k_{diss}^{kin}) der Messungen, bei denen PKI(5-24) verwendet wurde, das von Herrn Dr. R. Pipkorn (DKFZ Heidelberg) bezogen wurde, um den Faktor zwei bis drei größer als bei den entsprechenden Messungen, bei denen PKI(5-24) von der Firma Sigma verwendet wurde. Die Gründe, die zu den o.g. Unterschieden zwischen den jeweils bestimmten Geschwindigkeitskonstanten führten, konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Es ist denkbar, daß für diese Effekte die Zusammensetzung der verwendeten, jeweils unterschiedlichen Peptid-Lyophilisate selbst und/oder die unterschiedlichen Chargen der eingesetzten Küvetten verantwortlich sind.

Tabelle 3.7: Übersicht über Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{diss}), Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{ass}) und Dissoziationsgleichgewichtskonstanten (K_{D}) der untersuchten rC α -Proteine im ternären Komplex aus Protein, ATP und PKI(5-24)

Die Werte wurden mit den unter 2.4.11 beschriebenen Methoden und Gleichungen ermittelt. Die Daten in den grau unterlegten Feldern wurden durch Messungen ermittelt, für die PKI(5-24) zur Immobilisierung auf der Sensoroberfläche verwendet wurde, das von Herrn Dr. R. Pipkorn (DKFZ Heidelberg) bezogen wurde. Alle anderen Daten wurden durch Messungen erhalten, für die PKI(5-24) zur Immobilisierung verwendet wurde, das von der Firma Sigma erworben wurde (siehe auch Text; Abschnitt 3.1.3.1).

	Interaktion mit PKI(5-24) in Gegenwart von ATP				Interaktion mit ATP in Gegenwart von PKI(5-24)			
	$k_{\text{diss}}^{\text{kin}}$ [s ⁻¹] x 10 ³	$k_{\text{ass}}^{\text{kin}}$ [M ⁻¹ s ⁻¹] x 10 ⁻³	$K_{\text{D}}^{\text{kin}}$ [nM]	$K_{\text{D}}^{\text{therm}}$ [nM]	$k_{\text{diss}}^{\text{kin}}$ [s ⁻¹] x 10 ³	$k_{\text{ass}}^{\text{kin}}$ [M ⁻¹ s ⁻¹] x 10 ⁻³	$K_{\text{D}}^{\text{kin}}$ [nM]	$K_{\text{D}}^{\text{therm}}$ [nM]
rC α	2,1 ± 0,7	360 ± 70	5,8 ± 0,9	7,7 ± 1,4	1,7 ± 0,2	8,3 ± 1,3	210 ± 60	200 ± 40
rC α	6,9 ± 2,2	860 ± 120	8,0 ± 2,8	9,1 ± 1,4				
rC α F185L	6,6 ± 1,5	870 ± 190	8,0 ± 2,8	13,5 ± 7,0	4,7 ± 1,2	12,2 ± 2,9	410 ± 170	450 ± 50
rC α F185W- His	5,8 ± 0,8	380 ± 50	15,4 ± 2,6	12,2 ± 4,1	3,5 ± 0,1	6,8 ± 0,4	510 ± 40	570 ± 60
rC α F185A- His	7,6 ± 2,1	360 ± 50	21,8 ± 8,2	16,1 ± 5,0	5,9 ± 0,2	4,7 ± 0,5	1280 ± 130	1350 ± 140
rC α - His	4,6 ± 1,0	510 ± 140	9,7 ± 4,1	13,2 ± 6,0	5,6 ± 1,6	17,2 ± 3,1	320 ± 40	280 ± 40

Um eine Verfälschung der Relationen beim Vergleich einzelner Parameter miteinander zu vermeiden, werden im Folgenden nur solche kinetische Parameter miteinander verglichen, die durch Messungen ermittelt wurden, bei denen PKI(5-24) derselben Herkunft bzw. dieselbe Immobilisierungsprozedur verwendet wurde und damit dieselbe Sensitivität der Sensoroberfläche gegeben war. Diese Vergleichbarkeit ist einerseits innerhalb der Gruppe von Parametern gewährleistet, die in Tab. 3.7 grau unterlegt sind (Peptidherkunft: Dr. R. Pipkorn, DKFZ Heidelberg). Andererseits können die übrigen dort angegebenen nicht grau unterlegten Parameter zueinander in Relation gesetzt werden (Peptidherkunft: Firma Sigma).

Der Vergleich der ermittelten Parameter für rC α und rC α -His (Tab. 3.8 bzw. Abb. 3.10) zeigt, daß rC α -His im Vergleich zu rC α die Tendenz zu einer geringfügig geringeren Affinität sowohl zu PKI(5-24) als auch zu ATP in Gegenwart des jeweils anderen Bindungspartners aufweist. So ist für rC α -His im Vergleich zu rC α $K_{\text{D}}^{\text{PKI(5-24)}}$ ca. um den Faktor 1,7 größer (Abb. 3.10; A1) und $K_{\text{D}}^{\text{ATP}}$ ca. um den Faktor 1,4 - 1,5 größer (Abb. 3.10; B1). Der Grund hierfür ist ein Anstieg der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten im Vergleich zu rC α um den Faktor 2

($k_{\text{diss}}^{\text{kin}}$ PKI(5-24)) bzw. um ca. Faktor 3 ($k_{\text{diss}}^{\text{kin}}$ ATP). Die entsprechenden Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (Abb. 3.10; A2 und B2) nehmen dagegen im Vergleich zu rC α nur ungefähr um die Faktoren 1,4 ($k_{\text{ass}}^{\text{kin}}$ PKI(5-24)) bzw. 2 ($k_{\text{ass}}^{\text{kin}}$ ATP) zu.

Tab. 3.8: Vergleich der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{diss}), Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{ass}) und Dissoziationsgleichgewichtskonstanten (K_{D}) von rC α und rC α -His im ternären Komplex aus Protein, ATP und PKI(5-24)

Die Werte sind in Relation zu den entsprechenden Werten von rC α angegeben. Die absoluten Werte in Tab. 3.7 aufgeführt.

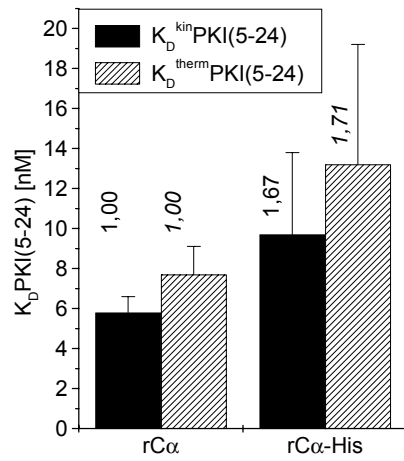
	Interaktion mit PKI(5-24) in Gegenwart von ATP				Interaktion mit ATP in Gegenwart von PKI(5-24)			
	$k_{\text{diss}}^{\text{kin}}$	$k_{\text{ass}}^{\text{kin}}$	$K_{\text{D}}^{\text{kin}}$	$K_{\text{D}}^{\text{therm}}$	$k_{\text{diss}}^{\text{kin}}$	$k_{\text{ass}}^{\text{kin}}$	$K_{\text{D}}^{\text{kin}}$	$K_{\text{D}}^{\text{therm}}$
rC α	1,00 \pm 0,33	1,00 \pm 0,19	1,00 \pm 0,16	1,00 \pm 0,18	1,00 \pm 0,12	1,00 \pm 0,16	1,00 \pm 0,29	1,00 \pm 0,20
rC α -His	2,19 \pm 0,48	1,42 \pm 0,39	1,67 \pm 0,71	1,71 \pm 0,78	3,29 \pm 0,94	2,07 \pm 0,37	1,52 \pm 0,19	1,40 \pm 0,20

Die Standardabweichungen der o.g. Parameter sind allerdings im Verhältnis zu den Unterschieden der entsprechenden Mittelwerte teilweise sehr groß, so daß eine verlässliche Aussage nicht möglich ist. Die beschriebenen Tendenzen decken sich jedoch mit den Ergebnissen, die durch Aktivitätsassays ermittelt wurden. Auch hier zeigt sich bei rC α -His im Vergleich zu rC α eine geringere Affinität zu ATP und zum Substratpeptid Kemptid (vergl. Abb. 3.5). Eine mögliche Begründung hierfür wurde in diesem Zusammenhang (3.1.2) bereits gegeben.

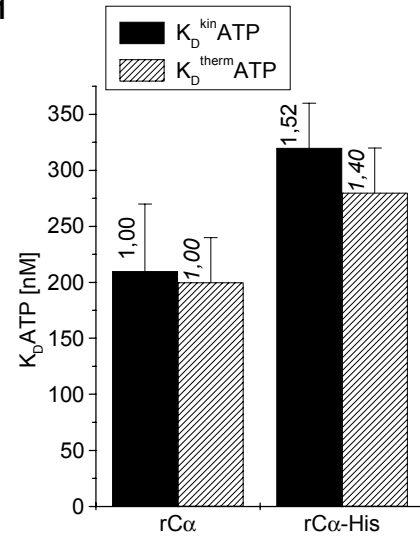
Abb. 3.10 (siehe folgende Seite): Vergleich der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{diss}), Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{ass}) und Dissoziationsgleichgewichtskonstanten (K_{D}) von rC α und rC α -His im ternären Komplex aus Protein, ATP und PKI(5-24)

Die Werte wurden wie unter 2.4.11 beschrieben ermittelt und sind in Tab. 3.7 zusammenfassend aufgeführt. Über den Säulen sind die den absoluten Werten entsprechenden relativen Werte aus Tab. 3.8 angegeben (kursiv für $K_{\text{D}}^{\text{therm}}$). Die unter **A** gezeigten Parameter beschreiben die Interaktion zwischen dem jeweiligen rC α -Protein und PKI(5-24) in Gegenwart von ATP, die unter **B** die Interaktion zwischen dem jeweiligen rC α -Protein und ATP in Gegenwart von PKI(5-24). Unter **1** sind die jeweiligen Dissoziationsgleichgewichtskonstanten $K_{\text{D}}^{\text{kin}}$ bzw. $K_{\text{D}}^{\text{therm}}$, unter **2** die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten $k_{\text{diss}}^{\text{kin}}$ und unter **3** die Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten $k_{\text{ass}}^{\text{kin}}$ dargestellt.

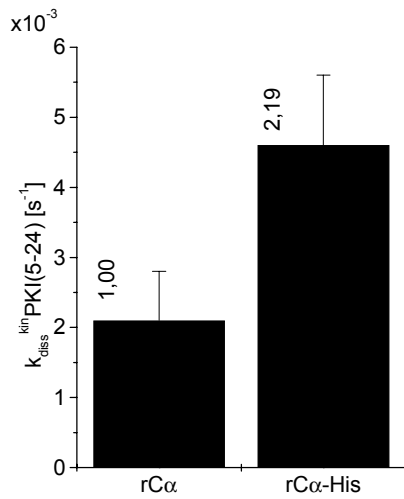
A1



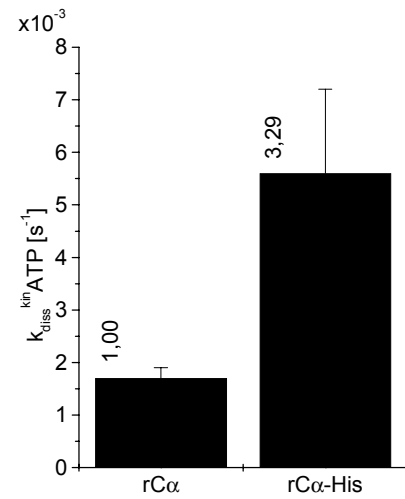
B1



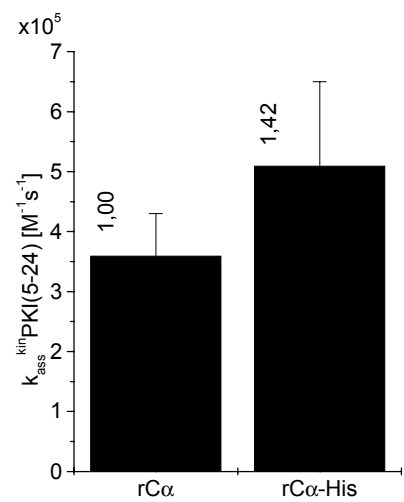
A2



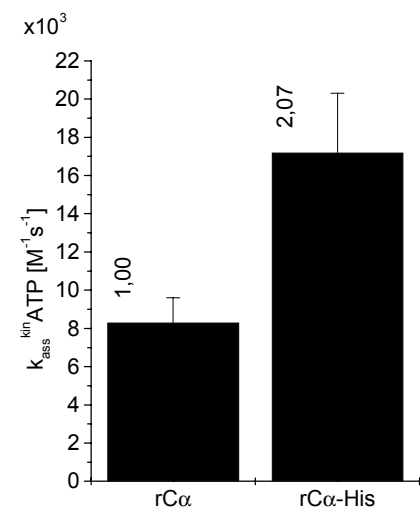
B2



A3



B3



Wegen der möglicherweise veränderten kinetischen Eigenschaften von rC α -His im Vergleich zu rC α wird mit den hier beschriebenen Daten im Weiteren ebenso verfahren wie schon mit den Daten, die durch Aktivitätsassays erhalten wurden. So werden die mittels RMA-Messungen erhaltenen Parameter von Mutanten, die einen His-tag tragen im Folgenden in Relation zu den entsprechenden Daten von rC α -His gesetzt. Das Protein rC α F185L dagegen wird im Vergleich zu rC α beschrieben.

Tab. 3.9: Vergleich der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{diss}), Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{ass}) und Dissoziationsgleichgewichtskonstanten (K_{D}) von rC α und rC α F185L im ternären Komplex aus Protein, ATP und PKI(5-24)

Die Werte sind in Relation zu den entsprechenden Werten von rC α angegeben. Die absoluten Werte in Tab.3.7 aufgeführt.

	Interaktion mit PKI(5-24) in Gegenwart von ATP				Interaktion mit ATP in Gegenwart von PKI(5-24)			
	$k_{\text{diss}}^{\text{kin}}$	$k_{\text{ass}}^{\text{kin}}$	$K_{\text{D}}^{\text{kin}}$	$K_{\text{D}}^{\text{therm}}$	$k_{\text{diss}}^{\text{kin}}$	$k_{\text{ass}}^{\text{kin}}$	$K_{\text{D}}^{\text{kin}}$	$K_{\text{D}}^{\text{therm}}$
rC α	1,00 $\pm 0,32$	1,00 $\pm 0,14$	1,00 $\pm 0,35$	1,00 $\pm 0,15$	1,00 $\pm 0,12$	1,00 $\pm 0,17$	1,00 $\pm 0,29$	1,00 $\pm 0,20$
rC α F185L	0,96 $\pm 0,22$	1,01 $\pm 0,22$	1,00 $\pm 0,35$	1,48 $\pm 0,77$	2,76 $\pm 0,71$	1,47 $\pm 0,35$	1,95 $\pm 0,81$	2,25 $\pm 0,25$

Tab. 3.10: Vergleich der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{diss}), Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{ass}) und Dissoziationsgleichgewichtskonstanten (K_{D}) von rC α -His, rC α F185W-His und rC α F185A-His im ternären Komplex aus Protein, ATP und PKI(5-24)

Die Werte sind in Relation zu den entsprechenden Werten von rC α -His angegeben. Die absoluten Werte sind in Tab. 3.7 aufgeführt.

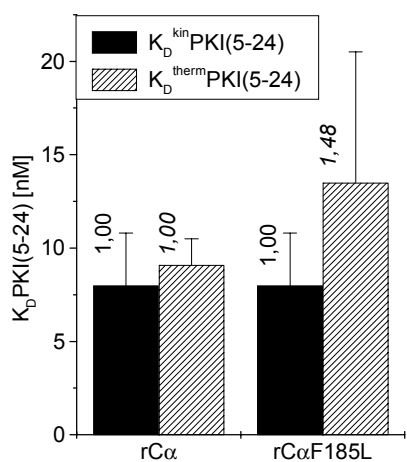
	Interaktion mit PKI(5-24) in Gegenwart von ATP				Interaktion mit ATP in Gegenwart von PKI(5-24)			
	$k_{\text{diss}}^{\text{kin}}$	$k_{\text{ass}}^{\text{kin}}$	$K_{\text{D}}^{\text{kin}}$	$K_{\text{D}}^{\text{therm}}$	$k_{\text{diss}}^{\text{kin}}$	$k_{\text{ass}}^{\text{kin}}$	$K_{\text{D}}^{\text{kin}}$	$K_{\text{D}}^{\text{therm}}$
rC α - His	1,00 $\pm 0,22$	1,00 $\pm 0,27$	1,00 $\pm 0,42$	1,00 $\pm 0,45$	1,00 $\pm 0,29$	1,00 $\pm 0,18$	1,00 $\pm 0,13$	1,00 $\pm 0,14$
rC α F185W- His	1,26 $\pm 0,17$	0,75 $\pm 0,10$	1,59 $\pm 0,27$	0,92 $\pm 0,31$	0,63 $\pm 0,02$	0,40 $\pm 0,02$	1,59 $\pm 0,13$	2,04 $\pm 0,21$
rC α F185A- His	1,65 $\pm 0,46$	0,71 $\pm 0,10$	2,25 $\pm 0,85$	1,22 $\pm 0,38$	1,05 $\pm 0,04$	0,27 $\pm 0,03$	4,00 $\pm 0,41$	4,82 $\pm 0,50$

Bezüglich der Affinität zu PKI(5-24) in Gegenwart von ATP zeigen die Mutanten rC α F185L, rC α F185W-His und rC α F185A-His in Relation zu rC α bzw. rC α -His keine bzw. keine meßbaren Effekte. Alle entsprechenden Parameter liegen unter Berücksichtigung der Fehler im Bereich des jeweiligen Referenzwertes für rC α bzw. rC α -His (Abb. 3.11; A und B). Lediglich bei rC α F185A-His deutet sich evtl. eine Tendenz zu einer im Vergleich zu rC α -His geringeren Affinität zu PKI(5-24) an. Diese wird hervorgerufen durch eine geringfügig erhöhte Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante und eine geringfügig verringerte Assoziationsgeschwindigkeitskonstante. Die daraus möglicherweise resultierende tendenziell erhöhte Dissoziationsgleichgewichtskonstante für das Inhibitorpeptid stünde im Einklang mit Ergebnissen, die mit Hilfe von Aktivitätsassays erhalten wurden. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, daß rC α F185A-His von den hier untersuchten Mutanten die stärksten Effekt hinsichtlich einer verringerten Affinität für das Substratpeptid aufweist (Abb. 3.5).

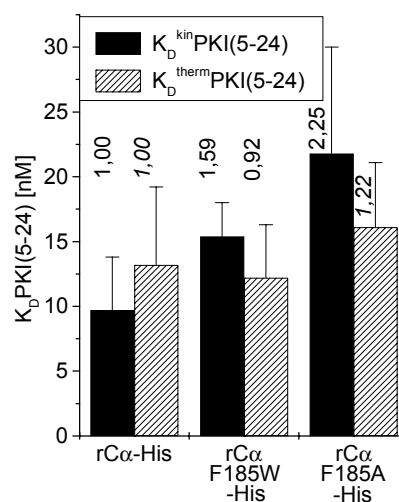
Abb. 3.11 (siehe folgende Seite): Vergleich der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{diss}), Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{ass}) und Dissoziationsgleichgewichtskonstanten (K_{D}) für die jeweilige Interaktion von rC α , rC α F185L, rC α -His, rC α F185W-His und rC α F185A-His mit PKI(5-24) in Gegenwart von ATP

Die Werte wurden wie unter 2.4.11 beschrieben ermittelt und sind in Tab. 3.7 zusammenfassend aufgeführt. Über den Säulen sind die den absoluten Werten entsprechenden relativen Werte aus Tab. 3.9 und 3.10 angegeben (kursiv für $K_{\text{D}}^{\text{therm}}$). Unter **A** wird der Vergleich der Parameter von rC α und rC α F185L, unter **B** von rC α -His, rC α F185W-His und rC α F185A-His gezeigt. Unter **1** sind die jeweiligen Dissoziationsgleichgewichtskonstanten $K_{\text{D}}^{\text{kin}}$ bzw. $K_{\text{D}}^{\text{therm}}$, unter **2** die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten $k_{\text{diss}}^{\text{kin}}$ und unter **3** die Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten $k_{\text{ass}}^{\text{kin}}$ dargestellt.

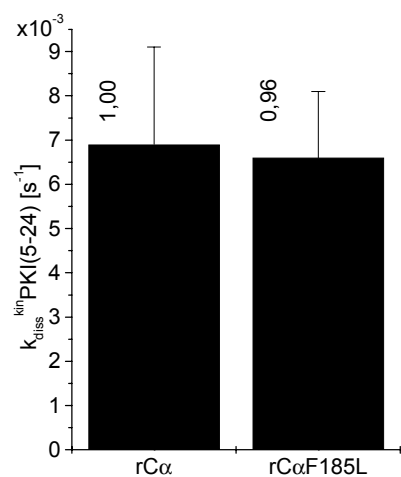
A1



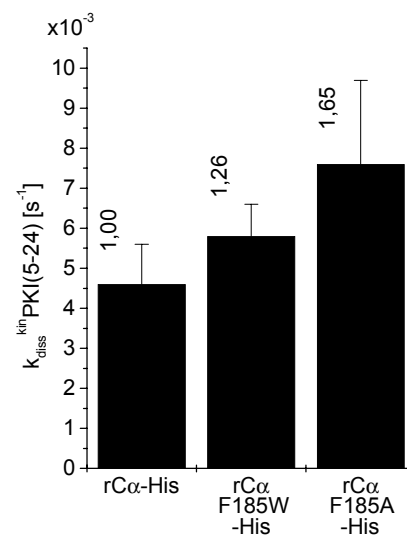
B1



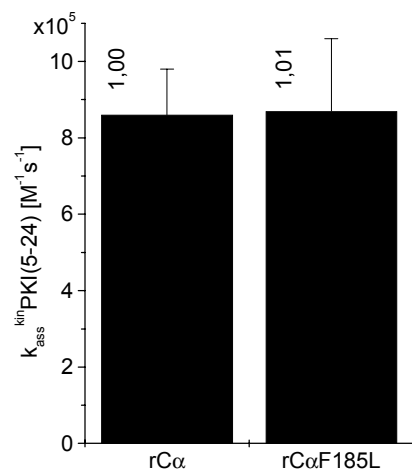
A2



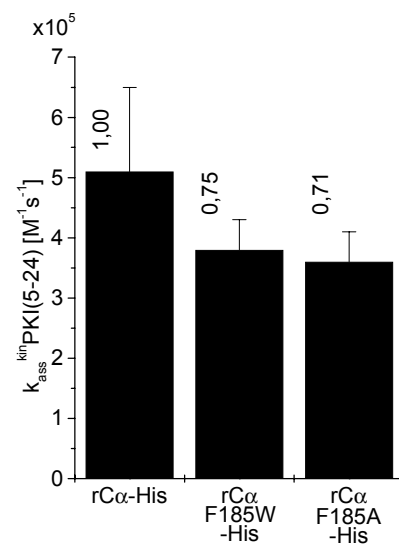
B2



A3



B3



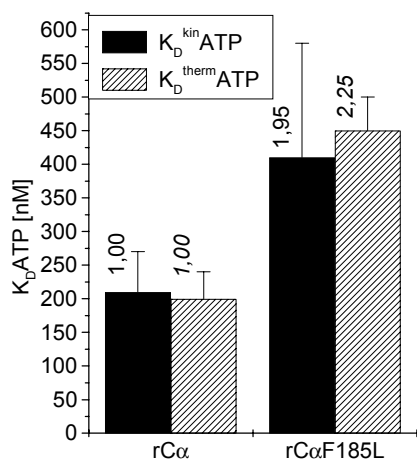
Bezüglich der ermittelten Affinitäten zu ATP in Gegenwart von PKI(5-24) zeigen rC α F185L und rC α F185W-His im Vergleich zur jeweiligen Referenz (rC α bzw. rC α -His) ähnliche Effekte. In beiden Fällen ist die entsprechende Dissoziationsgleichgewichtskonstante um ca. 60 - 100 % in Relation zu rC α bzw. rC α -His größer (Abb. 3.12; A1 und B1). Allerdings sind die Gründe für diese gleichermaßen veränderten Affinitäten bei den Mutanten unterschiedlich. Während bei rC α F185L die Erhöhung von K_D ATP in Gegenwart von PKI(5-24) durch den Anstieg der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten und der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten im Vergleich zu rC α um ca. Faktor 2,8 bzw. um ca. Faktor 1,5 hervorgerufen wird, zeigt sich bei rC α F185W-His im Vergleich zu rC α -His eine Verringerung von $k_{\text{diss}}^{\text{kin}}$ auf ca. 60 % und eine Verringerung von $k_{\text{ass}}^{\text{kin}}$ auf 40 % (Abb. 3.12; A2, A3, B2, B3). Die Mutante rC α F185A-His weist unter dem Aspekt der Affinität zu ATP in Gegenwart von PKI(5-24) im Vergleich zu den anderen hier beschriebenen Mutanten die stärksten Veränderungen auf. So ist K_D ATP dieses Proteins in Relation zu rC α -His ca. um den Faktor 4 - 5 erhöht. Auffällig ist hierbei, daß diese verringerte Affinität lediglich durch eine entsprechend veränderte Assoziationsgeschwindigkeitskonstante verursacht wird. Diese ist im Vergleich zu rC α -His um ca. 70 % verringert. Dagegen zeigt $k_{\text{diss}}^{\text{kin}}$ im Vergleich zur Referenz (rC α -His) keine Veränderungen (Abb. 3.12; B1 - B3).

Alle hier behandelten Mutanten zeigen also im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp eine verringerte Affinität zu ATP in Gegenwart von PKI(5-24). Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den Daten, die mit Hilfe von Aktivitätsassays ermittelt wurden (Abb. 3.5). Die Größe der Faktoren, die die Vergrößerung der Dissoziationsgleichgewichtskonstanten für ATP in Gegenwart von PKI(5-24) beschreiben, ist vergleichbar mit der Größe der Faktoren, die die Vergrößerung der Michaeliskonstanten für ATP beschreiben.

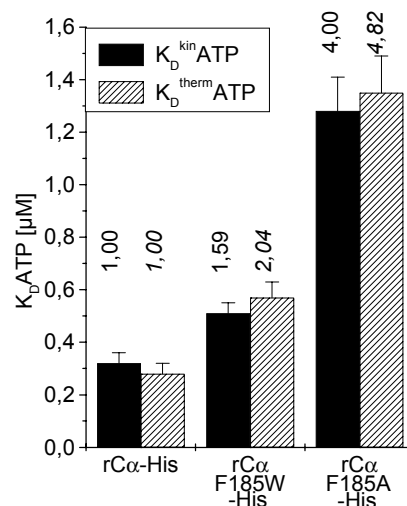
Abb. 3.12 (siehe folgende Seite): Vergleich der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{diss}), Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{ass}) und Dissoziationsgleichgewichtskonstanten (K_D) für die jeweilige Interaktion von rC α , rC α F185L, rC α -His, rC α F185W-His und rC α F185A-His mit ATP in Gegenwart von PKI(5-24)

Die Werte wurden wie unter 2.4.11 beschrieben ermittelt und sind in Tab. 3.7 zusammenfassend aufgeführt. Über den Säulen sind die den absoluten Werten entsprechenden relativen Werte aus Tab. 3.9 und 3.10 angegeben (kursiv für K_D^{therm}). Unter **A** wird der Vergleich der Parameter von rC α und rC α F185L, unter **B** von rC α -His, rC α F185W-His und rC α F185A-His gezeigt. Unter **1** sind die jeweiligen Dissoziationsgleichgewichtskonstanten K_D^{kin} bzw. K_D^{therm} , unter **2** die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten $k_{\text{diss}}^{\text{kin}}$ und unter **3** die Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten $k_{\text{ass}}^{\text{kin}}$ dargestellt.

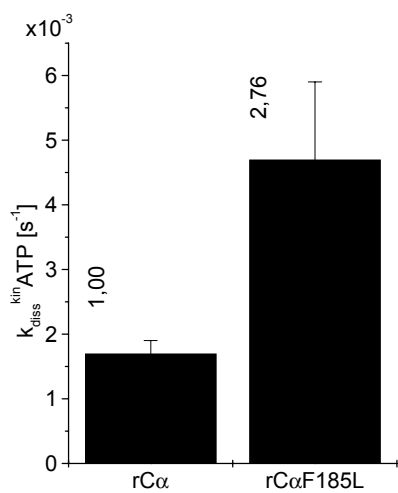
A1



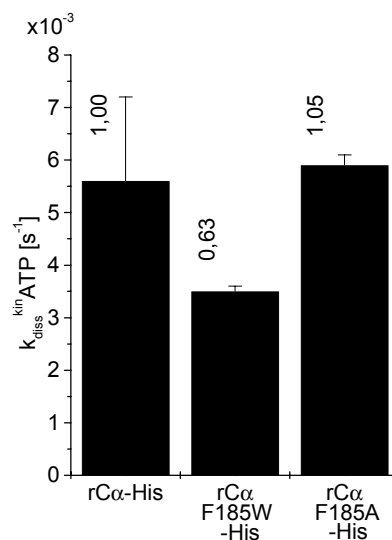
B1



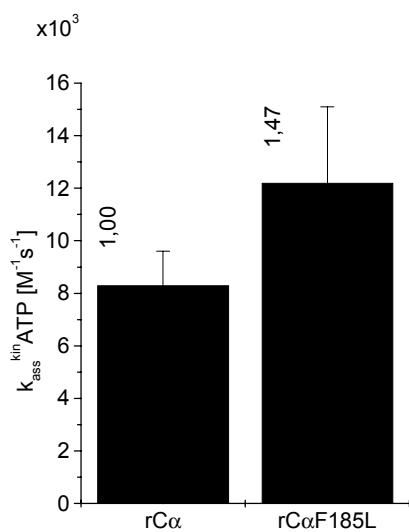
A2



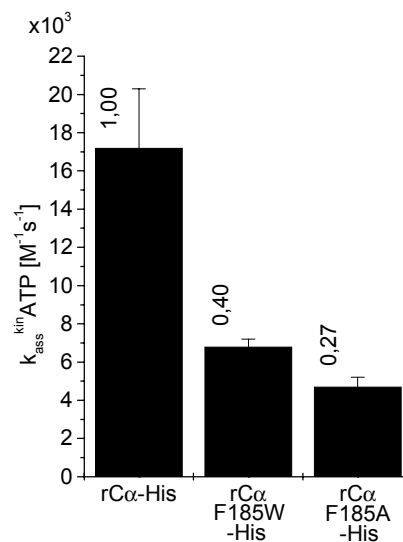
B2



A3



B3



Insgesamt bleibt festzuhalten, daß die mittels RMA-Messungen erhaltenen Ergebnisse keine bzw. keine meßbaren veränderten Eigenschaften der Mutanten bezüglich der Affinität zu PKI(5-24) in Gegenwart von ATP zeigen. Hinsichtlich der Interaktion mit ATP im ternären Komplex aus Protein, ATP und PKI(5-24) weisen die untersuchten Mutanten verringerte Affinitäten auf. Diese Befunde decken sich - auch hinsichtlich der Intensitäten der Effekte - mit den Befunden, die mittels Aktivitätsassays ermittelt wurden.

3.1.4 Kristallisation von rC α F185W

Aus den kinetischen Untersuchungen der rC α F185-Mutanten mit Hilfe von Aktivitätsassays ging hervor, daß rC α F185W-His im Vergleich zu rC α -His keine bzw. nur geringe Effekte bezüglich der Affinität zu Kemptid und der spezifischen Maximalgeschwindigkeit aufweist. Hinsichtlich der Affinität für ATP dagegen weist diese Mutante veränderte Eigenschaften auf. Dieser Befund, der evtl. auf eine selektive Beeinflussung der Nukleotidbindung hinweist, machte diese Mutante interessant für eine Röntgenstrukturanalyse, um so Einblicke in die strukturellen Konsequenzen der Mutation zu erhalten.

3.1.4.1 Expression und Präparation von rC α F185W

Die Expression und Präparation der rC α -Mutante mit dem Aminosäureaustausch F185W für die Kristallisation erfolgte nach einer anderen Vorgehensweise als für die kinetische Charakterisierung (3.1.1).

Grund hierfür war, daß für die Kristallisation ein hinsichtlich des Phosphorylierungsgrades möglichst homogenes Präparat angestrebt wurde, da dieser Aspekt für eine erfolgreiche Kristallisation essentiell ist. Dagegen wurde auf eine Auftrennung der Präparate in die unterschiedlichen Phosphorylierungsstufen (zweifach, dreifach, vierfach) verzichtet, wenn das Protein kinetisch charakterisiert wurde, da lediglich die Phosphorylierung an Threonin 197 eine essentielle Bedeutung für die katalytische Aktivität des Enzyms zu haben scheint (Adams *et al.*, 1995; Girod *et al.*, 1996; Yonemoto *et al.*, 1997; Steinberg, 1991; Yonemoto *et al.*, 1997).

Grund für die veränderte Vorgehensweise hinsichtlich der Expression und Präparation der rC α -Mutante mit dem Aminosäureaustausch F185W für die Kristallisation war aber auch folgende Situation. Die bisherigen Untersuchungen der rC α -Mutante mit dem Aminosäureaustausch F185W wurden mit dem entsprechenden His-tag-tragenden

Fusionsprotein durchgeführt (siehe 2.4.1 bzw. 3.1.1). Eine Strategie, um eine rC α -Mutante, die der Coexpression mit dem Wildtypenzym bedarf, ohne evtl. störenden His-tag sowie in ausreichenden Mengen und in homogener Phosphorylierungsstufe zu präparieren, wurde erstmals im Rahmen dieser Arbeit im Hinblick auf die Kristallisation von rC α F185W entwickelt. Die Vorgehensweise wird im Folgenden beschrieben.

Zunächst wurde eine Coexpression in *E. coli* durchgeführt, bei der die bisher verwendete Kombination von Vektoren und Inserts (siehe 2.4.1 bzw. 3.1.1) derart verändert wurde, daß nun rC α als His-tag-Fusionsprotein, d.h. mit Hilfe des pET-28b(+)-Vektors, und rC α F185W ohne His-tag, also mit Hilfe des pT7-7-Vektors, exprimiert wurde. Die PKI(5-24)-Affinitätschromatographie (siehe 2.4.2.2 bzw. 3.1.1) lieferte dementsprechend ein Proteingemisch aus rC α -His und rC α F185W. Dieses Proteingemisch wurde anschließend jedoch nicht mittels der Affinität des His-tags zu einer Ni²⁺-Matrix getrennt. Dagegen wurde eine Mono-S-Ionenaustauscherchromatographie durchgeführt. Das hierbei angewendete Verfahren I (siehe 2.4.2.4), welches im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde, nutzt den Umstand, daß der His-tag bei einem pH-Wert von 8,5 die positive Nettoladungsdichte des Fusionsproteins im Vergleich zum Protein ohne His-tag verringert. Dadurch bindet unter diesen Bedingungen nur das nicht mit einem His-tag versehene rC α -Protein, d.h. in diesem Fall rC α F185W, an die Säulenmatrix.

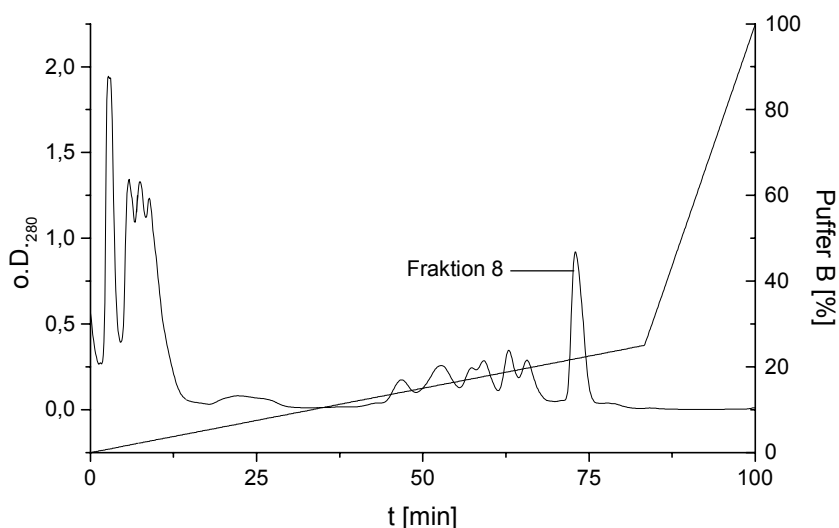


Abb. 3.13: Trennung von rC α -His und rC α F185W mittels Ionenaustauscherchromatographie

Die Proteine rC α -His und rC α F185W wurden in *E. coli* coexprimiert (2.4.1). Das Gemisch dieser Proteine aus dem Eluat der PKI(5-24)-Affinitätschromatographie (2.4.2.2) wurde einer Ionenaustauscherchromatographie (Verfahren I, siehe 2.4.2.4) mittels einer Mono-S-Säule (10/10) unterzogen. Die Elution erfolgte hierbei mit einem LiCl-Gradienten.

Bei dem entsprechenden FPLC-Lauf befand sich rC α -His im Durchlauf bzw. eluierte schon bei sehr geringen Salzkonzentrationen, während rC α F185W bei ca. 200 mM LiCl (ca. 20 % Puffer B) eluierte (Fraktion 8; siehe Abb. 3.13). Die Identität und der

Reinheitsgrad der durch dieses Verfahren gewonnenen Fraktion 8 wurden massenspektrometrisch ermittelt. Danach enthielt diese Fraktion dreifach phosphoryliertes rC α F185W-Protein (siehe Abb. 3.14). Somit ermöglichte das beschriebene chromatographische Verfahren eine Trennung von rC α -His und rC α F185W sowie eine Isolierung von rC α F185W in homogener Phosphorylierungsstufe in einem Schritt.

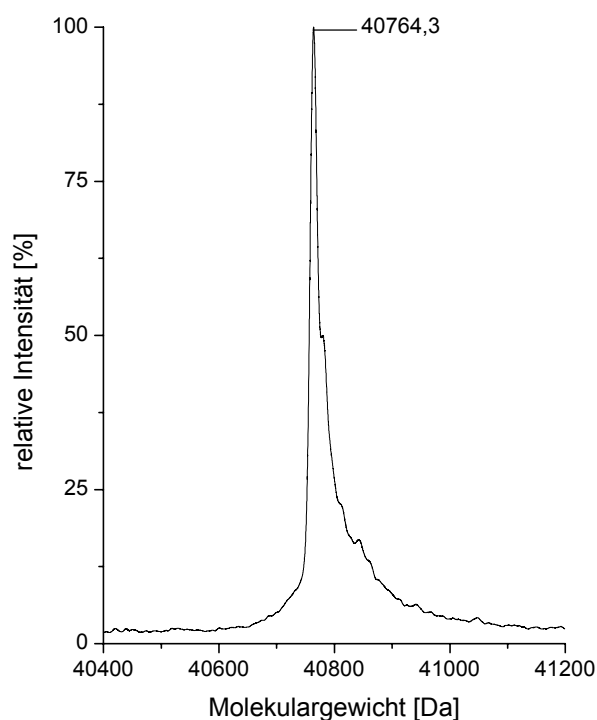


Abb. 3.14: Analyse von rC α F185W, Fraktion 8 mittels ESI-Massenspektrometrie

Die Präparation erfolgte wie unter Abb. 3.13 angegeben. Die Messung wurde von A. Schlosser (Abteilung Zentrale Spektroskopie, DKFZ Heidelberg) wie unter 2.4.8 angegeben durchgeführt. Das ermittelte Molekulargewicht von 40764,3 Da entspricht dreifach phosphoryliertem rC α F185W-Protein (theoretisches Molekulargewicht: 40767 Da).

3.1.4.2 Die Kristallstruktur von rC α F185W

Das wie unter 3.1.4.1 beschrieben gereinigte rC α F185W-Protein wurde im binären Komplex mit PKI(5-24) kristallisiert (2.4.12). Die röntgenkristallographische Untersuchung und die Strukturanalyse wurde im Rahmen einer Kooperation von Dr. R. A. Engh (Roche) am MPI für Biochemie in Martinsried, Abteilung Strukturforschung, durchgeführt. Die aus diesen Untersuchungen resultierende Struktur von rC α F185W mit einer Auflösung von ca. 2,5 Å ist in Abb. 3.15 ausschnitthaft und im Vergleich mit anderen bereits bekannten Strukturen von C α - oder rC α -Proteinen, die alle - wie auch die Strukturen der Mutanten - geschlossene Konformationen des Enzyms widerspiegeln (siehe 1.1.2), dargestellt. Dazu zählt auch die bereits im Vorfeld dieser Arbeit mit einer Auflösung von ca. 2,1 Å gelöste Struktur von rC α F185L. Dieses rC α -Protein wurde in Gegenwart von MnATP und PKI(5-24) kristallisiert. Allerdings ist in der entsprechenden

Struktur zwar das Inhibitorpeptid zu erkennen, vom ATP ist aber lediglich der Nucleosidanteil sowie das γ -Phosphat sichtbar. Im Bereich des α - und β -Phosphates sowie des essentiellen Metallions ist keine Elektronendichte zu verzeichnen. Daher zeigt diese Struktur weder einen ternären noch einen binären Komplex im eigentlichen Sinne und wird im Folgenden mit einem Stern (*) gekennzeichnet, um auf diesen Umstand hinzuweisen.

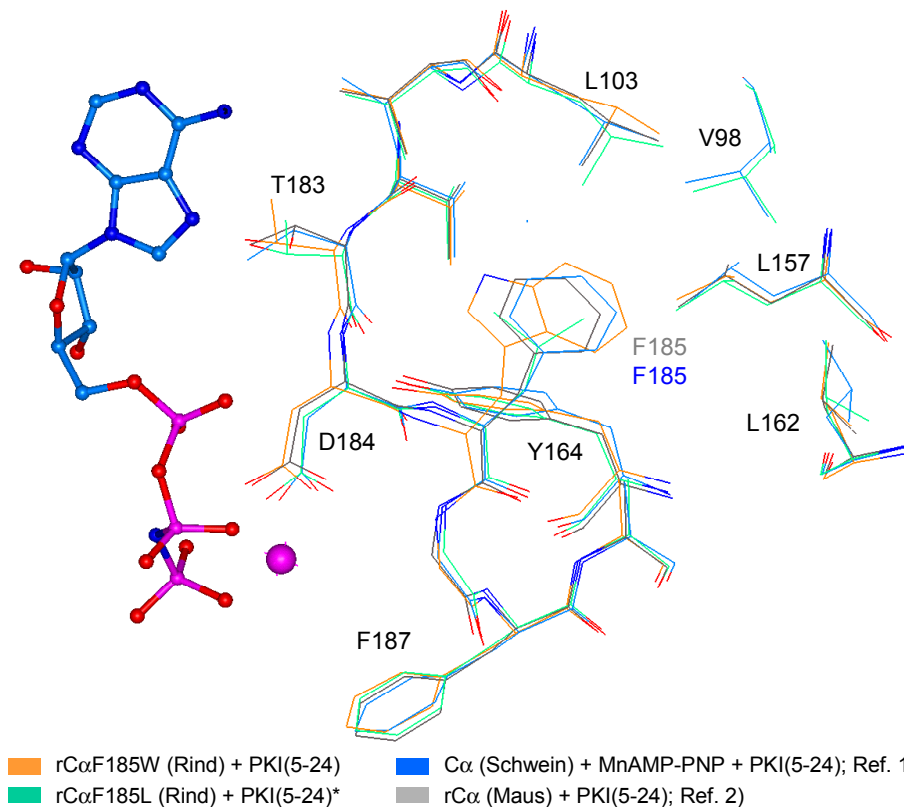


Abb. 3.15: Strukturelle Effekte von Mutationen an F185 des DFG-Motivs von rC α

Die Strukturen von rC α F185L (Rind) + PKI(5-24)*, rC α F185W (Rind) + PKI(5-24) und C α (Schwein) + MnAMP-PNP + PKI(5-24) wurden überlagert. Der gewählte Ausschnitt zeigt die unmittelbare Umgebung des mutierten Aminosäurerestes als line-Darstellung. Die AMP-PNP-Struktur ist als ball and stick-Modell, das aktivierende Metallion ist in pink dargestellt. *) Erläuterung siehe Text; Abschnitt 3.1.4.2. Referenzen: 1) Knighton *et al.*, 1993; Auflösung 2,0 Å 2) Bossemeyer *et al.*, 1993; Auflösung 2,0 Å

Die Abb. 3.15 zeigt eine Überlagerung unterschiedlicher Strukturen im Bereich des ggf. mutierten Restes 185.

Zunächst ist zu erkennen, daß sich die Struktur von C α (Schwein) im ternären Komplex mit dem Inhibitorpeptid PKI(5-24), Mangan und dem ATP-Analogen Adenylyl Imidodiphosphat (AMP-PNP) im dargestellten Bereich nicht wesentlich von der des rekombinanten Enzyms im binären Komplex mit PKI(5-24) unterscheidet. Die

zusätzliche Bindung des Nukleotides sowie des essentiellen Metallions verursacht hier also lediglich geringfügige Bewegungen z.B. im Bereich von D184.

Darüber hinaus wird deutlich, daß die Struktur von rC α F185W (Rind) sowie auch die Struktur von rC α F185L (Rind) im Vergleich zur Struktur von rC α (Maus) im binären Komplex mit PKI(5-24) sowie zur Struktur von C α (Schwein) im ternären Komplex mit MnAMP-PNP und PKI(5-24) - abgesehen von den unterschiedlich mutierten Resten - keine prägnanten Abweichungen bestimmter Aminosäurereste aufweist. Statt dessen zeigt sich eine Vielzahl von geringfügigen Bewegungen an je nach Mutante unterschiedlichen Aminosäureresten, die dem mutierten Rest 185 benachbart sind. Diese Positionsveränderungen sind in Tab. 3.11 näher beschrieben.

Tab. 3.11: Übersicht über die Positionsveränderung ausgewählter Aminosäurereste von rC α F185W und rC α F185L im Vergleich zu rC α bzw. C α in verschiedenen Komplexen

Es wurden alle Aminosäurereste einer Struktur ausgewählt, die ganz oder teilweise in einem Bereich liegen, der definiert ist durch einen Radius von 4 Å und durch das C α -Atom des jeweiligen Restes 185 als Mittelpunkt. Anschließend wurden die ausgewählten Aminosäurereste überlagert und deren mittlere Abweichungen in Relation zu den entsprechenden Aminosäureresten der Struktur von rC α (Maus) + PKI(5-24) ermittelt. Die beschriebene Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SwissPdb-Viewer, Version 3.7b2. *) Erläuterung siehe Text; Abschnitt 3.1.4.2. Referenzen: 1) Knighton *et al.*, 1993; Auflösung 2,0 Å 2) Bossemeyer *et al.*, 1993; Auflösung 2,0 Å

Sekundärstruktur/Funktionseinheit	ausgewählte Aminosäurereste der jeweiligen Struktur	mittlere Abweichungen [Å] der Aminosäurereste der jeweiligen Struktur in Relation zu den entsprechenden Aminosäureresten der Struktur von rC α (Maus) + PKI(5-24); Ref. 1)		
		C α (Schwein) + MnAMP-PNP + PKI(5-24); Ref. 2)	rC α F185W (Rind) + PKI(5-24)	rC α F185L (Rind) + PKI(5-24)*
Helix C	E91	0,17	0,16	0,15
	L95	0,22	0,31	0,13
	L103	0,22	0,13	0,22
	V104	0,22	0,21	0,19
katalytischer Loop	L157	0,17	0,31	0,11
	Y164	0,30	0,45	0,30
Metallionen-Bindungsloop	V182	0,09	0,18	0,10
	T183	0,21	0,18	0,21
	D184	0,37	0,27	0,16
	F/W/L185	0,21	0,22	0,27
	G186	0,21	0,26	0,16
	F187	0,18	0,16	0,12
	A188	0,18	0,17	0,14
		Ø 0,22	Ø 0,25	Ø 0,17

Es ist zum einen erkennbar, wie groß die mittlere Abweichung der einzelnen ausgewählten Reste der Struktur des ternären Komplexes von nativem C α (Schwein) mit PKI(5-24) und MnAMP-PNP im Verhältnis zur Struktur des binären Komplexes von rC α (Maus) mit PKI(5-24) ist. Die mittlere Abweichung der meisten der entsprechend

ausgewählten Reste von rC α F185W und rC α F185L liegt ebenfalls in dieser Größenordnung. Lediglich die Aminosäurereste L157 und V182 von rC α F185W zeigen gegenüber der Referenz-Struktur (rC α (Maus) + PKI(5-24)) eine Abweichung, die ca. doppelt so groß ist wie die zwischen dem jeweils entsprechenden Aminosäurerest der Struktur des nativen Enzyms im ternären Komplex und der Referenz-Struktur. Die durchschnittliche mittlere Abweichung aller ausgewählten Aminosäurereste der verschiedenen Strukturen in Relation zur Referenz-Struktur unterscheidet sich jedoch nicht wesentlich.

Um evtl. Hinweise hinsichtlich der Konformationsflexibilität der unterschiedlichen Strukturen zu erlangen, wurden zunächst die B-Faktoren der Reste F/W/L185 der Strukturen C α (Schwein) + MnAMP-PNP + PKI(5-24) (Bossemeyer *et al.*, 1993), rC α (Maus) + PKI(5-24) (Knighton *et al.*, 1993), rC α F185W (Rind) + PKI(5-24) und rC α F185L (Rind) + PKI(5-24)* miteinander verglichen. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Strukturen (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus wurden die Aminosäurereste, die in den genannten Strukturen über van der Waals-Wechselwirkungen mit dem jeweiligen Rest 185 interagieren, bezüglich der Anzahl dieser Wechselwirkungen und der B-Faktoren des C α -Atoms untersucht (siehe Tab. 3.12).

Es läßt sich feststellen, daß die Größe des jeweiligen Restes 185 mit der Anzahl der van der Waals-Wechselwirkungen korreliert, d.h. rC α F185W zeigt in der Summe zehn Interaktionen mehr und rC α F185L sechs Interaktionen weniger als die vergleichbaren Wildtyp-Strukturen.

Allerdings läßt sich eine hohe Anzahl an Wechselwirkungen mit einem bestimmten Rest nicht unbedingt mit einer geringen Größe des B-Faktors des C α -Atoms der zugehörigen Aminosäure in Verbindung bringen. So sind z.B. in der Struktur von rC α F185W fünf van der Waals-Wechselwirkungen zwischen W185 und L157 gegeben. Die Strukturen von C α (Schwein) und rC α (Maus) zeigen hier zwischen F185 und L157 nur eine bzw. keine Interaktion. Der B-Faktor des C α -Atoms von L157 in der Struktur von rC α F185W (16,80) ist zwar geringer als der entsprechende B-Faktor für die Struktur von C α (Schwein) (23,93), aber größer als der entsprechende Wert für die Struktur von rC α (Maus) (13,36).

Umgekehrt läßt eine geringe Anzahl von van der Waals-Interaktionen mit einem bestimmten Rest auch nicht unbedingt auf einen hohen Wert für den B-Faktor des C α -Atoms des zugehörigen Aminosäurerestes schließen. So zeigt die Struktur von rC α F185L zwischen L185 und L103 keine van der Waals-Interaktionen, während die Wildtyp-Strukturen in diesem Fall drei bzw. zwei Wechselwirkungen aufweisen. Der B-

Faktor am C α -Atom von L103 in der Struktur von rC α F185L (14,08) ist jedoch geringer als bei den entsprechenden Resten der Wildtyp-Strukturen (19,75 bzw. 19,06).

Tab. 3.12: Übersicht über die van der Waals-Interaktionspartner der Aminosäurereste 185 von rC α F185W und rC α F185L im Vergleich zu rC α bzw. C α in verschiedenen Komplexen

Die Auswertung erfolgte mit der Software Insight II, Version 2000, Accelrys. Die zu Grunde gelegten maximalen Abstände für die van der Waals-Interaktionen sind im Anhang aufgeführt. *) Erläuterung siehe Text; Abschnitt 3.1.4.2. Referenzen: 1) Bossemeyer *et al.*, 1993; Auflösung 2,0 Å 2) Knighton *et al.*, 1993; Auflösung 2,0 Å

Sekundärstruktur/ Funktions- einheit	Interaktionspartner des Aminosäurerestes 185 der jeweiligen Struktur	Anzahl der van der Waals-Wechselwirkungen des jeweiligen Interaktionspartners mit dem Aminosäurerest 185 der jeweiligen Struktur und B-Faktor des jeweiligen Interaktionspartners am C α - Atom (kursiv)			
		C α (Schwein) + MnAMP-PNP + PKI(5-24); Ref. 1)	rC α (Maus) + PKI(5-24); Ref. 2)	rC α F185W (Rind) + PKI(5-24)	rC α F185L (Rind) + PKI(5-24)*
Helix C	E91	- 15,71	1 10,87	- 15,42	- 15,72
	I94	1 18,74	- 12,67	- 16,56	- 16,47
	L95	2 20,64	- 10,00	4 24,50	2 20,35
	L103	3 19,75	2 19,06	5 12,48	- 14,08
katalytischer Loop	L157	1 23,93	- 13,36	5 16,80	- 18,74
	Y164	1 15,75	2 11,84	1 14,54	1 17,15
Metallionen- Bindungsloop	V182	- 19,30	1 9,91	2 17,95	- 16,56
	T183	- 15,92	1 20,65	1 24,34	- 19,51
	D184	2 16,15	3 10,56	3 30,66	2 19,39
	G186	1 12,53	1 11,96	1 16,10	1 16,56
	A188	2 19,69	2 9,99	1 12,50	1 11,58
		Σ 13	Σ 13	Σ 23	Σ 7

Um zu hinterfragen, ob und in welchem Maße die Kavitäten des Enzyms, die sich im hydrophoben lose gepackten Bereich in der Umgebung des Restes 185 befinden (Definition dieser Kavitäten: siehe Anhang), durch den Austausch von F185 zu dem größeren Tryptophanrest und zu dem kleineren Lysinrest beeinflusst werden, wurden Oberflächen und Volumina dieser Kavitäten bei den verschiedenen Strukturen verglichen.

Tab. 3.13: Übersicht über Oberfläche und Volumen von Kavitäten von rC α F185W und rC α F185L im Vergleich zu rC α bzw. C α in verschiedenen Komplexen

Es wurden die Kavitäten ausgewählt, die im hydrophoben, lose gepackten Bereich des jeweiligen Aminosäurerestes 185 liegen. Die Auswertung erfolgte mit der Software SwissPdb-Viewer, Version 3.7b2. *) Erläuterung siehe Text; Abschnitt 3.1.4.2. Referenzen: 1) Bossemeyer *et al.*, 1993; Auflösung 2,0 Å 2) Knighton *et al.*, 1993; Auflösung 2,0 Å

Nr.	C α (Schwein) + MnAMP-PNP + PKI(5-24); Ref. 1)		rC α (Maus) + PKI(5-24); Ref. 2)		rC α F185W (Rind) + PKI(5-24)		rC α F185L (Rind) + PKI(5-24)*	
	Fläche [Å ²]	Volumen [Å ³]	Fläche [Å ²]	Volumen [Å ³]	Fläche [Å ²]	Volumen [Å ³]	Fläche [Å ²]	Volumen [Å ³]
1	124	73	99	72	93	65	85	55
2	64	41	66	43	51	28	74	50
3	33	16	38	19	33	16	33	16
	Σ 221	Σ 130	Σ 203	Σ 134	Σ 177	Σ 109	Σ 192	Σ 121

In Anbetracht der Unterschiede, die sich z.T. bereits zwischen der Struktur des Wildtyps im ternären Komplex und der Struktur des Wildtyps im binären Komplex zeigen, wird deutlich, daß sich die Summe der Oberflächen und der Volumina der Strukturen von rC α F185W und rC α F185L insgesamt geringfügig von den entsprechenden Werten der Wildtyp-Strukturen unterscheiden (siehe Tab. 3.13). Die stärksten Effekte zeigen sich bei rC α F185W mit einer leicht verringerten Oberfläche und einem verringertem Volumen. Bei rC α F185L zeigt die Oberfläche praktisch keine Veränderung und das Volumen eine Tendenz zur Verringerung.

Es bleibt festzuhalten, daß die strukturelle Analyse von rC α F185W und rC α F185L keine wesentlichen Positionsveränderungen spezifischer Aminosäurereste in Relation zu vergleichbaren Wildtyp-Strukturen erkennen läßt. Stattdessen zeigt sich eine Vielzahl von geringfügigen Bewegungen an je nach Mutante unterschiedlichen Aminosäuren, die dem mutierten Rest 185 benachbart sind. Die B-Faktoren sowohl der mutierten Reste als auch ihrer benachbarten Interaktionspartner sind im Vergleich zu Wildtyp-Strukturen nicht auffällig verändert. Darüber hinaus ist erkennbar, daß die den mutierten Resten benachbarten Kavitäten geringfügig abweichende Charakteristika gegenüber den Wildtyp-Strukturen zeigen.

3.2 Charakterisierung von rC α E91-Mutanten

Der invariante Rest Glutamat 91 ist in der Mitte der Helix C (I85 - A97) lokalisiert und interagiert mit dem ebenfalls invarianten Rest Lysin 72, welches wiederum bei der Nukleotidbindung eine essentielle Rolle übernimmt (siehe 1.1.2). Inaktive Strukturen von Proteinkinasen zeigen oft eine Störung der Interaktion zwischen E91 und K72 einhergehend mit einer Positions- und Konformationsänderung der Helix C, während diese Salzbrücke bei Strukturen aktiver Proteinkinasen meist intakt ist (Engh and Bossemeyer, 2001). Vor diesem Hintergrund wurde der Einfluß der genannten Wechselwirkung auf die Aktivität von rC α untersucht. Dazu wurden Mutanten der katalytischen Untereinheit C α von PKA hergestellt, bei denen Glutamat 91 durch Alanin und Glutamin ersetzt wurde. Anschließend folgte eine kinetische und für rC α E91A-His auch eine strukturelle Analyse.

3.2.1 Mutagenese der C α -DNA-Sequenz, Expression und Präparation von rC α E91-Mutanten

Die Mutagenese des C α -DNA-Fragmentes (aus Rind; Wiemann *et al.*, 1992) zur Herstellung von rekombinanten C α -Proteinen mit den Aminosäureaustauschen E91Q bzw. E91A wurde nach der unter 2.3.4 beschriebenen Methode durchgeführt, die Klone anschließend einer Restriktionsanalyse unterzogen und schließlich sequenziert. Die Überprüfung der Proteinidentität erfolgte mit immunologischen und massenspektrometrischen Methoden (Daten nicht gezeigt).

Alle Expressionen wurden im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) durchgeführt. Dabei waren die zu exprimierenden DNA-Fragmente in allen Fällen über NdeI (5') und BamHI (3') in die Plasmide pT7-7 und/oder pET-28b(+) kloniert (Vektorkarten siehe Anhang).

Erste Experimente zur alleinigen Expression von rC α E91Q mit Hilfe des pT7-7-Vektors zeigten, daß das gewünschte Protein mittels der PKI(5-24)-Affinitätschromatographie nicht isoliert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Als möglicher Grund hierfür kam in Betracht, daß die rC α E91-Mutanten - wie auch schon die rC α -Mutanten mit den Aminosäureaustauschen F185W und F185A - nicht oder nur noch eingeschränkt zur essentiellen Autophosphorylierung an T197 fähig sind, welche für die Aktivität der Proteins und die Bindung an das PKI(5-24)-Affinitätschromatographiematerial nötig ist. Daher wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit zur Gewinnung der rC α E91-Mutanten das bereits beschriebene Coexpressions-System eingesetzt (siehe 3.1.1). Die DNA-Sequenz von C α lag hierbei im pT7-7-Vektor vor, während die rC α E91-Mutanten

jeweils mit Hilfe des pET-28b(+)-Vektors exprimiert wurden und somit als His-tag-Fusionsproteine vorlagen. Diese wurden nach der bereits unter 3.1.1 beschriebenen Reinigungsprozedur, bestehend aus einer PKI(5-24)-Affinitätschromatographie und einer sich anschließenden Ni^{2+} -Affinitätschromatographie, von coexprimiertem rC α getrennt und nachfolgend als His-tag-Fusionsproteine charakterisiert. Eine hiervon abweichende Reinigungsstrategie wurde für die Kristallisation von rC α E91A-His entwickelt (siehe 3.2.4.1). Das für die vergleichenden Charakterisierungen der rC α E91-Mutanten benötigte Protein rC α -His wurde wie unter 3.1.1 angegeben exprimiert und präpariert.

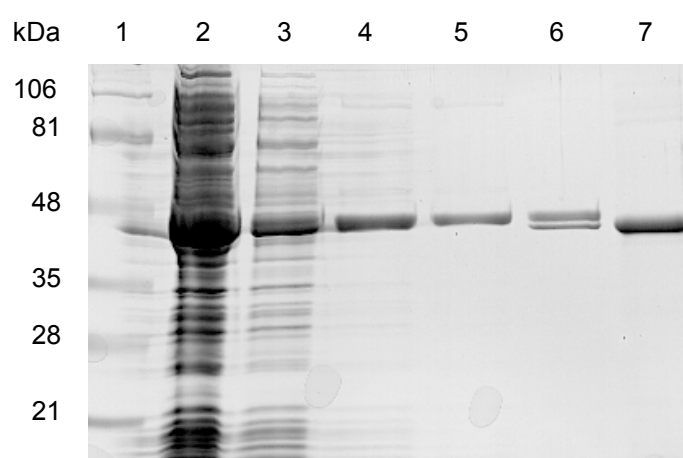


Abb. 3.16: Anreicherung von rC α E91A-His mittels PKI(5-24)-Affinitätschromatographie

Die Proteine rC α E91A-His und rC α wurden in *E. coli* coexprimiert (2.4.1). Der Überstand des Zell-Lysates nach Zentrifugation wurde für eine PKI(5-24)-Affinitätschromatographie verwendet (2.4.2.2). Anschließend wurden verschiedene Proben dieses Reinigungsschrittes in einem 12 %igen SDS-Gel elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie angefärbt. Für die einzelnen Spuren sind jeweils angegeben: Art der Probe; aufgetragenes Volumen bzw. aufgetragene Proteinmenge

- 1: Molekulargewichtsstandard; 6,3 μg
- 2: Durchlauf der PKI(5-24)-Affinitätssäule; 2,5 μl
- 3: TMN 50-Waschschritt, Fraktionen 1 - 5; 20 μl
- 4: TMN 250-Waschschritt, Fraktionen 1 - 3; 20 μl
- 5: TMN 250-Waschschritt, Fraktionen 4 - 6; 20 μl
- 6: Eluat; 10 μl
- 7: rC α -Standard; 1,0 μg

Bei der SDS PAGE-Analyse der PKI(5-24)-Affinitätschromatographien zeigte sich, daß sowohl rC α E91Q-His als auch rC α E91A-His jeweils im Säulendurchlauf, in allen Fraktionen der folgenden Waschschriffe und nur in geringem Maße im Eluat vorlag (Abb. 3.16 und Abb. 3.17). Jeweils coexprimiertes rC α ließ sich dagegen wie üblich nur durch eine im Elutionspuffer vorliegende hohe Argininkonzentration eluieren (2.4.2.2)

und ist aufgrund des fehlenden His-tags als untere Bande der im jeweiligen Eluat auftretenden Doppelbande zu erkennen (Abb. 3.16 und Abb. 3.17, jeweils Spur 6). Die Mutanten rC α E91Q-His und rC α E91A-His zeigen also im Vergleich zu rC α nur noch eine wenig stabile Bindung an das PKI(5-24)-Affinitätschromatographiematerial. Dieser Effekt ist bei rC α E91Q-His stärker ausgeprägt als bei rC α E91A-His, so daß rC α E91Q-His im Vergleich zu rC α E91A-His eher vom Säulenmaterial heruntergewaschen wird. Dementsprechend ist rC α E91Q-His im Eluat als obere Bande der Doppelbande mit nur geringer Intensität zu erkennen, während rC α E91A-His im Eluat deutlich oberhalb des nicht His-tag-tragenden rC α sichtbar ist (Abb. 3.16 und Abb. 3.17, jeweils Spur 6).

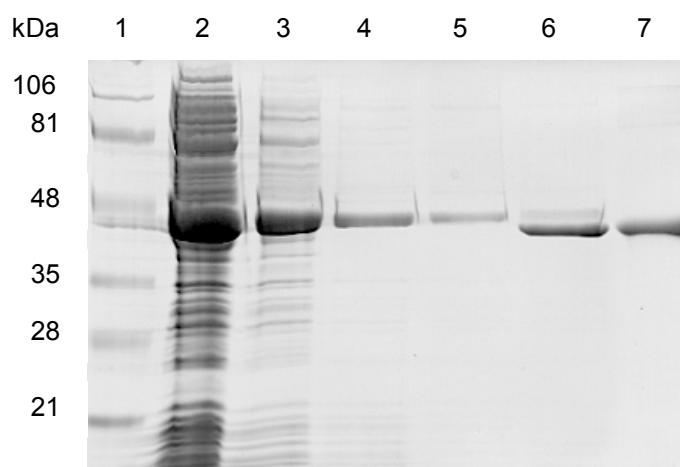


Abb. 3.17: Anreicherung von rC α E91Q-His mittels PKI(5-24)-Affinitätschromatographie

Die Proteine rC α E91Q-His und rC α wurden in *E. coli* coexprimiert (2.4.1). Der Überstand des Zell-Lysates nach Zentrifugation wurde für eine PKI(5-24)-Affinitätschromatographie verwendet (2.4.2.2). Anschließend wurden verschiedene Proben dieses Reinigungsschrittes in einem 12 %igen SDS-Gel elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie angefärbt. Für die einzelnen Spuren sind jeweils angegeben: Art der Probe; aufgetragenes Volumen bzw. aufgetragene Proteinmenge

- 1: Molekulargewichtsstandard; 6,3 μ g
- 2: Durchlauf der PKI(5-24)-Affinitätssäule; 2,5 μ l
- 3: TMN 50-Waschschrift, Fraktionen 1 - 5; 20 μ l
- 4: TMN 250-Waschschrift, Fraktionen 1 - 3; 30 μ l
- 5: TMN 250-Waschschrift, Fraktionen 4 - 6; 30 μ l
- 6: Eluat; 30 μ l
- 7: rC α -Standard; 1,0 μ g

Eine Verbesserung des Bindungs- bzw. Elutionsverhaltens der hier beschriebenen rC α -Mutanten war auch durch das Waschen der Säule mit einem Salzgradienten anstatt des unter 2.4.2.2 beschriebenen Zusatzes von 50 mM bzw. 250 mM NaCl nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Da im Falle von rC α E91Q-His das Eluat der wie oben beschriebenen Affinitätschromatographie jedoch eine nicht ausreichende Proteinmenge der Mutante enthielt, um eine weitere Reinigung mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie

durchzuführen und damit eine Trennung von rC α und rC α E91Q-His zu erreichen, wurden hier als Ausgangsmaterial für die zweite Säulenchromatographie die Fraktionen des TMN 250-Waschschrilles verwendet. Diese enthielten einerseits eine ausreichende Menge von rC α E91Q-His für eine anschließende kinetische Charakterisierung und wiesen andererseits keine Kontaminationen mit Fremdproteinen in nennenswerten Mengen auf. Die SDS PAGE-Analyse von Proben dieser Ni²⁺-Affinitätschromatographie ist in Abb. 3.18 gezeigt.

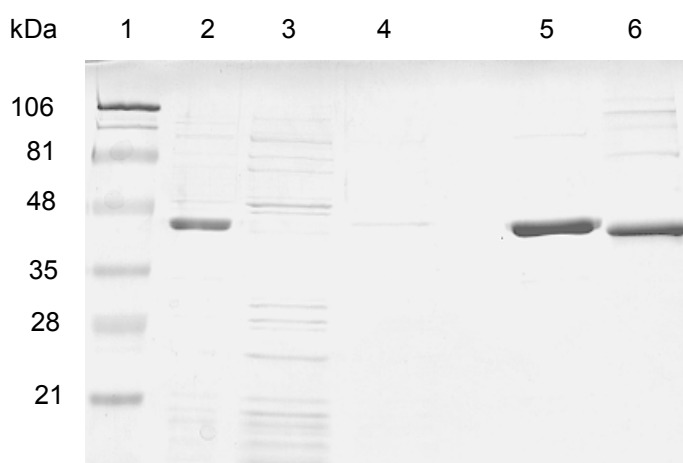


Abb. 3.18: Isolierung von rC α E91Q-His mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie

Die Proteine rC α E91Q-His und rC α wurden in *E. coli* coexprimiert (2.4.1). Der Überstand des Zell-Lysates nach Zentrifugation wurde einer PKI(5-24)-Affinitätschromatographie unterzogen (2.4.2.2). Die Fraktionen des TMN 250-Waschschrilles dieser Reinigung wurden für eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie verwendet (2.4.2.3). Anschließend wurden verschiedene Proben dieser Chromatographie in einem 12 %igen SDS-Gel elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie angefärbt. Für die einzelnen Spuren sind jeweils angegeben: Art der Probe; aufgetragenes Volumen bzw. aufgetragene Proteinmenge

- 1: Molekulargewichtsstandard; 6,3 μ g
- 2: TMN 250-Waschschritt der PKI(5-24)-Affinitätschromatographie, Fraktionen 1 - 6; 1 μ l
- 3: Durchlauf der Ni²⁺-Affinitätschromatographie; 10 μ l
- 4: Waschschritt der Ni²⁺-Affinitätschromatographie, Fraktionen 1 - 10; 10 μ l
- 5: Eluat der Ni²⁺-Affinitätschromatographie; 7 μ l
- 6: rC α -Standard; 1,0 μ g

Im Falle von rC α E91A-His wies das Eluat der PKI(5-24)-Affinitätschromatographie - trotz offensichtlicher Verluste durch die Waschprozedur - eine ausreichende Menge der rC α -Mutante auf, um eine weitere Reinigung und Charakterisierung zu ermöglichen. Daher konnte bei der Ni²⁺-Affinitätschromatographie dieser rC α -Mutante wie schon für rC α F185W-His und rC α F185A-His beschrieben und illustriert verfahren werden (siehe 3.1.1). Die Qualität der Ni²⁺-Affinitätschromatographie-Eluate von rC α E91Q-His und rC α E91A-His bezüglich des Reinheitsgrades war vergleichbar.

Insgesamt zeigen die Präparationen von rC α E91Q-His und rC α E91A-His, daß beide rC α -Mutanten trotz jeweiliger Coexpression mit rC α viel weniger stabil an PKI(5-24) binden als der Wildtyp. Dieser Befund ist bei rC α E91Q-His stärker ausgeprägt als bei rC α E91A-His.

3.2.2 Spezifische Reaktionsgeschwindigkeiten

Mit den gereinigten rC α E91-Mutanten wurden vergleichende zeitabhängige Kemptidphosphorylierungsexperimente durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen dieser Aktivitätstests orientierten sich an den für die Referenz, d.h. für rC α -His optimalen Reaktionsbedingungen. Sowohl ATP als auch Kemptid wurden daher in für rC α -His sättigenden Konzentrationen (siehe 3.1.2) eingesetzt (200 μ M ATP, 200 μ M Kemptid). Details zur Durchführung sind unter 3.1.2 bzw. 2.4.9 aufgeführt.

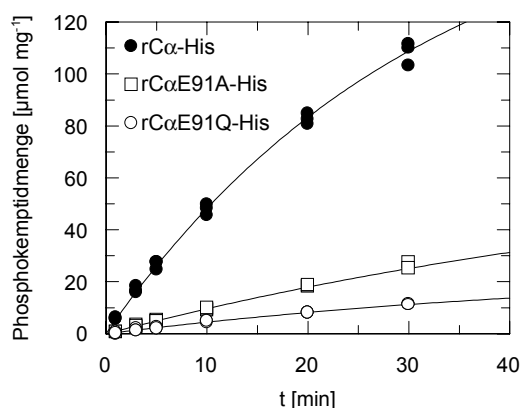


Abb. 3.19: Vergleichende zeitabhängige Kemptidphosphorylierung von rC α -His, rC α E91A-His und rC α E91Q-His

Gezeigt ist die Menge des Produktes (Phosphokemptid) in Abhängigkeit von der Zeit. Die Aktivitätsassays wurden mit für rC α -His sättigenden Substratkonzentrationen (200 μ M ATP, 200 μ M Kemptid) wie unter 2.4.9 angegeben durchgeführt.

	v [μ mol min $^{-1}$ mg $^{-1}$]	relative Geschwindigkeit
rC α -His	5,5 ± 0,7	1,00 ± 0,13
rC α E91A-His	1,0 ± 0,2	0,18 ± 0,04
rC α E91Q-His	0,5 ± 0,1	0,09 ± 0,02

Tab. 3.14: Vergleich der spezifischen Reaktionsgeschwindigkeiten (v) von rC α -His, rC α E91A-His und rC α E91Q-His

Die absoluten Werte wurden anhand der in Abb. 3.19 gezeigten Experimente wie unter 2.4.9 angegeben ermittelt. Diese Werte wurden zur Ermittlung der relativen Geschwindigkeiten in Relation zu dem entsprechenden Wert von rC α -His gesetzt.

Die Mutanten rC α E91Q-His und rC α E91A-His zeigen unter den gewählten Reaktionsbedingungen starke Einschränkungen bezüglich ihrer spezifischen Reaktionsgeschwindigkeiten (siehe Abb. 3.19). Die Mutante rC α E91A-His weist nur noch ca. 20 % und die Mutante rC α E91Q-His nur noch ca. 10 % der Aktivität von rC α -

His auf (siehe Tab. 3.14). Damit korreliert die Stärke dieser Befunde mit den bereits bei der Präparation beobachteten Intensitäten der Effekte bezüglich des veränderten Bindungsverhaltens an PKI(5-24).

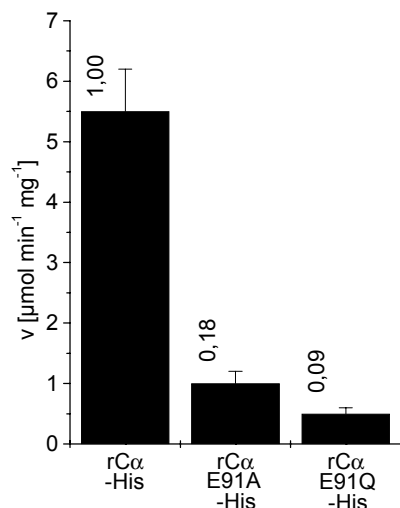


Abb. 3.20: Vergleich der spezifischen Reaktionsgeschwindigkeiten von rCα-His, rCαE91A-His und rCαE91Q-His

Die absoluten Werte wurden anhand der in Abb. 3.19 gezeigten Experimente wie unter 2.4.9 angegeben ermittelt und sind in Tab. 3.14 aufgeführt. Über den Säulen sind die den absoluten Werten entsprechenden relativen Werte aus Tab. 3.14 angegeben

3.2.3 Dissoziationsgleichgewichtskonstanten für ATP und PKI(5-24)

Die rCαE91-Mutanten wurden hinsichtlich der Interaktion mit PKI(5-24) und ATP mittels Resonance Mirror Affinography (RMA) charakterisiert (siehe 2.4.11 bzw. 3.1.3).

Dabei zeigte sich bei Kontrollmessungen ein bemerkenswerter Befund. Diese Kontrollmessungen wurden im Rahmen von Meßreihen zur Bestimmung von K_D ATP in Gegenwart von PKI(5-24) durchgeführt, bei denen die ATP-Konzentration variiert wurde, während das jeweilige verwendete rCα-Protein und Mg^{2+} im Überschuß angeboten wurden (siehe 2.4.11 bzw. 3.1.3). Als Kontrolle wurde hierbei jeweils überprüft, ob das entsprechende rCα-Protein in Gegenwart von Mg^{2+} , aber ohne ATP-Zusatz ebenfalls an auf der Sensoroberfläche immobilisiertes PKI(5-24)-Peptid binden kann. Die bei diesen Kontrollen bei rCα, rCα-His und den rCαF185-Mutanten ermittelten Signalstärken waren im Vergleich zu den Signalintensitäten, die in Gegenwart von ATP gemessen wurden, zu vernachlässigen (Daten nicht gezeigt) und konnten daher bei der Auswertung dieser Messungen unberücksichtigt bleiben. Dieser Sachverhalt steht im Gegensatz zur entsprechenden Situation bei rCαE91A-His. Hier konnte unter den beschriebenen Bedingungen, d.h. ohne ATP-Zusatz, ein Signal von nicht zu vernachlässigender Intensität detektiert werden (siehe Abb. 3.21). Auf mögliche Gründe für diese Beobachtung wird weiter unten eingegangen. Der Befund mußte bei der Auswertung der Daten zur Bestimmung der

Dissoziationsgleichgewichtskonstante für ATP in Gegenwart von PKI(5-24) berücksichtigt werden.

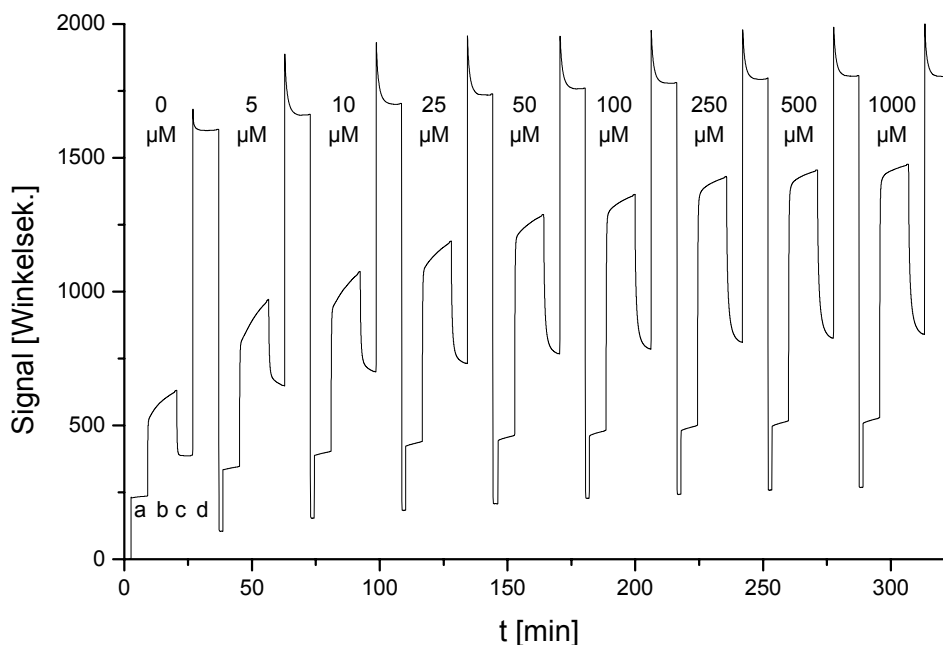


Abb. 3.21: RMA-Meßdaten zur Charakterisierung der Interaktion zwischen rCαE91A-His und ATP in Gegenwart von PKI(5-24)

Die Messung wurde mit der unter 2.4.11 beschriebenen Methode durchgeführt. Die Abbildung zeigt neun vom Script durchgeführte Meß-Zyklen. Diese bestehen jeweils aus vier Phasen: a) Umpuffern zum jeweiligen Assoziations-/Dissoziationspuffer, b) Assoziation des Proteins, c) Dissoziation des Proteins, d) Regeneration der Sensoroberfläche. Die jeweils verwendete ATP-Konzentration ist über den Zyklen angegeben. Es ist ein deutliches Signal in Abwesenheit von ATP erkennbar.

Da die für die RMA-basierte Charakterisierung der rCαF185-Mutanten verwendete gerätezugehörige FASTfit-Software eine sinnvolle Auswertung dieser Daten nicht ermöglichte, wurde ein "manuelles" Auswertungsverfahren mit Hilfe der Grafit 3.03-Software entwickelt. Dieses Verfahren ist unter 2.4.11 näher beschrieben und in Abb. 3.22 illustriert. Es ermöglicht - anders als bei der Auswertungsmethode, die bei den rCαF185-Mutanten verwendet wurde - zwar eine Bestimmung von Dissoziationsgleichgewichtskonstanten nicht aber der zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten. Die mit diesem Verfahren ermittelten Dissoziationsgleichgewichtskonstanten werden mit $*K_D^{\text{therm}}$ bezeichnet. Ein Vergleich der thermodynamischen Auswertung mit Hilfe der FASTfit-Software und der hier zum Einsatz kommenden Methode mit Hilfe der Grafit-Software an Datensätzen, die die Anwendung dieser beiden Auswertungsmethoden zulassen, ergibt, daß beide Methoden für die Dissoziationsgleichgewichtskonstante nahezu identische Werte liefern

(z.B. K_D^{therm} ATP für rC α -His: 320 ± 40 nM; $*K_D^{\text{therm}}$ ATP für rC α -His: $0,3 \pm 0,1$ μ M; siehe Tab. 3.7 bzw. Tab. 3.15).

Bei den Messungen zur Bestimmung von K_D PKI(5-24) in Gegenwart von ATP zeigte sich, daß die mit Hilfe der FASTfit-Software erstellten Regressionskurven, die sowohl der kinetischen als auch der thermodynamischen Auswertung zugrunde liegen (siehe Abb. 3.8), oftmals sehr stark von den tatsächlichen RMA-Meßdaten der rC α E91-Mutanten abwichen. Die "manuelle" Grafit-gestützte Auswertung erschien hier im Vergleich zur FASTfit-gestützten als robuster und vertrauenswürdiger. Daher wurde diese Auswertungsmethode nicht nur bei den RMA-Messungen zur Bestimmung von K_D ATP in Gegenwart von PKI(5-24), sondern bei allen hier beschriebenen RMA-Daten der rC α E91-Mutanten bzw. der Referenz rC α -His eingesetzt.

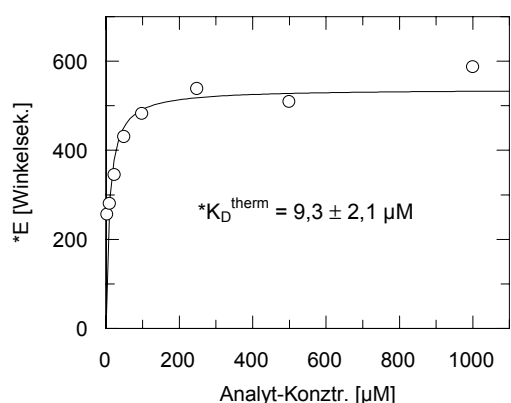


Abb. 3.22: Auswertung von RMA-Meßdaten mittels Grafit 3.03

Die RMA-Meßdaten, die dieser Auswertung zugrunde liegen sind in Abb. 3.21 gezeigt. Die Auswertung wurde wie unter 2.4.11 angegeben durchgeführt. Die Beträge der assoziationsbedingten RMA-Signaländerung nach fünf Minuten (*E) wurden um den entsprechenden Betrag der Kontrolle (0 μ M ATP) korrigiert und gegen die Analyt-, d.h. in diesem Falle gegen die ATP-Konzentration aufgetragen. Die Analytkonzentration bei halbmaximalem Wert für *E entspricht der Dissoziationsgleichgewichtskonstanten $*K_D^{\text{therm}}$.

Da die oben beschriebenen Kontrollmessungen bei der Bestimmung von K_D ATP in Gegenwart von PKI(5-24) auch Signale in Abwesenheit von ATP lieferten, wurden im Folgenden neben den Affinitäten des jeweiligen rC α -Proteins zu PKI(5-24) in Gegenwart von ATP, d.h. im ternären Komplex, auch die Affinitäten des jeweiligen rC α -Proteins zu PKI(5-24) in Abwesenheit von ATP, d.h. im binären Komplex ermittelt.

	$*K_D^{\text{therm}}$ PKI(5-24) [nM] in Gegenwart von ATP (ternärer Komplex)	$*K_D^{\text{therm}}$ ATP [μ M] in Gegenwart von PKI(5-24) (ternärer Komplex)	$*K_D^{\text{therm}}$ PKI(5-24) [μ M] ohne ATP-Zusatz (binärer Komplex)
rC α -His	13 \pm 5	0,3 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1
rC α E91A-His	420 \pm 20	10 \pm 4	1,6 \pm 0,4
rC α E91Q-His	1300 \pm 200	nicht ermittelt	2,2 \pm 0,3

Tab. 3.15: Übersicht über Dissoziationsgleichgewichtskonstanten ($*K_D^{\text{therm}}$) von rC α -His, rC α E91A-His und rC α E91Q-His

Die Werte wurden mit den unter 2.4.11 beschriebenen Methoden und Gleichungen ermittelt.

	*K _D ^{therm} PKI(5-24) in Gegenwart von ATP (ternärer Komplex)	*K _D ^{therm} ATP in Gegenwart von PKI(5-24) (ternärer Komplex)	*K _D ^{therm} PKI(5-24) ohne ATP-Zusatz (binärer Komplex)
rCα-His	1,00 ± 0,38	1,00 ± 0,33	1,00 ± 0,07
rCαE91A-His	32,31 ± 1,54	33,33 ± 13,33	1,14 ± 0,29
rCαE91Q-His	100,00 ± 15,38	nicht ermittelt	1,57 ± 0,21

Tab. 3.16: Vergleich der Dissoziationsgleichgewichtskonstanten (*K_D^{therm}) von rCα-His, rCαE91A-His und rCαE91Q-His

Die Werte sind in Relation zu den entsprechenden Werten von rCα-His angegeben. Die absoluten Werte sind in Tab. 3.15 aufgeführt.

Wie die in Tab. 3.15 bzw. Tab. 3.16 aufgeführten und in Abb. 3.23 grafisch dargestellten Werte zeigen, weisen beide rCαE91-Mutanten erhebliche verringerte Affinitäten in bezug auf die Bindung an PKI(5-24) in Gegenwart von ATP auf. So zeigt sich die Dissoziationsgleichgewichtskonstante für PKI(5-24) in Gegenwart von ATP bei rCαE91A-His im Vergleich zu rCα-His ca. um den Faktor 30 und bei rCαE91Q-His um den Faktor 100 erhöht. In Gegenwart von ATP weist rCα-His im Vergleich zu den Messungen mit dem gleichen Protein in Abwesenheit von ATP eine ca. hundertmal höhere Affinität zu PKI(5-24) auf. Dieser Effekt erklärt sich durch den Synergismus, der bei der gleichzeitigen Bindung von ATP und PKI(5-24) vorliegt (siehe 1.1.2 bzw. Lew *et al.*, 1996). Der Vergleich zwischen rCα-His und den rCαE91-Mutanten bezüglich der Bindung an PKI(5-24) in Abwesenheit von ATP zeigt keine bzw. nur sehr geringe Effekte. Die entsprechende Affinität von rCαE91A-His ist im Vergleich zu rCα-His unter Berücksichtigung der entsprechenden Fehler unverändert. Für rCαE91Q-His zeigt K_DPKI(5-24) in Abwesenheit von ATP im Vergleich zu rCα-His nur einen geringfügigen Anstieg um den Faktor 1,6. Unter Berücksichtigung der ermittelten Affinitäten von rCα-His und den rCαE91-Mutanten bezüglich PKI(5-24) sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von ATP ist zu erkennen, daß sich der Faktor 100, der bei rCα-His den oben genannten Synergieeffekt beschreibt, bei rCαE91A-His auf ca. Faktor 4 und bei rCαE91Q-His auf ca. Faktor 1,7 reduziert.

Die Bestimmung der Dissoziationsgleichgewichtskonstante für die Affinität zu ATP in Gegenwart von PKI(5-24) (*K_D^{therm}ATP) war nur bei rCαE91A-His möglich. Bei den entsprechenden Messungen für rCαE91Q-His hätte die hierfür notwendige sättigenden Konzentration dieses Proteins bezüglich der Affinität zu PKI(5-24) in Gegenwart von ATP ca. 13 µM betragen. Diese Konzentration hätte ungefähr dem zehnfachen von K_DPKI(5-24) in Gegenwart von ATP entsprochen (siehe 3.1.3.2). Eine solche Menge bzw. eine solche Konzentration stand jedoch aufgrund geringer Ausbeuten bei der Reinigung dieser Mutante (siehe 3.2.1) nicht zur Verfügung. Der Vergleich von K_DATP für rCα-His und rCαE91A-His zeigt für die Mutante eine ca. um den Faktor 30 verringerte Affinität für das Nukleotid in Gegenwart des Inhibitorpeptides. Diese Affinität

ist also um denselben Faktor verringert wie die Affinität dieser rC α -Mutante zu PKI(5-24) in Gegenwart von ATP.

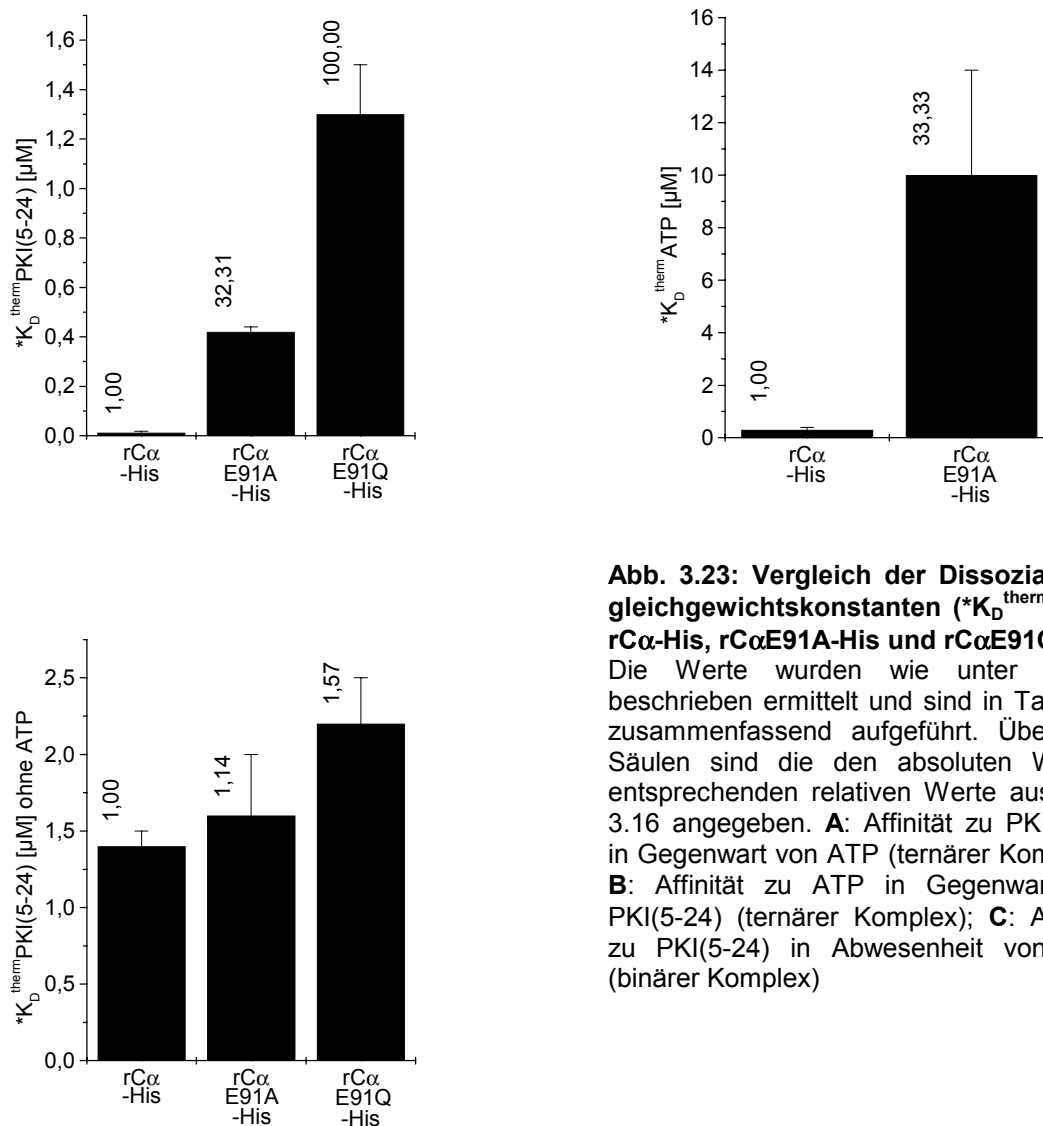


Abb. 3.23: Vergleich der Dissoziationsgleichgewichtskonstanten (*K_D^{therm}) von rC α -His, rC α E91A-His und rC α E91Q-His

Die Werte wurden wie unter 2.4.11 beschrieben ermittelt und sind in Tab.3.15 zusammenfassend aufgeführt. Über den Säulen sind die den absoluten Werten entsprechenden relativen Werte aus Tab. 3.16 angegeben. **A:** Affinität zu PKI(5-24) in Gegenwart von ATP (ternärer Komplex); **B:** Affinität zu ATP in Gegenwart von PKI(5-24) (ternärer Komplex); **C:** Affinität zu PKI(5-24) in Abwesenheit von ATP (binärer Komplex)

Die ermittelten Daten bieten einen Ansatz zur Erklärung des Befundes, welcher sich bei den Kontrollmessungen im Rahmen der Bestimmung von K_DATP in Gegenwart von PKI(5-24) für rC α E91A-His ergab. Wie bereits oben erwähnt zeigte sich bei diesen Messungen ein deutliches RMA-Signal in Abwesenheit von ATP, während die entsprechenden Messungen mit rC α , rC α -His und den rC α F185-Mutanten diesen Befund nicht zeigten. Möglicherweise liegt die Erklärung für diesen Sachverhalt darin, daß bei rC α E91A-His die Affinitäten für PKI(5-24) in Gegenwart und in Abwesenheit von ATP nicht so stark differieren (ca. Faktor 4) wie bei rC α -His (ca. Faktor 100), rC α

und den rC α F185-Mutanten (möglicherweise auch ca. Faktor 100). Dieser Erklärungsansatz wird im Folgenden weiter ausgeführt.

Bei den Messungen zur Bestimmung von K_D ATP für rC α E91A-His war es erforderlich, die Mutante in sättigender Konzentration einzusetzen (siehe 2.4.1.1. bzw 3.1.3). Das bedeutet, dieses Protein wurde in einer Konzentration von ca. 4 μ M angeboten, was ungefähr dem Zehnfachen von K_D PKI(5-24) in Gegenwart von ATP für rC α E91A-His entspricht (420 nM). Damit lag die Proteinkonzentration aber bereits um den Faktor 2,5 über K_D PKI(5-24) in Abwesenheit von ATP für dieses Protein (1,6 μ M). Somit ist bei dieser hohen Konzentration von rC α E91A-His die Bindung einer nicht unwesentlichen Menge des Proteins ohne ATP an PKI(5-24) der Matrix zu erwarten. Bei rC α -His sowie auch bei rC α und den rC α F185-Mutanten war die Situation eine andere. Hier betrug die sättigenden Proteinkonzentrationen bei den Messungen zur Bestimmung von K_D ATP im ternären Komplex aus Protein, ATP und PKI(5-24) aufgrund der höheren Affinitäten zu PKI(5-24) in Gegenwart von ATP lediglich 100 bis 200 nM. Unter der Annahme, daß rC α und die rC α F185-Mutanten eine ähnliche Affinität zu PKI(5-24) in Abwesenheit von ATP haben wie rC α -His, lagen damit die Proteinkonzentrationen in den jeweiligen Assays zur Bestimmung von K_D ATP in Gegenwart von PKI(5-24) wesentlich unter K_D PKI(5-24) in Abwesenheit von ATP. Somit ist bei diesen Assays die Bindung einer wesentlichen Proteinmenge an PKI(5-24) in Abwesenheit von ATP nicht zu erwarten.

Es bleibt festzuhalten, daß mittels RMA bei beiden rC α E91-Mutanten eine drastisch verringerte Affinität für PKI(5-24) in Gegenwart von ATP festgestellt werden konnte. Dabei ist dieser Effekt bei rC α E91Q-His stärker ausgeprägt als bei rC α E91A-His. Somit korrelieren die mit RMA ermittelten Befunde mit den Beobachtungen bei der Präparation dieser Proteine (siehe 3.2.1). Die Affinität der rC α E91-Mutanten zu PKI(5-24) in Abwesenheit von ATP zeigt im Vergleich zu rC α -His keine bzw. nur leichte Veränderungen. Der Faktor, der bei rC α -His den Bindungs-Synergismus von ATP und PKI(5-24) beschreibt, ist bei beiden rC α E91-Mutanten stark verringert. Darüber hinaus ist bei der Mutante rC α E91A-His auffällig, daß ihre Affinität zu PKI(5-24) in Gegenwart von ATP um denselben Faktor verringert ist wie ihre Affinität zu ATP in Gegenwart von PKI(5-24).

3.2.4 Kristallisation von rC α E91A-His

3.2.4.1 Präparation von rC α E91A-His

Für eine Präparation des rC α -Proteins mit der Mutation E91A war es nötig, die Mutante zusammen mit dem Wildtypenzym zu coexprimieren (siehe 3.2.1). Diese Coexpression und Präparation nach der Strategie durchzuführen, wie sie bei der Kristallisation von rC α F185W zur Anwendung kam (siehe 3.1.4.1), schien wenig erfolgversprechend. Grund für diese Annahme war, daß bei dieser Strategie das rC α -Protein mit dem Aminosäureaustausch E91A statt mit Hilfe des pET-28b(+)- mit Hilfe des pT7-7-Vektors exprimiert worden wäre. Dieser Vektor weist jedoch im Vergleich zum pET-28b(+)-Vektor ein geringeres Expressionsniveau auf. Dadurch wäre bei der PKI(5-24)-Affinitätschromatographie die Ausbeute der Mutante verringert worden. Diese Ausbeute war aber bereits bei der Expression der Mutante mit Hilfe des pET-28b(+)-Vektors äußerst gering, da rC α E91A-His eine wenig stabile Bindung an das PKI(5-24)-Affinitätsmaterial aufwies (siehe 3.2.1). Aus diesen Gründen wurde bei der Expression der rC α -Mutante mit dem Aminosäureaustausch E91A zum Zwecke der Kristallisation die Kombination von Vektoren und Inserts so gewählt, wie sie auch schon bei vorhergehenden Expressionen dieses Enzyms zum Zweck der kinetischen Charakterisierung verwendet wurde (siehe 3.2.1). Das Protein rC α E91A-His wurde also mit Hilfe des pET-28b(+)-Vektors und rC α mit Hilfe des pT7-7-Vektors exprimiert.

Die Präparation von rC α E91A-His zum Zweck der Kristallisation erfolgte im Vergleich zur Präparation der Mutante zum Zweck der kinetischen Charakterisierung (3.2.1) nach einer veränderten Vorgehensweise. Grund hierfür war, daß für die Kristallisation ein hinsichtlich des Phosphorylierungsgrades möglichst homogenes Präparat angestrebt wurde, während dieser Aspekt für die kinetische Charakterisierung eine untergeordnete Rolle spielte (siehe auch 3.1.4.1). Im Rahmen der veränderten Vorgehensweise wurde das mittels der PKI(5-24)-Affinitätschromatographie (siehe 2.4.2.2) erhaltene Proteingemisch aus rC α und rC α E91A-His nicht mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie getrennt. Statt dessen wurde, wie auch schon bei der Präparation von rC α F185W zum Zweck der Kristallisation (siehe 3.1.4.1), ein ionenaustauscherchromatographischer Reinigungsschritt mittels Mono-S-Säule vorgenommen. Das hierbei angewendete Verfahren II (siehe 2.4.2.4), welches im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde, nutzt den Umstand, daß der His-tag bei einem pH-Wert von 6,2 die positive Nettoladungsdichte des Fusionsproteins im Vergleich zum Protein ohne His-tag vergrößert. Vorexperimente mit diesem Verfahren zeigten, daß rC α E91A-His unter den gewählten Bedingungen beim Anlegen eines Salzgradienten auf der Säulenmatrix präzipitierte. Daher wurde im Weiteren Arginin aufgrund seiner chaotropen

Eigenschaften zur Elution verwendet. Auf diese Weise konnte $rC\alpha$ bei geringeren und $rC\alpha E91A-His$ bei höheren Argininkonzentrationen eluiert und so vom jeweils anderen Protein getrennt werden.

Exemplarisch ist ein Chromatogramm dieses Verfahrens in Abb. 3.24 dargestellt. Unter den gewählten Bedingungen läßt sich eine Fraktion 13 bei ca. 200 bis 250 mM Arginin (ca. 20 bis 25 % Puffer B) und eine Fraktion 21 bei ca. 350 bis 400 mM Arginin (ca. 35 bis 40 % Puffer B) eluieren. Eine massenspektrometrische Untersuchung (siehe 2.4.8) der beiden Fraktionen ergab, daß Fraktion 13 ein Gemisch aus dreifach und vierfach phosphoryliertem $rC\alpha$ -Protein und Fraktion 21 ein Gemisch der vier- und fünffach phosphorylierten Mutante $rC\alpha E91A-His$ enthielt (Daten nicht gezeigt). Für die gezeigte Chromatographie wurde als Ausgangsmaterial ein Aliquot des Eluates der zuvor durchgeführten PKI(5-24)-Affinitätschromatographie eingesetzt (siehe Abb. 3.16; Spur 6). Daher ist die Menge des eluierten $rC\alpha$ -Proteins größer als die der eluierten Mutante $rC\alpha E91A-His$.

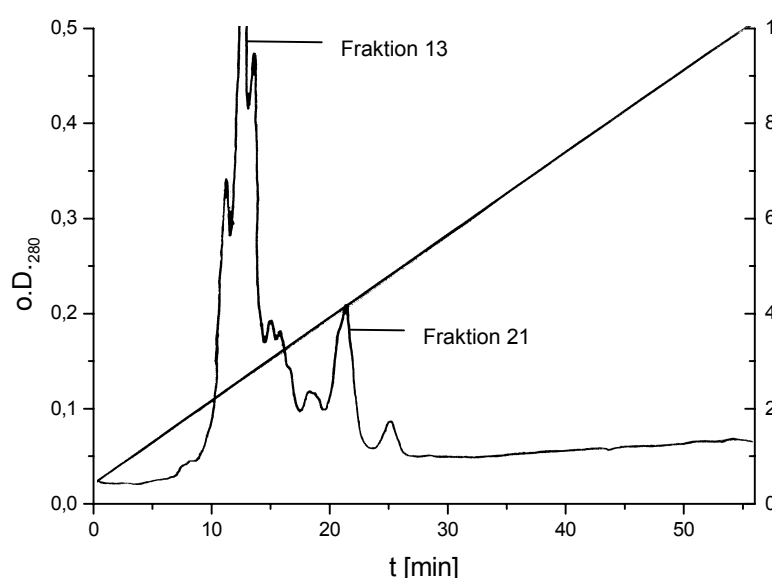


Abb. 3.24: Trennung von $rC\alpha$ und $rC\alpha E91A-His$ mittels Ionenaustauscherchromatographie

Die Proteine $rC\alpha$ und $rC\alpha E91A-His$ wurden in *E. coli* coexprimiert (2.4.1). Das Gemisch dieser Proteine aus dem Eluat der PKI(5-24)-Affinitätschromatographie (2.4.2.2) wurde einer Ionenaustauscherchromatographie (Verfahren II, siehe 2.4.2.4) mittels einer Mono-S-Säule (5/5) unterzogen. Die Elution erfolgte hierbei mit einem Arginin-Gradienten.

Um die Verluste bei der Anreicherung von $rC\alpha E91A-His$ durch die PKI(5-24)-Affinitätschromatographie nicht zu groß werden zu lassen, wurden für die weitere Reinigung des Proteins zur Kristallisation neben dem Eluat auch alle Fraktionen des TMN 250-Waschschrtes und die vierte und fünfte Fraktion des TMN 50-Waschschrtes verwendet (siehe 2.4.2.2 bzw. 2.4.12). Das genannte Proteingemisch wurde wie beschrieben mittels des Verfahrens II chromatographisch auf einer Mono-S-Säule (HR 10/10) getrennt. Bei ca. 350 - 400 mM Arginin (35 - 40 % Puffer B) wurden die Fraktionen 14, 15 und 16 erhalten. Die entsprechenden massenspektrometrischen Analysen (siehe 2.4.8) sind in Abb. 3.25 gezeigt und ergaben, daß die Fraktion 14 sechsfach phosphoryliertes $rC\alpha E91A-His$ -, die Fraktion 15 fünffach phosphoryliertes $rC\alpha E91A-His$ - und die Fraktion 16 vierfach phosphoryliertes $rC\alpha E91A-His$ -Protein

enthielt. Somit war mittels des beschriebenen chromatographischen Verfahrens eine Trennung von rC α und rC α E91A-His sowie eine Isolierung von rC α E91A-His in homogener Phosphorylierungsstufe in einem Schritt möglich.

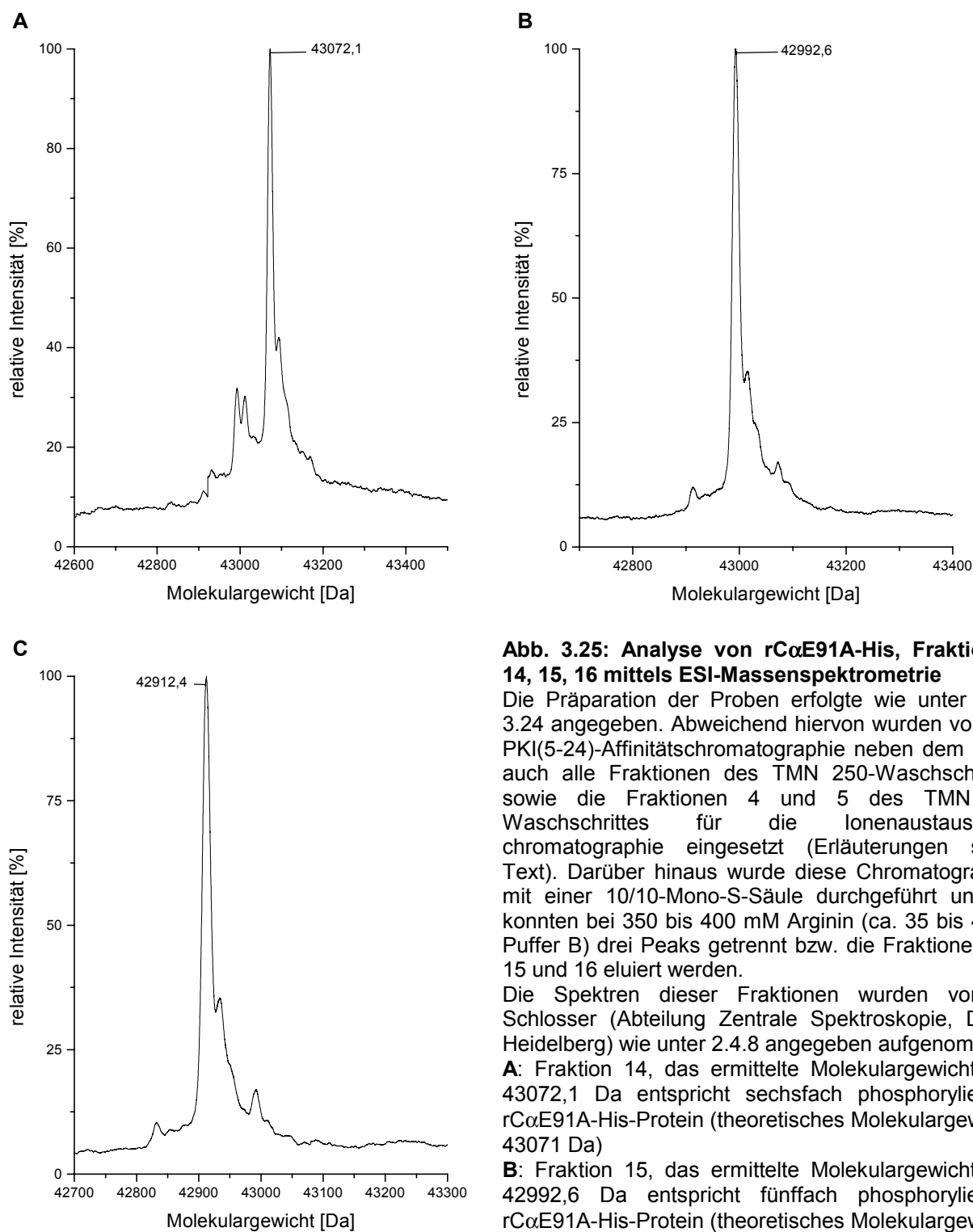


Abb. 3.25: Analyse von rC α E91A-His, Fraktionen 14, 15, 16 mittels ESI-Massenspektrometrie

Die Präparation der Proben erfolgte wie unter Abb. 3.24 angegeben. Abweichend hiervon wurden von der PKI(5-24)-Affinitätschromatographie neben dem Eluat auch alle Fraktionen des TMN 250-Waschschruttes sowie die Fraktionen 4 und 5 des TMN 50-Waschschruttes für die Ionenaustauscherchromatographie eingesetzt (Erläuterungen siehe Text). Darüber hinaus wurde diese Chromatographie mit einer 10/10-Mono-S-Säule durchgeführt und es konnten bei 350 bis 400 mM Arginin (ca. 35 bis 40 % Puffer B) drei Peaks getrennt bzw. die Fraktionen 14, 15 und 16 eluiert werden.

Die Spektren dieser Fraktionen wurden von A. Schlosser (Abteilung Zentrale Spektroskopie, DKFZ Heidelberg) wie unter 2.4.8 angegeben aufgenommen. **A:** Fraktion 14, das ermittelte Molekulargewicht von 43072,1 Da entspricht sechsfach phosphoryliertem rC α E91A-His-Protein (theoretisches Molekulargewicht: 43071 Da)

B: Fraktion 15, das ermittelte Molekulargewicht von 42992,6 Da entspricht fünffach phosphoryliertem rC α E91A-His-Protein (theoretisches Molekulargewicht: 42991 Da)

C: Fraktion 16, das ermittelte Molekulargewicht von 42912,4 Da entspricht vierfach phosphoryliertem rC α E91A-His-Protein (theoretisches Molekulargewicht: 42911 Da)

3.2.4.2 Die Kristallstruktur von rC α E91A-His

Die unter 3.2.4.1 beschriebenen Fraktionen 14, 15 und 16 von rC α E91A-His wurden unter den unter 2.4.12 angegebenen Bedingungen für die Kristallisation im binären Komplex mit PKI(5-24) eingesetzt. Als Fällungsmittel diente hierbei Polyethylenglycol 3350. Die röntgenkristallographische Untersuchung und die Strukturanalyse der monoklinen Kristalle wurde wiederum im Rahmen einer Kooperation von Dr. R. A. Engh (Roche) am MPI für Biochemie in Martinsried, Abteilung Strukturforschung, durchgeführt. Die aus diesen Untersuchungen resultierende Struktur von rC α E91A-His mit einer Auflösung von ca. 3,3 Å ist in den folgenden Abbildungen ausschnitthaft und im Vergleich zu anderen bereits bekannten Strukturen von C α - oder rC α -Proteinen dargestellt.

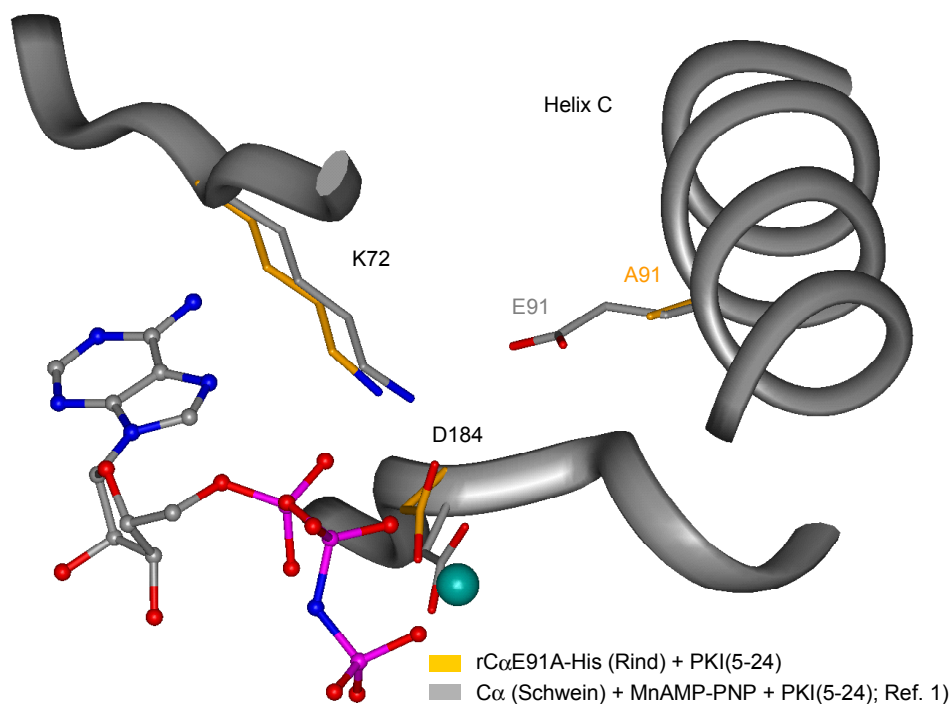


Abb. 3.26: Strukturelle Effekte der Mutation E91A von rC α

Die Strukturen von rC α E91A-His (Rind) im binären Komplex mit PKI(5-24) (gelbe C-Atome) und von C α (Schwein) im ternären Komplex mit MnAMP-PNP und PKI(5-24) (graue C-Atome) wurden im Bereich der Aminosäurereste G125 bis W296 überlagert. Im gewählten Ausschnitt sind Teile des Proteinerückgrates von C α u.a. im Bereich der Helix C als tube-Darstellung, die Seitenketten der Aminosäurereste E91 bzw. A91, K72 und D184 als stick-Darstellung und AMP-PNP als ball and stick-Darstellung gezeigt. Das für die Katalyse essentielle Metallion ist grün dargestellt. Referenz: 1) Bossemeyer *et al.*, 1993; Auflösung 2,0 Å

Die Abbildung 3.26 zeigt zum einen die Struktur von nativem C α (Schwein) im ternären Komplex mit MnAMP-PNP und PKI(5-24). In dem gewählten Ausschnitt ist der in der Helix C lokalisierte Rest E91 mit seinem Interaktionspartner K72 dargestellt. Darüber

hinaus ist das Nukleotid, das ebenso mit K72 eine Wechselwirkung eingeht sowie das für die Bindung des Nukleotids essentielle Metallion und der für die Bindung des Metallions essentielle Rest D184 gezeigt. Zum anderen wurde eine Überlagerung der entsprechenden Aminosäurereste der Struktur von rC α E91A-His (Rind) im binären Komplex mit PKI(5-24) vorgenommen. Bei einer vergleichenden Betrachtung der Strukturen ist deutlich erkennbar, daß sich bei rC α E91A-His die Aminosäurereste K72 und D184 aufeinander zu bewegen.

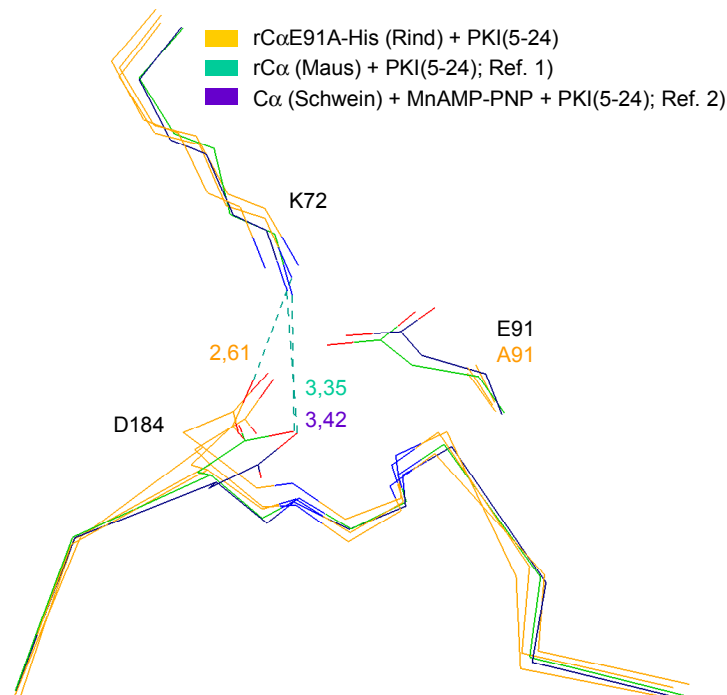


Abb. 3.27: Der Abstand zwischen K72 und D184 bei rC α E91A-His im Vergleich zu rC α - bzw. C α -Proteinen in verschiedenen Komplexen

Die den drei Molekülen der asymmetrischen Einheit von rC α E91A-His (Rind) im binären Komplex mit PKI(5-24) zugehörigen Strukturen (gelbe C-Atome), sowie die von rC α (Maus) im binären Komplex mit PKI(5-24) (grüne C-Atome) und die von C α (Schwein) im ternären Komplex mit MnAMP-PNP und PKI(5-24) (violette C-Atome) wurden im Bereich der Aminosäurereste G125 bis W296 überlagert. Der gewählte Ausschnitt läßt die Seitenketten der Aminosäurereste E91 bzw. A91, K72 und D184 sowie ein Teil des Proteinrückgrates als line-Darstellung erkennen. Die Zahlen entsprechen gemäß ihrer Farbdarstellung den Abständen in Angström zwischen K72 und D184 in der jeweiligen entsprechenden Struktur. Für rC α E91A-His ist der mittlere der drei Abstände gezeigt. Referenzen: 1) Knighton *et al.*, 1993; Auflösung 2,0 Å 2) Bossemeyer *et al.*, 1993; Auflösung 2,0 Å

Diese Bewegung wurde, wie in Abb. 3.27 ersichtlich, weiter analysiert. Dazu wurden hier die Strukturen von rC α E91A-His (Rind) im binären Komplex mit PKI(5-24), rC α (Maus) im binären Komplex mit PKI(5-24) und natives C α (Schwein) im ternären Komplex mit MnAMP-PNP und PKI(5-24) überlagert. Da bei rC α E91A-His drei Moleküle in der asymmetrischen Einheit des monoklinen Kristalls vorlagen, werden hier alle drei

daraus bestimmten Strukturen gezeigt. Der zu $C\alpha$ im ternären Komplex zugehörige monokline Kristall wies zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheit auf. Da sich allerdings zwischen den beiden daraus resultierenden Strukturen keine nennenswerten Unterschiede ergeben, wird nur eine dieser Strukturen in der Abbildung berücksichtigt. Die übrigen im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Strukturen stammen alle von orthorhombischen Kristallen mit nur einem Molekül in der asymmetrischen Einheit. Die in Abb. 3.27 angegebenen Abstände zwischen K72 und D184 der jeweiligen Struktur verdeutlichen die bereits anhand von Abb. 3.26 beschriebene Positionsveränderung dieser Reste bei $rC\alpha E91A$ -His. Während dieser Abstand bei der Struktur von nativem $C\alpha$ (Schwein) im ternären Komplex mit MnAMP-PNP und PKI(5-24) und der Struktur von $rC\alpha$ (Maus) im binären Komplex mit PKI(5-24) nahezu identisch ist und bei ca. 3,4 Å liegt, zeigt $rC\alpha E91A$ -His nur einen Abstand von ca. 2,6 Å der entsprechenden Aminosäurereste. Dabei handelt es sich bei diesem Wert um den mittleren der drei Abstände, die den drei gezeigten Strukturen von $rC\alpha E91A$ -His entsprechen. Die Verkürzung dieses Abstandes zwischen K72 und D184 resultieren aus Seitenkettenbewegungen von K72 und D184, wobei bei einer der drei Strukturen von $rC\alpha E91A$ -His sogar die Tendenz zu einer backbone-Bewegung im Bereich von D184 zu erkennen ist. Das übrige Proteinrückgrat im weiteren Bereich von D184 ist dagegen weitgehend unbeeinflusst. Sowohl die beschriebene Bewegung des Proteinrückgrates als auch das Aufeinanderzubewegen der Reste K72 und D184 wurden im Laufe weiterer Untersuchungen durch eine weitere Struktur von $rC\alpha E91A$ -His (Rind) im binären Komplex mit PKI(5-24) mit einer verbesserten Auflösung von ca. 2,5 Å bestätigt. In diesem Fall war Methanol als Fällungsmittel für die Kristallisation verwendet worden.

Neben dem Bereich der oben beschriebenen essentiellen Aminosäurereste wurde in der Struktur von $rC\alpha E91A$ -His (Rind) auch die Position der Helix C untersucht. Die Abbildung 3.28 zeigt zwei in der vertikalen Achse um 90 Grad gegeneinander gedrehte Ansichten einer Überlagerung dieser Helices verschiedener $rC\alpha$ - bzw. $C\alpha$ -Strukturen in binären oder ternären Komplexen. Dabei stellen die Strukturen des binären Komplexes von $C\alpha$ aus Schwein mit PKI(5-24) (Referenz 1) und die des ternären Komplexes von $C\alpha$ aus Rind mit Staurosporin und PKI(5-24) (Referenz 2) offene Konformationen des Enzyms dar, während die restlichen Strukturen geschlossene Konformationen widerspiegeln (siehe 1.1.2). Erkennbar ist, daß die Struktur der Helix C von $rC\alpha E91A$ -His (Rind) im Vergleich zu den anderen dargestellten Strukturen keine auffälligen Abweichungen zeigt. Eine großräumige Positionsveränderung der Helix C aufgrund der fehlenden Interaktion von K72 und E91 findet bei $rC\alpha E91A$ -His also nicht statt.

Die Struktur von rC α E91A-His wurde darüber hinaus bezüglich der Interaktionen zwischen Protein und Inhibitorpeptid PKI(5-24) untersucht. Auch hier konnten keine auffälligen Veränderungen in Relation zu den verglichenen Strukturen ermittelt werden. Lediglich die in diesen Strukturen vorhandene bidentate Interaktion zwischen E230 und R19 der Pseudosubstraterkennungssequenz von PKI(5-24) (R18 R19 X20 A21) ist bei rC α E91A-His einer monodentaten Wechselwirkung gewichen. Dieser Effekt ist aufgrund des räumlichen Abstandes kaum mit der eingeführten Mutation zu erklären. Möglicherweise spielen als Gründe hierfür Kristallkontakte (Dasgupta *et al.*, 1997) oder unterschiedliche Ladungszustände der entsprechenden Reste verursacht durch unterschiedliche Ionenkonzentrationen bei der Kristallisation eine Rolle.

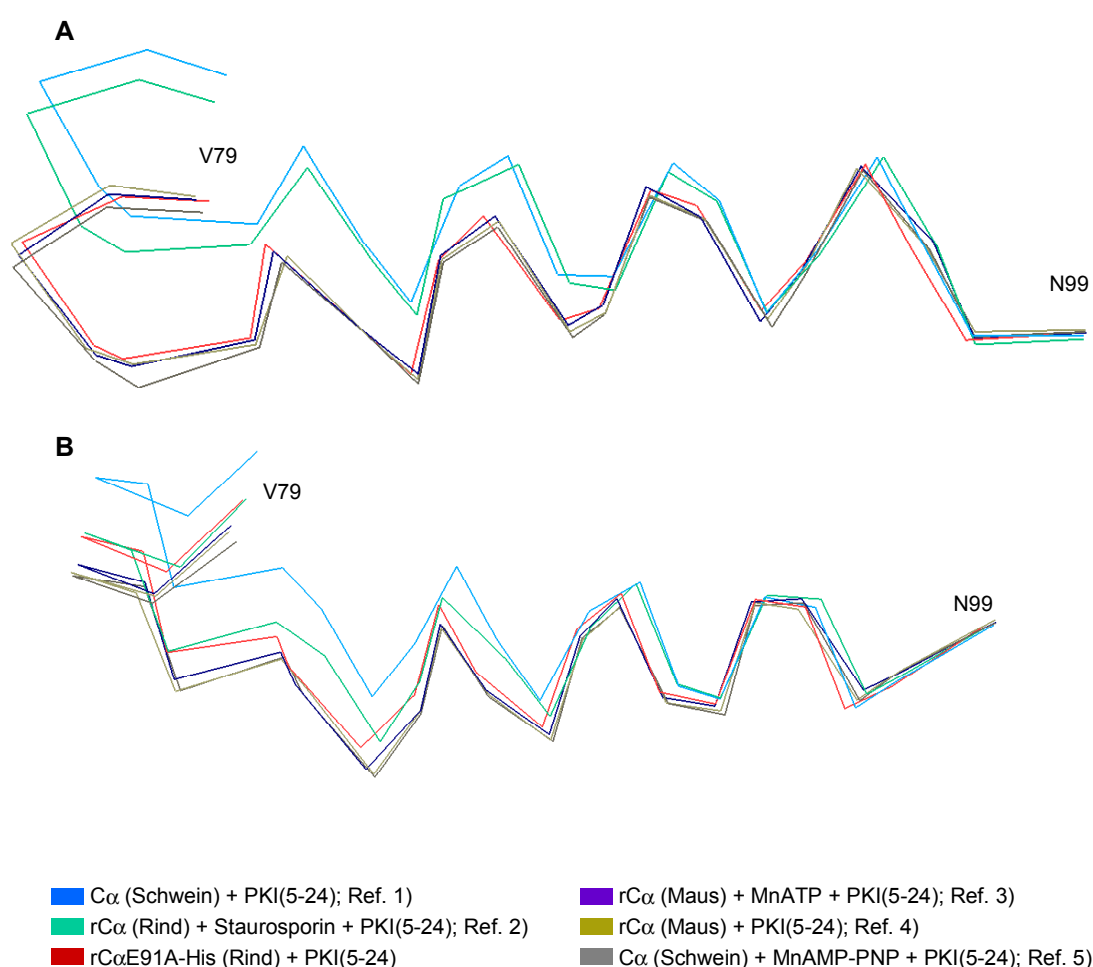


Abb. 3.28: Die Struktur der Helix C von rC α E91A-His im Vergleich zu rC α - bzw. C α -Proteinen in verschiedenen Komplexen

Die Struktur von rC α E91A-His wurde mit den Strukturen von rC α - bzw. C α -Proteinen in verschiedenen Komplexen (siehe Legende bzw. Referenzen) im Bereich der Aminosäurereste G125 bis W296 überlagert. Der gewählte Ausschnitt zeigt das Proteinrückgrat der jeweiligen Helix C im Bereich der Aminosäurereste V79 bis N99 in der line-Darstellung. Ansicht **A** ist gegenüber Ansicht **B** um 90 Grad gedreht. Referenzen: 1) Zheng *et al.*, 1993; Auflösung 2,9 Å 2) Prade *et al.*, 1997; Auflösung 2,3 Å 3) Zheng *et al.*, 1993; Auflösung 2,2 Å 4) Knighton *et al.*, 1993; Auflösung 2,0 Å 5) Bossemeyer *et al.*, 1993; Auflösung 2,0 Å

Insgesamt bleibt festzuhalten, daß die Struktur von rC α E91A-His im binären Komplex mit PKI(5-24) im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Strukturen keine großräumigen Positionsveränderungen - insbesondere bezüglich der Helix C - aufweist. Stattdessen findet eine lokal begrenzte Aufeinanderzu-Bewegung der Reste K72 und D184 statt. Die Interaktion mit dem Inhibitorpeptid ist in Relation zu einer vergleichbaren rC α -Struktur nicht wesentlich beeinflusst.

4 DISKUSSION

Die Proteinkinase A (PKA) spielt im Signaltransduktionsgeschehen von eukaryotischen Zellen eine Schlüsselrolle. Sie hat essentiellen Anteil an der Regulation des Stoffwechsels, der Genexpression, des Wachstums sowie der Differenzierung und Teilung der Zelle. Darüber hinaus dient diese Proteinkinase als Modell für die Erforschung der gesamten Enzymfamilie (siehe 1.1.1). Vor diesem Hintergrund ist ein Verständnis der katalytischen Untereinheit $C\alpha$ von PKA auf molekularer Ebene wünschenswert.

Durch Mutagenesestudien wurde bislang die Funktion verschiedener Aminosäurereste von $C\alpha$ untersucht. Diese Reste sind u.a. im sogenannten Glycinloop lokalisiert (Hemmer *et al.*, 1997; Girod, 1997; Grant *et al.*, 1998; Aimes *et al.*, 2000) oder spielen eine Rolle bei der Interaktion der katalytischen Untereinheit mit den regulatorischen Untereinheiten oder dem Proteinkinaseinhibitor PKI (Gibson and Taylor, 1997; Wen and Taylor, 1994; Baude *et al.*, 1994a; Baude *et al.*, 1994b). Ebenfalls Gegenstand solcher Untersuchungen war u.a. die aktivierende bzw. regulierende Phosphorylierungsstelle am Threoninrest 197 (Adams *et al.*, 1995; Yonemoto *et al.*, 1997). Bezüglich konservierter oder invarianter Reste des katalytischen Zentrums ist die Anzahl von Mutagenesestudien bislang allerdings sehr begrenzt. Der Grund hierfür liegt darin, daß die Expression und Reinigung der entsprechenden Mutanten oftmals mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden ist (Tomoda *et al.*, 1993; Girod, 1997), da sich die Proteine z.B. als unlöslich erweisen. Darüber hinaus ist es bei den wenigen Veröffentlichungen dieser Art oftmals fraglich, ob die essentielle Phosphorylierung an Threonin 197 (oder homologer Reste) im Aktivierungsloop der jeweiligen Mutanten gewährleistet war. In solch einem Falle sind beobachtete veränderte Eigenschaften der Mutante nicht mehr eindeutig auf die eingeführte Mutation selbst zurückzuführen, da sie evtl. durch die fehlende Phosphorylierung hervorgerufen bzw. beeinflußt werden. Dieser Sachverhalt ist bereits bei der MAP-Kinase ERK2 beschrieben (Robinson *et al.*, 1996) und scheint auch bei Untersuchungen der $C\alpha$ -homologen TPK1 im Hefe-Expressionssystem *Saccharomyces cerevisiae* vorzuliegen. Die hier untersuchten TPK1-Mutanten mit Austausch katalytisch essentieller Aminosäurereste konnten darüber hinaus nur in Zellhomogenaten charakterisiert werden (Gibbs and Zoller, 1991a/b; Gibbs *et al.*, 1992).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aufgrund von strukturellen Daten Mutagenesestudien an zwei hochkonservierten Aminosäureresten (F185 und E91) des katalytischen Zentrums von $C\alpha$ durchgeführt. Dementsprechend gliedert sich die Diskussion in zwei Teile. Der erste Teil (4.1.X) befaßt sich mit den Ergebnissen der Untersuchungen der **rC α F185-Mutanten**, während der zweite Teil (4.2.X) die Ergebnisse der

Untersuchungen der **rC α E91-Mutanten** behandelt. Die Mutanten wurden zunächst in *E. coli* exprimiert bzw. zur Sicherstellung der essentiellen aktivierenden Phosphorylierung an Threonin 197 ggf. mit rC α coexprimiert. Nach Reinigung erfolgte eine kinetische Charakterisierung auf Aktivitätsbasis sowie bezüglich der Interaktion mit PKI(5-24) und ATP. Hierfür wurde ein RMA-basierter automatisierter Bindungsassays etabliert. Zwei Mutanten (rC α F185W und rC α E91A-His) konnten darüber hinaus mittels entwickelter chromatographischer Methoden soweit gereinigt werden, daß eine Kristallisation gelang und eine strukturelle Analyse möglich war.

Aufgrund der erhaltenen Daten wird die funktionelle Bedeutung der jeweils mutierten Aminosäure hinterfragt und diskutiert. Abschließend wird ein Ausblick auf weiterführende Arbeiten gegeben.

4.1 Einblicke in die Funktion von F185

Phenylalanin 185 der katalytischen Untereinheit C α der Proteinkinase A (PKA) ist Bestandteil des hochkonservierten DFG-Motivs, welches den Beginn des Aktivierungssegmentes markiert (siehe Abb. 1.1). Da Mutagenesestudien an hochkonservierten Resten des katalytischen Zentrums von C α nur vereinzelt vorliegen (siehe vorhergehender Abschnitt), wurde für die Funktionszuweisung von F185 bisher hauptsächlich auf Kristallstrukturdaten zurückgegriffen. Der genannte Rest ist in einer Tasche positioniert, welche ihrerseits in einem locker gepacktem hydrophoben Bereich liegt. Der benachbarte Rest D184 spielt eine essentielle Rolle bei der Nukleotidbindung und damit für die katalytische Aktivität des Enzyms. Daher ist es denkbar, daß die Funktion von F185 darin zu suchen ist, daß es als eine Art hydrophober Anker für eine für die Katalyse optimale Positionierung von D184 sorgt und gleichzeitig eine für den Reaktionsverlauf ausreichende Konformationsflexibilität erlaubt (Bossemeyer *et al.*, 1993; Engh and Bossemeyer, 2001). Aufgrund dieser Überlegungen wurden die rC α -Mutanten mit den Aminosäureaustauschen F185A, F185L und F185W bereits im Rahmen einer vorausgegangenen Arbeit hergestellt (Girod, 1997). Ein Ziel dieser Arbeit war es, zu klären, welchen Einfluß die unterschiedliche Größe der an Position 185 eingeführten Aminosäurereste auf die Ausfüllung des locker gepackten hydrophoben Bereiches hat. Die damit möglicherweise einhergehende beeinflusste Konformationsflexibilität des Restes 185 und seiner Umgebung sowie die veränderte Positionierung des benachbarten Restes D184 könnten sich auf die enzymatische Aktivität der genannten rC α -Mutanten auswirken. Daher erfolgte eine kinetische Charakterisierung dieser Mutanten und darüber hinaus im Falle von rC α F185L und rC α F185W auch eine strukturelle Analyse.

4.1.1 Die kinetische Analyse der rC α F185-Mutanten ergibt ein komplexes Bild

Eine erste kinetische Analyse der rC α F185-Mutanten auf Basis der Enzymaktivität zeigt, daß die Mutanten im Vergleich zum jeweiligen Wildtypenzym veränderte kinetische Eigenschaften aufweisen. So zeigen alle Proteine bezüglich ATP verringerte Affinitäten (Faktoren ca. 3 - 4). Hinsichtlich der Affinität zu Kemptid weisen rC α F185L sowie rC α F185A-His Verringerungen auf (Faktoren ca. 4 bzw. 8); rC α F185W-His zeigt die Tendenz zu einer Verringerung (Faktor ca. 1,3). Darüber hinaus sind bei allen Mutanten erhöhte spezifische Maximalgeschwindigkeiten (Faktoren ca. 2 - 9) sowie spezifische Eigenschaften hinsichtlich der katalytischen Effizienz zu verzeichnen.

Die verringerten Affinitäten der rC α F185-Mutanten bezüglich Kemptid sind aufgrund der Position der eingeführten Mutationen möglicherweise als ein indirekter Effekt der Verringerung der Affinität zum Nukleotid zu erklären. Daß die Affinität eines Bindungspartners von der Bindung des anderen Bindungspartners an C α beeinflußt werden kann, zeigt der bei der katalytischen Untereinheit vorliegende Bindungs-Synergismus zwischen ATP und PKI(5-24). Dabei ist die Affinität jedes einzelnen Bindungspartners zur katalytischen Untereinheit beim gemeinsamen Anbieten höher als ohne den jeweiligen anderen Bindungspartner (Whitehouse and Walsh, 1983; Lew *et al.*, 1996). Zwar gilt für die Bindung von ATP und Kemptid an C α kein gleichwertiger Bindungs-Synergismus wie bei der Bindung von ATP und PKI(5-24), da die Affinität für das Nukleotid durch eine gleichzeitige Bindung von Kemptid nicht erhöht wird (Whitehouse *et al.*, 1983). Allerdings ist bekannt, daß umgekehrt die Affinität von Kemptid zu C α in Gegenwart von ATP sehr viel größer ist als ohne Anbieten des Nukleotids (Whitehouse *et al.*, 1983; Adams and Taylor, 1992). Das zeigt, daß es durchaus denkbar ist, daß bei den rC α F185-Mutanten in Gegenwart von ATP und Kemptid durch die Mutationen hervorgerufene Effekte hinsichtlich der Nukleotidbindung auch Einfluß auf die Affinität für das Peptid haben können. Bei einem Vergleich der Mutanten untereinander läßt sich ein Zusammenhang zwischen der Intensität des Effektes hinsichtlich der Kemptid-Bindung und der Intensität des Effektes hinsichtlich ATP-Bindung bedingt herstellen. So zeigt sowohl hinsichtlich K_M Kemptid als auch K_M ATP rC α F185W-His die geringsten und rC α F185L etwas größere Effekte. Das Protein rC α F185A-His weist allerdings mit dem am stärksten ausgeprägten Effekt hinsichtlich K_M Kemptid lediglich einen moderaten Effekt hinsichtlich K_M ATP auf, der dem von rC α F185W-His vergleichbar ist.

Bei der postulierten Funktion von Phenylalanin 185 bezüglich der Konformationsflexibilität und Positionierung von D184 (siehe 4.1) wäre bei den rC α F185-Mutanten gemäß der Größe der durch die Mutation eingeführten Aminosäurereste Effekte hinsichtlich der Bindung des Nukleotids und möglicherweise

auch hinsichtlich der spezifischen Maximalgeschwindigkeit zu erwarten. Ein im Vergleich zum Phenylalaninrest 185 des Wildtyp-Enzyms kleinerer Rest wie bei rC α F185L könnte demnach zu einer entsprechend erhöhten Konformationsflexibilität des Proteins im Bereich des Aminosäureaustausches führen. Hierdurch wiederum wäre evtl. zum einen eine für die Bindung von ATP nicht mehr optimale Positionierung von D184 gegeben, was möglicherweise zu einer verringerten Affinität bezüglich des Nukleotids führen würde. Zum anderen wäre eventuell auch eine erhöhte spezifische Maximalgeschwindigkeit zu erwarten, da sich eine höhere Konformationsflexibilität auf den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der gesamten Katalysereaktion, die ADP-Freisetzung, beschleunigend auswirken könnte. Die Effekte könnten bei einem wesentlich kleineren Rest an Position 185 wie bei rC α F185A-His entsprechend stärker zu verzeichnen sein. Die mit Hilfe der Aktivitätsassays ermittelten Daten zeigen, daß die Mutante rC α F185L tatsächlich eine verringerte Affinität zu ATP bei einer gleichzeitig erhöhten spezifischen Maximalgeschwindigkeit aufweist. Die Mutante rC α F185A-His weist im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp ebenfalls einen erhöhten Wert für $K_{M\text{ATP}}$ und v_{max} auf. Allerdings ist dieser Befund sowohl hinsichtlich $K_{M\text{ATP}}$ als auch v_{max} weniger stark ausgeprägt als bei rC α F185L.

Ein im Vergleich zum Wildtyp-Enzym größerer Rest an Position 185 wie bei rC α F185W-His könnte nach der postulierten Funktion von F185 zu einer verringerten Konformationsflexibilität führen, wodurch einerseits eine verringerte spezifische Maximalgeschwindigkeit aber andererseits durch eine entsprechende Positionierung von D184 eine erhöhte Affinität zu ATP zu verzeichnen sein könnte. Das Protein rC α F185W-His zeigt diese Eigenschaften jedoch nicht. Vielmehr sind sowohl die spezifische Maximalgeschwindigkeit als auch die Michaeliskonstante für ATP im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp vergrößert. Dies ist im Rahmen der postulierten Funktion von F185 möglicherweise als Hinweis darauf zu werten, daß das Einführen eines im Vergleich zum Wildtyp größeren Aminosäurerestes an Position 185 hinsichtlich der Konformationsflexibilität mehr als „kompensiert“ werden kann. Dieser Rest könnte dann trotz seiner Größe eine höhere Konformationsflexibilität aufweisen als F185 des entsprechenden Wildtypenzym.

Insgesamt bleibt bis hierher festzuhalten, daß sich die durch Aktivitätsassays ermittelten kinetischen Parameter nur teilweise durch die hypothetische Funktion von F185 erklären lassen. Werden diese Parameter in Form der katalytischen Effizienz im Vergleich zum entsprechenden Wildtypenzym zusammengefaßt und analysiert, so ergibt sich folgendes Bild.

Das Protein rC α F185L zeigt sowohl hinsichtlich ATP als auch hinsichtlich Kempetid eine erhöhte katalytische Effizienz. Die Mutante rC α F185W-His weist hinsichtlich $v_{\text{max}}/K_{M\text{Kempetid}}$ einen tendenziell vergrößerten und hinsichtlich $v_{\text{max}}/K_{M\text{ATP}}$ einen leicht

verringerten Wert auf. Unter in der Zelle herrschenden Bedingungen könnte die verringerte katalytische Effizienz hinsichtlich ATP von rC α F185W-His jedoch nur geringfügige Auswirkungen auf die tatsächliche Aktivität dieser Mutante haben, da hier eine Limitierung durch ATP nicht zu erwarten ist. Sowohl rC α F185L als auch rC α F185W-His zeigen also eine bessere bzw. ähnliche katalytische Effizienz im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp. Dieser Befund deckt sich mit der Tatsache, daß beide Aminosäureaustausche bei einigen Proteinkinasen an entsprechender Position zu finden sind. So ist der Austausch von F zu L bei ca. 5 % und der Austausch von F zu W bei ca. 4 % der bekannter Sequenzen von Proteinkinasen zu verzeichnen. Ein Leucinrest an der entsprechenden Position ist z.B. bei Proteinkinasen zu finden, die G-Protein gekoppelte Rezeptoren phosphorylieren. Ein Tryptophanrest an entsprechender Stelle ist z.B. bei CKII verwirklicht. Das Protein rC α F185A-His weist hinsichtlich ATP eine tendenziell verringerte und hinsichtlich Kemptid eine eindeutig verringerte katalytische Effizienz auf. Diese könnte unter Bedingungen in der Zelle einen erheblichen Einfluß auf die tatsächliche Aktivität des Enzyms haben, da hier eine Limitierung durch das Protein-Substrat zu erwarten ist. In Übereinstimmung mit dieser Annahme ist ein Alaninrest bei Proteinkinasen an entsprechender Position nicht zu finden. Unter in der Zelle herrschenden Bedingungen kann bei rC α also möglicherweise die Funktion des Phenylalaninrestes 185 hinsichtlich der enzymatischen Aktivität sowohl durch einen größeren hydrophoben Rest wie Tryptophan, als auch durch einen etwas kleineren hydrophoben Rest wie Leucin, nicht aber durch einen sehr viel kleineren hydrophoben Rest wie Alanin übernommen werden.

Um evtl. weitere Einblicke bezüglich der kinetischen Parameter der rC α F185-Mutanten erhalten zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Resonant Mirror Affinography (RMA) etabliert. Hierdurch war es möglich, auf Basis eines optischen Biosensors Untersuchungen hinsichtlich der Interaktionen im ternären Komplex aus rC α -Protein, ATP und PKI(5-24) anzustellen (siehe 3.1.3 bzw. 2.4.11). Beim gleichzeitigen Vorliegen dieser Art der wechselwirkenden Bindungspartner ist der bereits zu Beginn dieses Abschnittes (4.1.1) erwähnte Bindungs-Synergismus zwischen ATP, PKI(5-24) und rC α -Protein gegeben.

Hinsichtlich der Interaktion mit PKI(5-24) zeigen alle bestimmten Parameter der rC α F185-Mutanten unter Berücksichtigung der Fehler keine, bzw. keine meßbaren Unterschiede zum jeweils vergleichbaren Wildtyp-Enzym. Lediglich die Mutante rC α F185A-His weist eventuell die Tendenz zu einer leicht verringerten Affinität zu PKI(5-24) in Gegenwart von ATP auf. Dieser Befund würde mit der Tatsache korrelieren, daß diese Mutante auch die stärksten Effekte hinsichtlich einer verringerten Affinität für Kemptid aufweist. Gleichzeitig könnte dieser Aspekt ein Hinweis darauf

sein, daß die Effekte der Mutationen, die zur Verringerung der Affinitäten für Kemptid bei den Aktivitätsassays führen, bei der Bindung von PKI(5-24) in Gegenwart von ATP nur eingeschränkt zum Tragen kommen. Dadurch könnten diese Effekte nur noch zu geringfügig veränderten Eigenschaften der Mutanten hinsichtlich der Affinität zu PKI(5-24) in Gegenwart von ATP führen. Möglicherweise sind so diese geringfügig veränderten Eigenschaften mit RMA-Messungen nicht mehr nachzuweisen. Grundsätzlich ist anzumerken, daß bei einem Vergleich der Befunde der Aktivitätsassays und der RMA-Messungen Korrelationen nicht unbedingt erwartet werden können. Ein Grund hierfür ist, daß bei der Interaktion zwischen Protein, ATP und PKI(5-24) andere und im Vergleich zur Interaktion zwischen Protein, ATP und Kemptid auch komplexere molekulare Mechanismen im Vordergrund stehen. Dies wird schon durch den Bindungs-Synergismus deutlich, durch den sich die Interaktion von $rC\alpha$, ATP und PKI(5-24) im Gegensatz zur Interaktion von $rC\alpha$, ATP und Kemptid auszeichnet (Whitehouse and Walsh, 1983; Lew *et al.*, 1996; Whitehouse *et al.*, 1983). Daneben ist für den Bindungssynergismus ein im Vergleich zum Heptapeptid Kemptid größeres Inhibitorpeptid nötig. Auch hierin spiegeln sich die im Vergleich zur Bindung von Kemptid und Nukleotid umfangreicheren molekularen Mechanismen bei der Bindung von PKI(5-24) in Gegenwart von ATP wider. Schließlich liegt ein grundlegender Unterschied von Aktivitätsassays und den durchgeführten RMA-Messungen aber auch darin, daß die RMA-Messungen tatsächlich lediglich die Entstehung des Komplexes aus Protein, ATP und PKI(5-24) charakterisieren. Die mittels Aktivitätsassays ermittelten Michaeliskonstanten dagegen können möglicherweise auch Effekte beinhalten, die nicht nur die eigentliche Substratbindung, sondern evtl. auch die Substratumsetzungsreaktion betreffen.

Hinsichtlich der Affinität zu ATP im ternären Komplex aus Protein, ATP und PKI(5-24) weisen alle $rC\alpha F185$ -Mutanten im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp verringerte Affinitäten zum Nukleotid auf. Die Proteine $rC\alpha F185L$ und $rC\alpha F185W-His$ weisen dabei sowohl hinsichtlich K_{DATP} als auch K_{MATP} veränderte Eigenschaften mit vergleichbaren Intensitäten auf. Das Protein $rC\alpha F185A-His$ zeigt von allen Mutanten hinsichtlich K_{DATP} den stärksten Effekt. Eine entsprechend stark veränderte Michaeliskonstante ist bei dieser Mutante nicht zu verzeichnen. Die mittels RMA-Messungen erhobenen Befunde korrelieren damit wiederum nur bedingt mit den mittels Aktivitätsassays ermittelten. Mögliche Gründe hierfür sind bereits oben beim Vergleich der Affinitäten der Mutanten hinsichtlich Kemptid und PKI(5-24) genannt worden. Die ermittelten Werte für K_{MATP} können einen „direkten“ Effekt bezüglich der Bindung des Nukleotids zeigen, da die Bindung des gleichzeitig angebotenen Kemptids keinen Einfluß auf die Affinität des Proteins zum Nukleotid hat (Whitehouse *et al.*, 1983). Die Werte für K_{DATP} in Gegenwart von PKI(5-24) dagegen können aus einem Zusammenspiel von Effekten resultieren. So gehen hier möglicherweise einerseits

„direkte“ Effekte bei der Bindung des Nukleotids allein (z.B. durch strukturelle Veränderungen der ATP-Bindungstasche) sowie andererseits „indirekte“ Effekte bezüglich des Bindungs-Synergismus zwischen $rC\alpha$, ATP und PKI(5-24) ein.

Ein Zusammenhang zwischen der Größe der durch die Mutationen eingeführten Reste an der Position 185 und den Intensitäten der Effekte hinsichtlich K_D ATP in Gegenwart von PKI(5-24) läßt sich auch bei diesen kinetischen Parametern nur eingeschränkt feststellen. So weist $rC\alpha F185A$ -His mit dem kleinsten Rest an Position 185 die am stärksten verringerte Affinität zu ATP in Gegenwart des Inhibitorpeptides auf. Die Mutante $rC\alpha F185L$ mit einem etwas größeren Rest an der entsprechenden Position zeigt auch einen Effekt geringerer Intensität. Damit sind bei diesen beiden Mutanten Befunde zu verzeichnen, die im Einklang mit der hypothetischen Funktion von F185 stehen. Die im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp kleineren Reste an Position 185 bei diesen Mutanten könnten also zu einer erhöhten Konformationsflexibilität im umgebenden Bereich führen. Damit wäre auch eine für die Bindung des Nukleotids nicht mehr optimale Positionierung von D184 denkbar. Die Größe der durch die Mutationen eingeführten Reste korreliert hier mit den Intensitäten der beobachteten Effekte. Der im Vergleich zum Wildtyp größere Tryptophanrest von $rC\alpha F185W$ -His führt dagegen nicht zu gegenläufigen Effekten, d.h. dieses Protein zeigt im Vergleich zum Wildtyp keine erhöhte Affinität zu ATP in Gegenwart von PKI(5-24). Stattdessen ist hier ebenfalls eine Vergrößerung des K_D ATP zu verzeichnen. Die Intensität dieses Befundes ist vergleichbar mit der des Effektes bei $rC\alpha F185L$. Eine ähnliche Situation zeigte sich schon bei den Michaeliskonstanten für ATP. Auch hier war für $rC\alpha F185W$ -His keine vergrößerte, sondern eine verringerte Affinität für das Nukleotid zu verzeichnen. Bereits in diesem Zusammenhang wurde auf die Vermutung verwiesen, daß das Einführen eines im Vergleich zum Wildtyp größeren Aminosäurerestes an Position 185 möglicherweise im Hinblick auf die Konformationsflexibilität mehr als „kompensiert“ werden kann. Auf diese Weise wäre es denkbar, daß dieser Rest trotz seiner Größe eine höhere Konformationsflexibilität aufweist als F185 des entsprechenden Wildtypenzym.

Ebenso wie schon bei den mittels Aktivitätsassays erhobenen kinetischen Parameter lassen sich auch die durch RMA erhaltenen Daten bezüglich der Affinität der $rC\alpha F185$ -Mutanten zu ATP in Gegenwart des Inhibitorpeptides nur zum Teil in Verbindung mit der Größe der durch die Mutationen eingeführten Aminosäurereste bringen. Der aufgrund der hypothetischen Funktion von F185 vermutete Einfluß der Größe des Restes an Position 185 auf die Konformationsflexibilität und auf die Positionierung von D184 kann daher nur bedingt angenommen werden.

Insgesamt ergeben die für die rC α F185-Mutanten ermittelten kinetischen Daten ein komplexes Bild. Die beobachteten Effekte sind nur bedingt mit der Größe der durch die Mutationen eingeführten Aminosäurereste in Beziehung zu setzen. Damit ist eine Korrelation der Ergebnisse mit der hypothetischen Funktion von F185 bei der Positionierung von D184 einhergehend mit der Gewährung einer für die Katalyse ausreichenden Konformationsflexibilität nur eingeschränkt möglich. Gleichzeitig geben die ermittelten katalytischen Effizienzen der Mutanten Hinweise darauf, daß unter in der Zelle herrschenden Bedingungen die Rolle von F185 hinsichtlich der katalytischen Aktivität auch durch die hydrophoben Reste Leucin und Tryptophan übernommen werden kann.

4.1.2 Die Mutationen F185W und F185L führen bei rC α zu einer Vielzahl von strukturellen Effekten

Durch die Entwicklung eines Reinigungsverfahrens, bei dem rC α -Mutanten, die der Coexpression mit dem Wildtyp-Enzym bedürfen, ohne evtl. störenden His-tag in homogenem Phosphorylierungsgrad isoliert werden können, ist eine Kristallisation von rC α F185W möglich.

Eine visuelle Analyse der Strukturen von rC α F185L und rC α F185W läßt im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Strukturen zunächst keine wesentlichen Positionsveränderungen von Aminosäureresten erkennen. Lediglich der mutierte Rest W185 zeigt vermutlich aus sterischen Gründen eine geringfügige Bewegung, die möglicherweise durch das im Vergleich zu F185 größere Doppelringsystem verursacht wird. Die Aminosäureaustausche in den Strukturen der Mutanten zeigen - entgegen der im Vorfeld dieser Arbeit angestellten Vermutungen, jedoch in Übereinstimmung mit dem komplexen Bild der ermittelten kinetischen Parameter - keinen alleinigen Einfluß auf den für die Metallionen- bzw. Nukleotidbindung essentiellen Rest D184.

Eine detaillierte Analyse der Strukturen im Bereich der durch die Mutationen eingeführten Aminosäuren ergibt stattdessen eine im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Strukturen geringfügige Positionsveränderung mehrerer und je nach Mutante unterschiedlicher Reste. Hierzu zählen Aminosäuren der Helix C, des sogenannten katalytischen Loops sowie des Metallionen-Bindungsloops. Es findet also eine bezüglich der einzelnen Positionsveränderungen geringfügige, aber bezüglich der räumlichen Ausdehnung umfassende Veränderung dieses Gesamtgefüges um den jeweiligen Rest 185 statt. Die Effekte bzw. Wirkungen dieser Positionsveränderungen sind - ebenso wie die molekularen Ursachen - aufgrund der Komplexität nicht nachzuvollziehen. Damit bestätigen die strukturellen Daten von rC α F185L und

rC α F185W die Vermutung, die bereits aufgrund der ermittelten kinetischen Parameter angestellt wurde. Die durch die Mutationen eingeführten Reste führen also nicht hauptsächlich zu einem alleinigen Effekt an einer bestimmten Stelle bzw. bezüglich eines bestimmten benachbarten Aminosäurerestes. Dagegen kommt es zu mehreren und je nach Art des durch die Mutation eingeführten Aminosäurerestes unterschiedlichen Effekten bezüglich unterschiedlicher benachbarter Reste. Dieses Geflecht von Effekten resultiert in einem komplexen Gesamtbild.

Eine weitergehende Analyse der Strukturen von rC α F185L und rC α F185W zeigt, daß die Größe der durch die Mutationen eingeführten Aminosäurereste mit der Anzahl der van der Waals-Wechselwirkungen zwischen dem jeweiligen Rest an Position 185 und den benachbarten Aminosäureresten in Zusammenhang steht. Jedoch sind die B-Faktoren sowohl der eingeführten Aminosäurereste als auch der van der Waals-Interaktionspartnern als mögliche Indikatoren für Konformationsflexibilität nicht zu korrelieren mit der Anzahl der van der Waals-Interaktionen. Möglicherweise ist hier eine weitere Verfeinerung der Strukturen nötig, um eine detailliertere Aussage machen zu können. Jedoch ist nach dem derzeitigen Kenntnisstand eine Abhängigkeit zwischen der Größe der Aminosäure an Position 185 und der Konformationsflexibilität in diesem Bereich - soweit sie durch die entsprechenden B-Faktoren repräsentiert wird - nicht herzustellen. Dieser Befund liefert Hinweise dafür, warum eine Korrelation der ermittelten kinetischen Parameter mit der Größe der durch die Mutationen eingeführten Aminosäurereste und der vermuteten einhergehenden veränderten Konformationsflexibilität nur bedingt möglich ist.

Eine Untersuchung der drei Kavitäten, welche in dem hydrophoben, lose gepackten Bereich um die Position des jeweiligen Restes 185 lokalisiert sind, ergibt, daß bei der Struktur, die den im Vergleich zum Wildtyp größeren Rest Tryptophan an Position 185 aufweist, das Volumen der Kavitäten in der Summe im Vergleich zu den Wildtyp-Strukturen verringert ist. Aber auch die Struktur, die den im Vergleich zum Wildtyp kleineren Rest Leucin an der Position 185 aufweist, weist eine Verringerung der Summe der Kavitäten-Volumina im Vergleich zu den Wildtyp-Strukturen auf. Dieser Befund ist hinsichtlich seiner Intensität nicht so stark zu verzeichnen wie bei rC α F185W. Eine Verringerung des Gesamtvolumens der Kavitäten ist jedoch nicht durch das Einführen eines im Vergleich zum Wildtyp kleineren Restes zu begründen, so daß die Befunde insgesamt widersprüchlich sind. Darüber hinaus ist schwer zu beurteilen, ob diese Befunde tatsächlich auf Veränderungen der Volumina hinweisen, da die Unterschiede insgesamt sehr gering sind und die für diese Analyse verwendete Software keinerlei Standardabweichungen o.ä. zu den entsprechenden Werten errechnete. Damit lassen die Daten keinen eindeutigen Einfluß der Größe des eingeführten Restes an Position 185 auf das Volumen der Kavitäten zu. Ziel der Aminosäureaustausche an der Position 185 der katalytischen Untereinheit C α von PKA

war es, durch das Einfügen zum im Vergleich zum Rest F185 des Wildtyp-Enzyms größerer und kleinerer hydrophober Reste bei den entsprechenden Mutanten möglicherweise Einfluß auf den Grad der Ausfüllung des hydrophoben, lose gepackten Bereiches im Umfeld des Aminosäureaustausches und damit auf die Konformationsflexibilität zu nehmen. Die erhobenen strukturellen Daten lassen jedoch erkennen, daß der genannte hydrophobe, lose gepackte Bereich derart flexibel zu sein scheint, daß eine Größenveränderung des Restes an Position 185 von Phenylalanin zu Leucin und Tryptophan weitestgehend „kompensiert“ werden kann. Das Einfügen der genannten Aminosäuren führt bei den entsprechenden Mutanten offenbar zu einem komplexen Netz geringfügiger Bewegungen an je nach Aminosäureaustausch unterschiedlichen Resten. Diese Effekte können evtl. als eine Art komplexe Kompensationsbewegungen gedeutet werden, welche möglicherweise letztendlich dazu führen, daß die hypothetischen eindeutigen Veränderungen der Konformationsflexibilität und die damit einhergehend postulierten kinetischen Effekte nur bedingt zu verzeichnen sind.

Die strukturellen Daten insgesamt liefern zum einen eine Bestätigung der bereits aufgrund des komplexen Bildes der kinetischen Parameter angestellten Vermutung, wonach die durch die Mutationen eingeführten Aminosäurereste eine Vielzahl von unterschiedlichen Effekten an unterschiedlichen Positionen des Enzyms haben. Darüber hinaus zeigen die Strukturen, daß mittels Kavitäten und B-Faktoren als mögliche Indikatoren von Konformationsflexibilität kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Größe der durch die Mutationen eingeführten Aminosäurereste und der Konformationsflexibilität herzustellen ist. Dieser Befund liefert zum einen Hinweise dafür, warum die postulierten kinetischen Effekte, die auf einer Veränderung der Konformationsflexibilität des Restes 185 beruhen, nicht eindeutig nachgewiesen werden können. Zum anderen weisen die strukturellen Daten darauf hin, daß der hydrophobe lose gepackte Bereich um den Rest 185 eine hohe Konformationsflexibilität aufweist.

4.1.3 Zusammenfassung und Schlußfolgerung

Phenylalanin 185 der katalytischen Untereinheit C α der Proteinkinase A ist im DFG-Motiv lokalisiert, welches innerhalb der Proteinkinase-Familie hochkonserviert ist. Kristallstrukturdaten zeigen, daß die Seitenkette des Aminosäurerestes F185 in einem hydrophoben, lose gepackten Bereich liegt. Die daraus abgeleitete hypothetische Funktion dieses Restes besteht darin, einerseits für eine optimale Positionierung des benachbarten für die Metallionen- bzw. Nukleotidbindung essentiellen Restes D184 zu

sorgen und andererseits gleichzeitig eine für die Katalyse ausreichende Konformationsflexibilität zu gewährleisten (Bossemeyer *et al.*, 1993).

Aufgrund dieser Hypothese könnten Aminosäureaustausche an der Position 185 von rC α zu im Vergleich zu Pheylalanin größeren und kleineren hydrophoben Resten Einfluß auf den Grad der Ausfüllung der genannten hydrophoben, lose gepackten Umgebung und so auf die Konformationsflexibilität und die Positionierung von D184 nehmen. Es zeigt sich allerdings bei den Strukturen von rC α F185L und rC α F185W, daß die Größe der durch die Mutationen eingeführten Aminosäurereste keinen eindeutigen Einfluß auf mögliche Indikatoren der Konformationsflexibilität im Bereich der Mutation hat. Vielmehr scheint dieser Bereich derart flexibel, daß es hier zu einer Art komplexer Kompensationsbewegung kommen kann. Diese besteht offenbar aus geringfügigen Positionsveränderungen einer Vielzahl von je nach Aminosäureaustausch unterschiedlichen benachbarten Resten. Dieses umfangreiche Geflecht struktureller Effekte geht einher mit einem komplexen Bild der kinetischen Parameter der rC α F185-Mutanten. Gleichzeitig weisen die katalytischen Effizienzen der Mutanten darauf hin, daß unter in der Zelle herrschenden Bedingungen die Rolle von F185 hinsichtlich der katalytischen Aktivität auch durch die hydrophoben Reste Leucin und Tryptophan übernommen werden kann.

Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse muß die Funktion von F185 neu überdacht werden. Eine Rolle dieses Restes bei der Positionierung von D184 und der Gewährleistung der für die katalytische Aktivität nötigen Konformationsflexibilität kann nach wie vor nicht ausgeschlossen werden. Allerdings kann diese Rolle nicht der einzige Grund für die hohe Konserviertheit dieses Restes sein, da möglicherweise unter in der Zelle herrschenden Bedingungen auch die Reste Leucin und Tryptophan in rC α eine vergleichbare Funktion hinsichtlich der enzymatischen Aktivität erfüllen können. Es müssen also noch andere funktionelle Aufgaben von F185 vorliegen, die evtl. in der Wechselwirkung mit seiner hydrophoben Umgebung zu suchen sind. Möglicherweise sind dies Funktionen hinsichtlich der strukturellen Regulation. Hinweise für eine derartige Rolle wurden bereits bei anderen Proteinkinasen für den entsprechenden Rest gefunden. So blockiert bei der cytoplasmatischen Proteinkinase-Domäne des Insulinrezeptors (IRK) der entsprechende Phenylalaninrest in inaktiver Konformation des Enzyms die Nukleotidbindungstasche. Hierfür erfolgt im Vergleich zur Struktur des aktiven Enzyms scheinbar eine großräumige „Umklappbewegung“ des Phenylalaninrestes (Hubbard *et al.*, 1994). Eine ähnliche Situation liegt auch bei Strukturen der inaktiven katalytischen Domäne der Abelson Tyrosinkinase (Abl) (Schindler *et al.*, 2000) sowie bei einer Struktur der MAP-Kinase p38 vor (persönliche Mitteilung Dr. D. Bossemeyer). Es ist offensichtlich, daß für diesen möglichen strukturellen Regulationsmechanismus eine hohe Konformationsflexibilität des entsprechenden Restes und seiner Umgebung essentiell ist. Vor diesem Hintergrund

unterstützt die gewonnene Erkenntnis hinsichtlich der Konformationsflexibilität im Bereich von F185 bei $rC\alpha$ die Möglichkeit, daß der Phenylalaninrest des DFG-Motivs eine generelle Rolle hinsichtlich der strukturellen Regulation von Proteinkinasen spielt.

4.2 Einblicke in die Funktion von E91

Der invariante Rest Glutamat 91 der katalytischen Untereinheit $C\alpha$ der Proteinkinase A ist in der Mitte der Helix C (I85 - A97) lokalisiert und bildet eine Salzbrücke mit dem ebenfalls invarianten Rest Lysin 72, welcher wiederum bei der Nukleotidbindung eine essentielle Rolle spielt (siehe 1.1.2.1). Die genannte ionische Interaktion der entsprechend homologen Reste steht bei vielen Proteinkinasen oftmals im Zusammenhang mit einer spezifischen räumlichen Ausrichtung der Helix C. Diese räumliche Ausrichtung der Helix wiederum steht in direktem Zusammenhang mit der Aktivität des jeweiligen Enzyms. Dabei zeigen Strukturen inaktiver Proteinkinasen oft positionelle oder konformelle Veränderungen der Helix C, die in vielen Fällen mit einem Verlust der Interaktion zwischen E91 und K72 bzw. deren homologen Resten einhergehen. Strukturen aktiver Proteinkinasen dagegen weisen bis auf wenige Ausnahmen eine "korrekt" orientierte Helix in Verbindung mit einer intakten Salzbrücke zwischen den genannten Resten auf. Dieser Befund repräsentiert einen generell in Proteinkinasen verwirklichten strukturellen Modulationsmechanismus (Engh and Bossemeyer, 2001).

Mutagenesestudien an E91 homologen Resten wurden bisher nur an der bakteriellen Antibiotikumresistenz-vermittelnden Proteinkinase APH(3')-IIIa und an TPK1 in Hefe durchgeführt. Diese Untersuchungen lieferten widersprüchliche Ergebnisse. Bei APH(3')-IIIa wird dem E91 von $C\alpha$ homologen E60, welches mit K44 interagiert (entsprechend K72 bei $C\alpha$), keine entscheidende Rolle bei der ATP-Erkennung oder der Katalyse zugeschrieben (Boehr *et al.*, 2001). Dagegen zeigte die TPK1-Mutante im Rohextrakt unter Reaktionsbedingungen, die für das entsprechende Wildtypenzym als optimal gelten, nur noch 0,3 % der Wildtyp-Aktivität (Gibbs and Zoller, 1990; Gibbs *et al.*, 1991). Allerdings trug diese Mutante neben dem E91A bei $C\alpha$ entsprechenden Austausch (E135A) noch zwei zusätzliche Aminosäureaustausche an nicht konservierten Resten (D134A und R136A), so daß eine eindeutige Zuordnung des Befundes nicht möglich war. Eine weitere Charakterisierung dieser Mutante erfolgte nicht. Darüber hinaus blieb ungeklärt, ob die für die Aktivität essentielle Phosphorylierung des Enzyms im Aktivierungsloop während der Expression erfolgte. Die sich daraus ergebenden Konsequenzen für die Eindeutigkeit bei der Zuordnung veränderter Eigenschaften wurden bereits zu Beginn des Kapitels 4 beschrieben.

Vor dem skizzierten Hintergrund erschien eine Mutagenesestudie an E91 von rC α sinnvoll. Es stellte sich die Frage, ob und inwieweit ein selektives Unterbinden der Salzbrücke zwischen E91 und K72 in Verbindung mit strukturellen Veränderungen und einem damit einhergehenden Einfluß auf die Aktivität des Enzyms steht. Damit war es das Ziel der entsprechenden Untersuchungen, die generelle Rolle der Salzbrücke in bezug auf die strukturelle Regulation der Aktivität von Proteinkinasen zu klären.

4.2.1 Die rC α E91-Mutanten zeigen eine instabile Bindung an PKI(5-24) in Gegenwart von ATP sowie drastisch verringerte Aktivitäten

Nach Mutagenese des C α -DNA-Fragmentes und Coexpression von rC α E91Q-His bzw. rC α E91A-His zusammen mit rC α in *E. coli* zeigt sich schon bei der Reinigung der Mutanten mittels der PKI(5-24)-Affinitätschromatographie eine im Vergleich zum Wildtyp stark eingeschränkte Stabilität der Bindung an das PKI(5-24)-Säulenmaterial in Gegenwart von ATP. Dieser Befund erweist sich bei rC α E91Q-His als stärker ausgeprägt als bei rC α E91A-His. Erklärungsansätze für diesen Befund werden weiter unten gegeben (siehe 4.2.3). Die Untersuchung der Präparate auf Aktivitätsbasis ergibt, daß rC α E91Q-His und rC α E91A-His unter für rC α -His optimalen Reaktionsbedingungen drastisch verringerte Aktivitäten von 10 bzw. 20 % der entsprechenden Wildtypaktivität aufweisen. Somit läßt sich die Intensität der Effekte auf Aktivitätsbasis mit der Intensität der Befunde bezüglich der Bindung an das PKI(5-24)-Material in Gegenwart von ATP korrelieren.

4.2.2 Die synergistische Bindung von PKI(5-24) und ATP an die rC α E91-Mutanten scheint beeinträchtigt

Die Untersuchung der Mutanten mittels RMA ermöglicht es, die Interaktion der Proteine mit PKI(5-24) und ATP eingehender zu analysieren. Aus den unter 3.2.3 erläuterten Gründen wird für die entsprechenden Messungen eine neue Auswertungsmethode entwickelt. Es zeigt sich, daß die Affinität von rC α E91A-His und rC α E91Q-His zu PKI(5-24) in Gegenwart von ATP im Vergleich zu rC α -His um den Faktor 30 bzw. 100 geringer ist. Die Affinität von rC α E91A-His und rC α E91Q-His zu PKI(5-24) ohne Gegenwart von ATP ist dagegen im Vergleich zu rC α -His nicht verändert bzw. nur geringfügig verringert. Eine drastische Verminderung der Affinität der mutierten Proteine zu PKI(5-24) ist also nur in Gegenwart von ATP zu verzeichnen. Darüber hinaus zeigt die ermittelte Dissoziationsgleichgewichtskonstante für ATP in Gegenwart

von PKI(5-24), daß rC α E91A-His in Relation zu rC α -His eine ca. um den Faktor 30 reduzierte Affinität zu dem Nukleotid aufweist. Diese Tatsache in Verbindung mit dem Befund, daß rC α E91A-His eine im Vergleich zu rC α -His um denselben Faktor verringerte Affinität zu PKI(5-24) in Gegenwart von ATP und eine unveränderte Affinität zu PKI(5-24) ohne Gegenwart von ATP aufweist, legt die folgende Vermutung nahe. Es ist denkbar, daß die verringerte Affinität von rC α E91A-His bezüglich der Bindung von PKI(5-24) in Gegenwart von ATP indirekt verursacht wird durch eine Abschwächung des Bindungs-Synergismus zwischen ATP und PKI(5-24) einhergehend mit einer verringerten Affinität des Proteins sowohl für ATP als auch für PKI(5-24) um denselben Faktor.

Der genannte Synergismus zeigt sich darin, daß bei gleichzeitigem Anbieten von PKI(5-24) und MgATP die Affinität jedes einzelnen Bindungspartners zu rC α sehr viel höher ist als in Gegenwart von lediglich einem der beiden Bindungspartner. Einhergehend damit wird eine induced fit-Bewegung des Enzyms von der sogenannten offenen zur geschlossenen Konformation (siehe 1.1.2) beobachtet, bei der die Anzahl der Interaktionen zwischen den Bindungspartnern steigt. Als Ursache für den Synergismus ist denkbar, daß MgATP und PKI(5-24) direkt miteinander interagieren und/oder beide Komponenten mit dem Protein wechselwirken und so die Affinität des jeweils anderen Bindungspartners erhöhen. Strukturelle Hinweise sind für jede der genannten Möglichkeiten zu finden (Bossemeyer *et al.*, 1993).

Die Annahme, daß bei rC α E91A-His eine Beeinflussung der Affinität zu PKI(5-24) in Gegenwart von ATP im Zusammenhang steht mit einer veränderten Affinität hinsichtlich der Bindung von ATP in Gegenwart von PKI(5-24), steht im Einklang mit Forschungsergebnissen von Cheng *et al.* (1998a). Mit diesen Daten wird ein Erklärungsansatz für den Mechanismus des Bindungs-Synergismus zwischen MgATP und PKI gegeben. Die Untersuchungen zeigen, daß in Lösung hauptsächlich die Bindung von MgATP für das Einnehmen einer mehr geschlossenen Konformation von rC α verantwortlich ist und dadurch die Bindung von PKI begünstigt wird. Ist die Bindung von MgATP nun wie im Falle von rC α E91A-His negativ beeinflusst, könnte evtl. auch eine davon abhängige Konformationsänderung des Proteins nicht optimal erfolgen, was möglicherweise letztendlich zu der verringerten Affinität des Proteins zu PKI(5-24) in Gegenwart von ATP führen würde. Es ist aber auch vorstellbar, daß diese verringerten Affinität des Proteins zu PKI(5-24) in Gegenwart von ATP dadurch hervorgerufen wird, daß die beeinträchtigte Bindung des Nukleotids an das Protein eine für den Synergismus essentielle Interaktion des Nukleotids mit dem Inhibitorpeptid nicht mehr favorisiert.

Für rC α E91Q-His wurde die Affinität zu ATP aus unter 3.2.3 angegebenen Gründen nicht bestimmt. Unter der Annahme, daß die genannte Hypothese auch für rC α E91Q-

His zutrifft, würde man für diese rC α -Mutante eine im Vergleich zu rC α -His ca. hundertfach verringerte Affinität für ATP erwarten.

4.2.3 Erklärungsansätze für die instabile Bindung der rC α E91-Mutanten an PKI(5-24) in Gegenwart von ATP

Die mittels RMA erhaltenen Daten lassen neben der Bestimmung der genannten Affinitäten zwar eine Vermutung über den Mechanismus zu, welcher letztlich für die verringerte Affinität der rC α E91-Mutanten bezüglich PKI(5-24) in Gegenwart von ATP verantwortlich ist. Die bei der Reinigung der rC α E91-Mutanten beobachtete Instabilität der Bindung an PKI(5-24) können sie jedoch nicht erklären. So ist die Affinität von rC α E91A-His gegenüber ATP in Gegenwart von PKI(5-24) zwar im Vergleich zu rC α -His stark verringert, jedoch wurde die PKI(5-24)-Affinitätschromatographie zur Reinigung der rC α E91-Mutanten in Gegenwart einer ATP-Konzentration von mindestens 400 μ M durchgeführt. Diese Konzentration des Nukleotids liegt um den Faktor 40 über der Dissoziationsgleichgewichtskonstanten von rC α E91A-His für ATP. Somit sollte zumindest bei dieser rC α E91-Mutante eine Limitierung der Bindung durch ATP ausgeschlossen sein. Im übrigen wären selbst bei einer limitierenden ATP-Konzentration nicht unbedingt Auswirkungen auf die Stabilität der Bindung zu erwarten, sondern lediglich im Vergleich zu rC α -His eine Verringerung der an das PKI(5-24)-Material gebundenen Menge an Protein. Entsprechend sollte das nicht gebundene Protein im Durchlauf und evtl. geringfügig in den ersten Waschfraktionen zu finden sein, nicht aber mehr in späteren Waschfraktionen. Die Tatsache, daß rC α E91A-His trotz Gegenwart einer weit über der Dissoziationsgleichgewichtskonstanten für ATP liegenden Konzentration des genannten Nukleotids bereits bei den Waschschritten von der Säule eluiert, ist möglicherweise mit einer im Vergleich zu rC α -His bezüglich der Bindung an PKI(5-24) in Gegenwart von ATP stark vergrößerten Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{diss}) dieser Mutante zu erklären. Der Anstieg dieser Konstante könnte auch zu der durch RMA ermittelten vergrößerten Dissoziationsgleichgewichtskonstante (K_D) bezüglich PKI(5-24) in Gegenwart von ATP beitragen (da $K_D = k_{\text{diss}}/k_{\text{ass}}$; siehe auch 2.4.11).

Sowohl die Reinigung als auch die Bindungsassays wurden in Gegenwart von Magnesiumkonzentrationen durchgeführt, bei denen davon ausgegangen wird, daß die essentielle Metallionenbindungsstelle von rC α mit hoher Wahrscheinlichkeit besetzt ist (Adams and Taylor, 1993b). Über die Affinität der rC α E91-Mutanten zu Magnesiumionen kann jedoch keine Aussage gemacht werden. Die Besetzung der essentiellen oder auch aktivierenden Metallionenbindungsstelle von rC α ist jedoch

absolut notwendig zur Bindung des Nukleotids. Sollte diese Wechselwirkung an der aktivierenden Metallionenbindungsstelle in irgendeiner Weise gestört sein, wäre es denkbar, daß dieser Faktor Einfluß auf die Stabilität des Komplexes aus Protein, MgATP und PKI(5-24) nimmt. Letztlich wäre es dann auch möglich, daß der oben beschriebene Effekt der Mutante bezüglich der Bindung von ATP in Gegenwart von PKI(5-24), der evtl. indirekt über den Bindungs-Synergismus Einfluß auf die Affinität zu PKI(5-24) nimmt, seinerseits bedingt ist durch eine Beeinträchtigung bei der Bindung des essentiellen Metallions.

4.2.4 Strukturelle Hinweise bei rC α E91A-His für eine beeinträchtigte ATP-Bindung

Durch das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Reinigungsverfahren, das es erlaubt, rC α -Mutanten, die der Coexpression mit dem Wildtypenzym bedürfen (siehe 2.4.1) und als His-tag-Fusionsproteine vorliegen, in homogener Phosphorylierungsstufe zu isolieren, war eine entscheidende Voraussetzung für eine Kristallisation von rC α E91A-His gegeben (siehe 2.4.2.4 bzw. 3.2.4.1).

Die erste strukturelle Analyse des Proteins im binären Komplex mit PKI(5-24) ergibt, daß es zu keinen großräumigen Veränderungen insbesondere der Helix C kommt, in deren Mitte E91 lokalisiert ist. Die positionelle und konformelle Beeinträchtigung der Helix C, die oftmals bei Strukturen inaktiver Proteinkinasen zu erkennen ist und in vielen Fällen mit einem Verlust der ionischen Interaktion zwischen E91 und K72 bzw. deren homologen Resten einhergeht, wird zu den strukturellen Modulationsmechanismen von Proteinkinasen allgemein gezählt (Engl and Bossemeyer, 2001). Aufgrund der vorliegenden Struktur von C α E91A-His wird deutlich, daß es umgekehrt aufgrund des alleinigen Unterbindens der Wechselwirkung zwischen E91 und K72 zu keiner Positionsveränderung der Helix C kommt. Die Aktivität des Proteins und sein Bindungsverhalten bezüglich MgATP und PKI(5-24) zeigen allerdings bei der kinetischen Charakterisierung eindeutige drastische Einschränkungen. Daher ist es wahrscheinlich, daß der Verlust bzw. die starke Verringerung der Aktivität im direkten Zusammenhang mit dem Unterbinden der Salzbrücke zwischen E91 und K72 steht. Während jedoch diese bzw. die entsprechend homologe ionische Interaktion in vielen Strukturen anderer inaktiver Proteinkinasen möglicherweise durch eine großräumige Bewegung der Helix C verhindert wird, wird derselbe Effekt bei der vorliegenden Struktur vermutlich durch den bloßen spezifischen Aminosäureaustausch erreicht.

Eine detaillierte Analyse der Struktur von rC α E91A-His im binären Komplex mit PKI(5-24) zeigt lokal sehr begrenzte Effekte, die hauptsächlich in Positionsveränderungen von Seitenketten in Relation zu vergleichbaren Strukturen des Wildtyp-Enzyms bestehen. Eine Analyse derartiger Bewegungen anhand der vorliegenden Struktur mit einer Auflösung von ca. 3,3 Å ist nur mit Vorsicht durchzuführen. Jedoch zeigen alle drei der analysierten Strukturen einer asymmetrischen Einheit dieselben im Folgenden beschriebenen Effekte (siehe 3.2.4.2). Darüber hinaus wurden diese Bewegungen im Laufe weiterer Untersuchungen durch eine weitere Struktur von rC α E91A-His (Rind) im binären Komplex mit PKI(5-24) mit einer verbesserten Auflösung von ca. 2,5 Å bestätigt.

Die erwähnten lokal begrenzten Effekte in der Struktur von rC α E91A-His im binären Komplex mit PKI(5-24) bieten Erklärungsmöglichkeiten für die drastisch reduzierte Aktivität dieser rC α -Mutante. Zunächst ist zu erkennen, daß bezüglich der Bindung des Inhibitorpeptides keine wesentlichen Veränderungen in Relation zu einer vergleichbaren Wildtyp-Struktur vorhanden sind. Dieser Befund steht im Einklang mit der aus den RMA-Daten gewonnenen Erkenntnis, daß diese Mutante im Vergleich zu rC α keine verringerte Affinität zu PKI(5-24) ohne Gegenwart von ATP zeigt. Die unmittelbare Bindung des Peptids an das Protein scheint also von der eingeführten Mutation unbeeinflusst zu sein. Dagegen ist im Bereich der ATP-Bindetasche in Relation zu vergleichbaren Strukturen des Wildtyp-Enzyms eine Positionsveränderung von essentiellen Resten zu beobachten. Hierbei handelt es sich um eine Aufeinanderzueinanderbewegung der Reste K72 und D184 um 0,7 - 0,8 Å, wobei eine Struktur der insgesamt drei in einer asymmetrischen Einheit vorliegenden im Zusammenhang damit zusätzlich eine Bewegung des Proteinrückgrates zeigt. Auch diese Rückgratbewegung ist in der oben genannten zweiten Struktur von rC α E91A-His mit der verbesserten Auflösung von ca. 2,5 Å erkennbar. Zur zusätzlichen Absicherung der beschriebenen Positionsveränderung von K72 und D184 wurde darüber hinaus die im Folgenden beschriebene Untersuchung gemacht. Die Software, die aus Elektronendichteverteilungen eine Struktur errechnet, berücksichtigt bei diesem Vorgang unterschiedliche Faktoren. Einer davon ist auch die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Aminosäureresten. Um einen Einfluß dieses Faktors auf die Interpretation der Elektronendichteverteilung beim Errechnen der vorliegenden Struktur zu hinterfragen, wurde auf Basis derselben Elektronendichteverteilung eine weitere Struktur errechnet, bei der die elektrostatische Anziehung zwischen K72 und D184 unberücksichtigt blieb. Auch bei dieser Art der Datenauswertung zeigt sich die Aufeinanderzueinanderbewegung von K72 und D184 im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Strukturen (Daten nicht gezeigt).

Ein Grund für die Aufeinanderzu-Bewegung der genannten Reste ist möglicherweise darin zu suchen, daß nach dem durch den Aminosäureaustausch verursachten Verlust des für K72 essentiellen "regulären" Interaktionspartners E91 nun aufgrund der elektrostatischen Anziehung eine Annäherung bzw. Wechselwirkung zwischen K72 und D184 forciert wird. Ein derart geringer Abstand zwischen den beiden essentiellen Resten K72 und D184 ist in keiner der bisher gelösten Strukturen von aktiven Proteinkinasen zu finden. Aufgrund dieser Tatsache ist es naheliegend, daß die beschriebene Bewegung Einfluß auf die Bindung des Nukleotids und damit auf die Aktivität des Enzyms hat. Zum einen ist durch die Positionsveränderung von K72 eine negative Beeinflussung der Interaktion des genannten Restes mit den Sauerstoffatomen der α - und β -Phosphorylgruppe des ATP-Moleküls denkbar (siehe Abb. 1.3). Zum anderen ist auch durch die Bewegung des für die Metallionen- bzw. Nukleotidbindung essentiellen Restes D184 ein Effekt zu erwarten. Es ist anzunehmen, daß sich dieser Effekt über das essentielle Metallion auf die Nukleotidbindung überträgt. Da allerdings in der vorliegenden Struktur des binären Komplexes von rC α E91A-His mit PKI(5-24) keine Daten über das essentielle Metallion enthalten sind, kann hierüber nur spekuliert werden. Es ist denkbar, daß das Metallion durch den positionsveränderten Rest D184 in einer für die Nukleotidbindung nicht mehr optimalen Position gebunden wird und so eine Verringerung der Affinität zwischen Nukleotid und Protein bewirkt wird. Dieses könnte aber alternativ oder zusätzlich auch durch eine Beeinträchtigung der Stabilität der Bindung des essentiellen Metallions an D184 verursacht werden. Als Grund dafür wäre z.B. eine Aufhebung der bidentaten Wechselwirkung des Restes mit dem Metallion zugunsten einer monodentaten Interaktion denkbar.

Die für die Struktur von rC α E91A-His beschriebenen Positionsveränderungen im Zusammenhang mit den beobachteten Effekten bezüglich der Bindung von MgATP könnten auch bei rC α E91Q-His so oder in ähnlicher Weise auftreten. Auch hier wird die Salzbrücke zwischen K72 und E91 durch die Mutation aufgehoben. Möglicherweise kommen sterische Einflüsse dadurch zum tragen, daß Q91 einerseits nicht die Fähigkeit zu einer ionischen Interaktion mit K72 hat wie der in der Wildtyp-Struktur vorhandene Rest E91 und andererseits größer ist als der Alaninrest bei rC α E91A-His. So könnte es zu einer verstärkenden Wirkung auf die beschriebene Positionsveränderung von K72 in Richtung D184 kommen. Letztlich könnte diese verstärkte Bewegung von K72 auch eine deutlichere Positionsveränderung von D184 zur Folge haben, was wiederum möglicherweise einen drastischeren Effekt auf die Bindung von MgATP hat als bei rC α E91A-His. Unter der Annahme, daß bei rC α E91Q-His - analog zu rC α E91A-His - der beobachtete Befund bezüglich der Bindung an

PKI(5-24) in Gegenwart von ATP ebenfalls durch einen Effekt bei der Bindung von MgATP hervorgerufen wird, könnten die beschriebenen strukturellen Befunde die stärkere Intensität der beobachteten kinetischen Effekte im Vergleich zu rC α E91A-His erklären.

Grundsätzlich stehen die beobachteten strukturellen Effekte bei rC α E91A-His im Einklang mit den aus den RMA-Daten gewonnenen Erkenntnissen. Auch in der Struktur zeigt sich eine weitestgehend unbeeinflusste Bindung des Inhibitorpeptides ohne Gegenwart von ATP, während die ATP-Bindetasche des Proteins Veränderungen aufweist, die die verringerte Affinität zu ATP erklären können. Allerdings bleibt auch nach Analyse dieser Daten offen, ob die verringerte Affinität für das Nukleotid durch eine veränderte Positionierung von K72 und/oder von D184 mit einer evtl. einhergehenden positionellen und/oder bezüglich der Stabilität veränderten Bindung des essentiellen Metallions hervorgerufen wird. Abgesehen davon kann keine Aussage bezüglich des molekularen Mechanismus gemacht werden, der evtl. im Rahmen eines gestörten Bindungssynergismus dazu führt, daß die verringerte Affinität des Proteins für ATP auch eine verringerte Affinität für das Inhibitorpeptid in Gegenwart des Nukleotids bewirkt.

Um diesbezüglich weitere Einblicke zu erhalten, wurde die Kristallisierung der rC α -Mutante im ternären Komplex forciert. Dies gelang Herrn Dr. S. Herrero (Abteilung Pathochemie, DKFZ Heidelberg). Daraus resultiert eine Struktur eines Komplexes aus rC α E91A, MnATP und PKI(5-24) mit einer Auflösung von ca. 2 Å. Interessanterweise scheinen erste Analysen dieser Struktur keine Bewegungen von K72 und D184 im Vergleich zur Struktur von C α (Schwein) im ternären Komplex mit MnAMP-PNP und PKI(5-24) zu zeigen. Für verlässliche Aussagen ist jedoch zunächst eine Verfeinerung der Struktur nötig. Sollte sich jedoch dieser Befund bestätigen, könnte das ein Hinweis darauf sein, daß der strukturelle Effekt an der ATP-Bindungstasche nur ohne die Gegenwart des Nukleotids zu erkennen ist und daß durch die Bindung von MgATP die Konformation des Wildtyp-Enzyms eingenommen wird. Unter diesen Umständen müßten die Strategien zur weiteren Untersuchung dieser rC α -Mutante darauf ausgerichtet werden (siehe 4.3).

4.2.5 Zusammenfassung und Schlußfolgerung

Der innerhalb der Proteinkinasefamilie invariante Aminosäurerest E91 von rC α ist in der Mitte der Helix C lokalisiert und interagiert mit dem für die Nukleotidbindung essentiellen Rest K72. Strukturen inaktiver Proteinkinasen zeigen oftmals eine

positionelle oder konformelle Beeinträchtigung der Helix C, die in vielen Fällen mit einem Verlust der Salzbrücke zwischen E91 und K72 bzw. den entsprechenden homologen Resten einhergeht (Engh and Bossemeyer, 2001). Damit ist das Fehlen dieser Salzbrücke ein Indikator für die Dislokation der Helix C.

Eine Unterbrechung der genannten Wechselwirkung durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Aminosäureaustausche führt bei rC α E91A-His zu keiner großräumigen Positionsveränderung der Helix C, sondern zu räumlich eng begrenzten Effekten. Gleichwohl zeigen die rC α E91-Mutanten drastisch verringerte Aktivitäten. Gleichzeitig weisen sie eine im Vergleich zu rC α -His stark beeinträchtigte Affinität bezüglich ATP und PKI(5-24) im ternären Komplex aus Protein, Nukleotid und Inhibitorpeptid auf. Dabei deutet sich bei rC α E91A-His an, daß die verminderte Affinität zu PKI(5-24) durch den Effekt hinsichtlich der Bindung des ATP hervorgerufen wird. Dieser wiederum scheint bedingt durch eine Positionsveränderung von K72 und/oder D184 in Relation zu vergleichbaren Wildtyp-Strukturen.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit wird der vermutete essentielle Einfluß der Interaktion zwischen K72 und E91 auf die Aktivität von rC α bestätigt. Es kann gezeigt werden, daß dieser Einfluß unabhängig von einer konformellen Beeinträchtigung der Helix C ist. Darüber hinaus ergeben sich Hinweise auf den molekularen Mechanismus, durch den der genannte Einfluß auf die Aktivität zustande kommt.

Darüber hinaus legen die am Modell von rC α gewonnenen Erkenntnisse Schlüsse hinsichtlich der generellen strukturellen Regulation von Proteinkinasen nahe. Der Befund, daß in vielen Strukturen inaktiver Proteinkinasen eine Dislokation der Helix C mit einem Fehlen der Salzbrücke zwischen den zu K72 und E91 von rC α homologen Resten einhergeht, ist dahingehend zu bewerten, daß das Fehlen der entsprechenden Salzbrücke einen essentiellen Anteil an der Inaktivität von Proteinkinasen hat und nicht lediglich als eine bloße Folgeerscheinung der Positionsveränderung von Helix C einzuschätzen ist. Trotz des Fehlens der ionischen Interaktion zwischen E91 und K72 ist bei den entsprechenden rC α E91-Mutanten zwar eine stark verringerte aber doch meßbare Aktivität zu verzeichnen. Dies steht im Einklang mit dem Befund, daß zur Regulation von Proteinkinase-Aktivität in der Zelle immer mehrere Mechanismen gleichzeitig greifen, um eine völlige Regulation zu gewährleisten.

Der Salzbrücke zwischen den zu K72 und E91 von rC α homologen Resten dürfte somit eine essentielle Rolle bei einem generell bei Proteinkinasen verwirklichten strukturellen Modulationsmechanismus zukommen. Mit dem Wissen um den Angriffspunkt dieses strukturellen Modulationsmechanismus ist hier möglicherweise auch ein therapeutischer Ansatz gegeben (siehe Ausblick).

4.3 Ausblick

Die Proteinkinase A (PKA) übernimmt zum einen eine bedeutende Rolle bezüglich der Signaltransduktion eukaryotischer Zellen. Zum anderen fungiert dieses Enzym aus verschiedenen Gründen als Modellprotein für die gesamte Familie der Proteinkinasen. Fehlfunktionen der Mitglieder dieser Enzymfamilie führen oftmals zu unkontrolliertem Zellwachstum (Bishop, 1987; Pawson and Hunter, 1994).

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse könnten daraufhindeuten, daß der Phenylalaninrest des konservierten DFG-Motivs eine Rolle hinsichtlich der Regulation von Proteinkinasen übernimmt. Darüber hinaus wird deutlich, daß ein essentieller Anteil der Interaktion zwischen den zu K72 und E91 von rC α homologen Resten an einem generell bei Proteinkinasen verwirklichten strukturellen Regulationsmechanismus naheliegend ist. Vor diesem Hintergrund sind weitere Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet wünschenswert, da das Wissen um die Angriffspunkte genereller struktureller Regulationsmechanismen von Proteinkinasen die Möglichkeit zur Entwicklung von entsprechenden Inhibitoren bietet. Eine Spezifität dieser Inhibitoren kann dabei z.B. dadurch erreicht werden, daß Sequenzunterschiede von Proteinkinasen im Bereich der ATP-Bindungstasche ausgenutzt werden. Ein Beispiel für einen derartigen Inhibitor ist STI-571 (Novartis compound CGP 57148). Dieses Molekül weist eine hohe Spezifität auf. Es bindet hochaffin an die Abelson Tyrosinkinase (Abl), während S/T-Proteinkinasen und die meisten anderen Y-Proteinkinasen unbeeinflusst bleiben. Die Wirkung entsteht scheinbar dadurch, daß es das Abl-Enzym bindet, wenn dieses in einer inaktiven Konformation vorliegt. Diese inaktive Konformation wird möglicherweise aufgrund struktureller autoinhibitorischer Regulationsmechanismen eingenommen, die die aktivierende Phosphorylierung und die Konformation des Aktivierungssegmentes und des DFG-Motivs umfassen (Schindler *et al.*, 2000). Der Anwendungsbereich von STI-571 liegt in der Krebstherapie. Die Substanz wird unter dem Namen Gleevec mit großem Erfolg gegen die Chronische Myeloide Leukämie (CML) eingesetzt, da bei dieser Krebsart die abnormale Bcr-Abl-Tyrosinkinase eine essentielle Rolle spielt.

Im Rahmen zukünftiger Untersuchungen wären weitere Mutagenesestudien an hoch konservierten oder gar invarianten Resten des katalytischen Zentrums denkbar. Dabei könnte die bereits im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Methode der Coexpression zur Sicherstellung der essentiellen aktivierenden Phosphorylierung der Mutanten verwendet werden (Girod *et al.*, 1996). Auf diese Weise wäre eine Charakterisierung auch stark in ihrer Aktivität beeinträchtigter Mutanten möglich, ohne daß der eigentliche Effekt der Mutation durch den Effekt einer fehlenden aktivierenden Phosphorylierung beeinflusst wird. Im Anschluß an die Expression der Mutanten könnten die im Rahmen

dieser Arbeit entwickelten bzw. etablierten Methoden wertvolle Hilfsmittel darstellen. So ist mittels des RMA-basierten automatisierten Bindungsassays zum einen die Möglichkeit gegeben, die Mutanten bezüglich ihrer Interaktion mit Bindungspartnern wie ATP und PKI(5-24) zu charakterisieren. Daneben sind mit dieser Methode aber auch Untersuchungen hinsichtlich der Affinität zu Metallionen sowie Kompletionsassays zur Bestimmung von inhibitorischen Konstanten anderer Inhibitoren denkbar. Zum anderen ist durch die erarbeiteten Methoden zur Reinigung bzw. zur Trennung nach Phosphorylierungsstufen von sowohl His-tag-tragenden als auch nicht His-tag-tragenden rC α -Mutanten die Basis geschaffen, um die Kristallisierung dieser Proteine zu ermöglichen. Damit ist eine wesentliche Voraussetzung gegeben, eine Fülle struktureller Informationen über die untersuchten Mutanten zu erhalten.

Wie die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse zeigen, muß die Funktion von F185 von rC α neu überdacht werden. Die postulierte Rolle beim Einfluß auf die Positionierung von D184 und auf die Konformationsflexibilität kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die Einschränkung bzw. Vergrößerung der Konformationsflexibilität im Bereich der Aminosäure 185 durch die durchgeführten Aminosäureaustausche scheint allerdings aufgrund der überaus großen Flexibilität des Proteins in diesem Bereich bisher nicht gelungen. Denkbar wäre hier die Herstellung von Mehrfachmutanten. Potentielle Aminosäurereste für die Austausche wären die im Rahmen dieser Arbeit aufgezeigten van der Waals-Interaktionspartner des jeweiligen Restes 185 bei rC α F185L und rC α F185W. Vielleicht ist es sowohl durch das Austauschen mehrerer kleiner hydrophober Reste gegen große als auch durch die umgekehrte Vorgehensweise möglich, Einfluß auf die Konformationsflexibilität des Proteins zu nehmen. Hierdurch wären evtl. zum einen doch noch Informationen darüber zu erhalten, in wieweit die Funktion von F185 in Zusammenhang mit der Konformationsflexibilität steht. Zum anderen wären damit vielleicht auch Einblicke in die Funktion der anderen ausgetauschten Reste bzw. in die Funktion des hochflexiblen hydrophoben Gesamtgefüges und in dessen Kompensationsfähigkeit bezüglich des Einfügens größerer oder kleinerer Aminosäurereste zu erlangen.

Daneben wäre denkbar, die Auswirkungen des Austausches F185G als drastischsten konservativen Aminosäureaustausch bezüglich der Größe des Restes an Position 185 zu analysieren. Aber auch das Einfügen von polaren Aminosäuren an dieser Stelle könnte evtl. Aufschlüsse über die Notwendigkeit des hydrophoben Charakters von F185 geben.

Hinsichtlich weiterer Untersuchungen der rC α E91-Mutanten wäre eine intensivere Analyse der Bindung dieser Mutanten an das Inhibitorpeptid PKI(5-24) in Gegenwart von ATP mit Hilfe der RMA anzustreben. Hier wäre eine verbesserte

Auswertungssoftware wünschenswert, die es letztlich erlaubt, neben den bisher bestimmten Dissoziationsgleichgewichtskonstanten auch die entsprechenden Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten zu bestimmen. So könnte ggf. die eingeschränkte Stabilität der Komplexe dieser Mutanten mit PKI(5-24) und ATP näher charakterisiert werden.

Um weitere Einblicke im Hinblick auf die vermutete veränderte synergistische Bindung von PKI(5-24) und MgATP bei den rC α E91-Mutanten zu erhalten, wäre es denkbar, die möglicherweise mit dem Bindungssynergismus einhergehenden Konformationsänderungen der Mutanten vergleichend zum Wildtyp mittels einer Protein-Footprinting-Technik zu untersuchen wie sie bereits von Cheng *et al.* in anderem Zusammenhang angewandt wurde (Cheng *et al.*, 1998).

Um den Anteil der in der Kristallstruktur von rC α E91A-His im binären Komplex mit PKI(5-24) beobachteten Positionsveränderungen von K72 und D184 an der beeinträchtigen Affinität des Proteins zu ATP zu hinterfragen, könnten Untersuchungen zur Bestimmung der Dissoziationsgleichgewichtskonstanten für AMP und ADP ggf. auch in Gegenwart von PKI(5-24) angestellt werden. Diese Untersuchungen wären z.B. in Form von Gleichgewichtsdialyseexperimenten oder RMA-basierten Kompetitionsassays möglich. Sollte der Schwerpunkt des Effektes durch die Positionsveränderung von K72 bewirkt werden, so könnte auch die Bindung von ADP und AMP beeinträchtigt sein. Sollte dagegen die Bewegung von D184 bei der verringerten Affinität des Proteins bezüglich ATP eine Rolle spielen, so ist die Bindung von ADP und AMP davon möglicherweise weitgehend unbeeinflusst (siehe Abb. 1.3). Darüber hinaus wären im Falle der Annahme, daß die Positionsveränderung von D184 eine wesentliche Rolle bezüglich der verringerten Affinität von rC α E91A-His zu ATP in Gegenwart von PKI(5-24) einnimmt, Experimente zur Metallionenabhängigkeit der Bindung zwischen Mutante, ATP und PKI(5-24) denkbar. Hierdurch wäre evtl. möglich, Informationen darüber zu gewinnen, ob die Stabilität der Bindung des essentiellen Metallions durch die Positionsveränderung von D184 bei rC α E91A-His beeinflusst wird. Schließlich ist eine Verfeinerung und detaillierte Auswertung der bereits gelösten Struktur von rC α E91A im ternären Komplex mit MnATP und PKI(5-24) (siehe 4.2.4) nötig, um evtl. weitere Einblicke in die Struktur dieser Mutante zu erhalten. Daneben wäre eine weitere Strategie, die Kristallisierung der Mutante rC α E91Q voranzutreiben. Dazu müßte zunächst die Ausbeute bei der Reinigung dieses Proteins deutlich verbessert werden. Eine Struktur dieser Mutante im binären Komplex mit PKI(5-24) könnte daraufhin untersucht werden, ob ähnliche Effekte wie bereits bei rC α E91A-His beobachtet für die stark verringerte Affinität dieser Mutante gegenüber MgATP und PKI(5-24) im ternären Komplex in Frage kommen. Darüber hinaus wäre natürlich von

Interesse, durch welche strukturellen Veränderungen die genannten Befunde stärker in Erscheinung treten als bei rC α E91A-His.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Proteinkinasen spielen hinsichtlich eukaryotischer intrazellulärer Kommunikation, Regulation und Signaltransduktion eine zentrale Rolle. Fehlfunktionen der Mitglieder dieser Enzymfamilie führen oftmals zu unkontrolliertem Zellwachstum (Bishop, 1987; Pawson and Hunter, 1994). Die Proteinkinase A (PKA) dient als Modell für die gesamte Enzymfamilie.

Ziel dieser Arbeit war es, Hinweise auf die Funktion der konservierten Aminosäurereste Phenylalanin 185 und Glutamat 91 der katalytischen Untereinheit C α von PKA zu erhalten. Dazu wurden Methoden etabliert und entwickelt, die eine kinetische und strukturelle Charakterisierung entsprechender Mutanten ermöglichten.

Der Rest Phenylalanin 185 ist Bestandteil des hochkonservierten DFG-Motivs, welches den Anfang des Aktivierungssegmentes von Proteinkinasen markiert. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß die hohe Konserviertheit des Phenylalaninrestes möglicherweise nicht allein durch eine essentielle Funktion bei der Katalyse bedingt ist. Darüber hinaus geben sie Hinweise für eine hohe Konformationsflexibilität im Bereich von F185. Strukturen der inaktiven cytoplasmatischen Proteinkinase-Domäne des Insulinrezeptors (IRK) (Hubbard *et al.*, 1994), der inaktiven katalytischen Domäne der Abelson Tyrosinkinase (Abl) (Schindler *et al.*, 2000) sowie der MAP-Kinase p38 (persönliche Mitteilung Dr. D. Bossemeyer) zeigen Positionsveränderungen des entsprechenden Phenylalaninrestes, die anscheinend essentiellen Anteil an der Inaktivität haben und konformelle Flexibilität erfordern. Vor diesem Hintergrund unterstützen die durch diese Arbeit gewonnenen Erkenntnisse die Möglichkeit, daß der Phenylalaninrest des DFG-Motivs eine generelle regulatorische Funktion bei Proteinkinasen übernimmt.

Der invariante Aminosäurerest Glutamat 91 ist in der Mitte der Helix C lokalisiert und interagiert mit dem ebenfalls invarianten und für die Nukleotidbindung essentiellen Rest Lysin 72. Strukturen inaktiver Proteinkinasen zeigen oftmals eine positionelle oder konformelle Beeinträchtigung der Helix C, die in vielen Fällen mit einem Verlust der Salzbrücke zwischen E91 und K72 bzw. den entsprechenden homologen Resten einhergeht (Engh and Bossemeyer, 2001). Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, daß der Verlust der genannten Interaktion zwar keine Dislokation der Helix C, jedoch eine drastisch eingeschränkte Aktivität bewirkt. Darüber hinaus ergeben sich Hinweise auf den molekularen Mechanismus, durch den die Aktivität beeinflusst wird. Die Erkenntnisse legen damit nahe, daß dem invarianten Glutamatrest eine essentielle Rolle bei einem generell bei Proteinkinasen verwirklichten strukturellen Regulationsmechanismus zukommt.

Die Resultate insgesamt liefern Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer therapeutisch wirksamer Inhibitoren.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, J. A., and Taylor, S. S. (1992);** Energetic limits of phosphotransfer in the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase as measured by viscosity experiments; *Biochemistry* **31**, 8516 - 8522
- Adams, J. A., and Taylor, S. S. (1993a);** Phosphorylation of peptide substrates for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase; *J. Biol. Chem.* **268**, 7747 - 7752
- Adams, J. A., and Taylor, S. S. (1993b);** Divalent metal ions influence catalysis and active-site accessibility in the cAMP-dependent protein kinase; *Protein Sci.* **2**, 2177 - 2186
- Adams, J. A., McGlone, M. L., Gibson, R., and Taylor, S. S. (1995);** Phosphorylation modulates catalytic function and regulation in the cAMP-dependent protein kinase; *Biochemistry* **34**, 2447 - 2454
- Aimes, R. T., Hemmer, W., and Taylor, S. S. (2000);** Serine-53 at the tip of the glycine-rich loop of cAMP-dependent protein kinase: role in catalysis, P-site specificity, and interaction with inhibitors; *Biochemistry* **39**, 8325 - 8332
- Baude, E. J., Dignam, S. S., Olsen, S. R., Reimann, E. M., and Uhler, M. D. (1994a);** Glutamic acid 203 of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit participates in the inhibition by two isoforms of the protein kinase inhibitor; *J. Biol. Chem.* **269**, 2316 - 2323
- Baude, E. J., Dignam, S. S., Reimann, E. M., and Uhler, M. D. (1994b);** Evidence for the importance of hydrophobic residues in the interactions between the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit and the protein kinase inhibitor; *J. Biol. Chem.* **269**, 18128 - 18133
- Beebe, S. J., Oyen, O., Sandberg, M., Froysa, A., Hansson, V., and Jahnsen, T. (1990);** Molecular cloning of a tissue-specific protein kinase (C γ) from human testis - representing a third isoform for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase; *Mol. Endocrinol.* **4**, 465 - 475
- Bishop, J. M. (1987);** The Molecular Genetics of Cancer; *Science* **235**, 305 - 311
- Boehr, D. D., Thompson, P. R., and Wright, G. D. (2001);** Molecular Mechanism of Aminoglycoside Antibiotic Kinase APH(3')-IIIa; *J. Biol. Chem.* **276**, 23929 - 23936
- Boshart, M., Weih, F., Nichols, M., and Schutz, G. (1991);** The tissue-specific extinguisher locus TSE1 encodes a regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase; *Cell* **66**, 849 - 859
- Bossemeyer, D. (1994);** The glycine-rich sequence of protein kinases, a multifunctional element; *Trends Biochem. Sci.* **19**, 201 - 205

- Bossemeyer, D., Engh, R. A., Kinzel, V., Ponstingl, H., and Huber, R. (1993);** Phosphotransferase and substrate binding mechanism of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from porcine heart as deduced from the 2.0 Å structure of the complex with Mn²⁺ adenylyl imidodiphosphate and inhibitor peptide PKI(5-24); *EMBO J.* **12**, 849 - 859
- Bradford, M. M. (1976);** Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *Anal. Biochem.* **72**, 248 - 254
- Brindle, P., Nakajima, T., and Mountminy, M. (1995);** Multiple protein kinase A-regulated events are requested for transcriptional induction by cAMP; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10521 - 10525
- Buckle, P. E., Davies, R. D., Kinning, T., Yeung, D., Edwards, P. R., Pollard-Knight, D., and Lowe, C. R. (1993);** The Resonant Mirror: a novel optical biosensor for Direct Sensing of Biomolecular Interactions Part II: applications; *Biosensors Bioelectronics* **8**, 365 - 370
- Cadd, G. G., Uhler, M. D., and McKnight, G. S. (1990);** Holoenzymes of cAMP-dependent protein kinase containing the neural form of type I regulatory subunit have an increased sensitivity to cyclic nucleotides; *J. Biol. Chem.* **265**, 19502 - 19506
- Carrera, A. C., Borlado, L. R., Roberts, T. M., and Martinez, C. A. (1994);** Tyrosine kinase specific motif at subdomain VIII does not confer specificity for tyrosine; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 1114 - 1120
- Cheng, X., Ma, Y., Moore, M., Hemmings, B. A., and Taylor, S. S. (1998b);** Phosphorylation and activation of cAMP-dependent protein kinase by phosphoinositide-dependent protein kinase; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9849 - 9854
- Cheng, X., Shaltiel, S., and Taylor, S. S. (1998a);** Mapping Substrate-Induced Conformational Changes in cAMP-dependent Protein Kinase by Protein Footprinting; *Biochemistry* **37**, 14005 - 14013
- Chestukhin, A., Litovchick, L., Schourov, D., Cox, S., Taylor, S. S., and Shaltiel, S. (1996);** Functional malleability of the carboxyl-terminal tail in protein kinase A; *J. Biol. Chem.* **271**, 10175 - 10182
- Clegg, C. H., Cadd, G. G., and McKnight, G. S. (1988);** Genetic characterization of a brain-specific form of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3703 - 3707
- Cook, P. F., Neville, M. E. Jr., Vrana, K. E., Hartl, F. T., and Roskoski, R. Jr. (1982);** Adenosine cyclic 3',5'-monophosphate dependent protein kinase: kinetic mechanism for the bovine skeletal muscle catalytic subunit; *Biochemistry* **21**, 5794 - 5799

- Cox, S., and Taylor, S. S. (1994);** Holoenzyme interaction sites in the cAMP-dependent protein kinase. Histidine 87 in the catalytic subunit complements serine 99 in the type I regulatory subunit; *J. Biol. Chem.* **269**, 22614 - 22622
- Cox, S., and Taylor, S. S. (1995);** Kinetic analysis of cAMP-dependent protein kinase: mutations at histidine 87 affect peptide binding and pH dependence; *Biochemistry* **34**, 16203 - 16209
- Cush, R., Cronin J. M., Stewart W. J., Maule, C. H., Molloy, J., and Goddard N. J. (1993);** The Resonant Mirror: a novel optical biosensor for Direct Sensing of Biomolecular Interactions Part I: principle of Operation and Associated Instrumentation; *Biosensors Bioelectronics* **8**, 347 - 364
- Dasgupta, S., Iyer, G. H., Bryant, S. H., Lawrence, C. E., and Bell, J. A. (1997);** Extent and nature of contacts between protein molecules in crystal lattices and between subunits of protein oligomers; *Proteins* **28**, 494 - 514
- Douville, E., Duncan, P., Abraham, N., and Bell, J. C. (1994);** Dual specificity kinases - an new family of signal transducers; *Cancer and Metastasis Reviews* **13**, 1 - 7
- Edwards, P. R., Gill, A., Pollard-Knight, D. V., Hoare, M., Buckle, P. E., Lowe, P. A., and Leatherbarrow, R. J. (1995);** Kinetics of Protein-Protein Interactions at the Surface of an Optical Biosensor; *Anal. Biochem.* **231**, 210 - 217
- Engh, R. A., and Bossemeyer, D. (2001);** The protein kinase activity modulation sites: mechanisms for cellular regulation - targets for therapeutic intervention; *Advan. Enzyme Regul.* **41**, 121 - 149
- Fantozzi, D. A., Harootunian, A. T., Wen, W., Taylor, S. S., Feramisco, J. R., Tsien, R. Y., and Meinkoth, J. L. (1994);** Thermostable inhibitor of cAMP-dependent protein kinase enhances the rate of export of the kinase catalytic subunit from the nucleus; *J. Biol. Chem.* **269**, 2676 - 2686
- Faux, M. C., and Scott, J. D. (1996);** Molecular Glue - Kinase Anchoring and Scaffold Proteins; *Cell* **85**, 9 - 12
- Fischer, E. H. (1983);** Cellular regulation by protein phosphorylation; *Bull. Instit. Pasteur* **81**, 7 - 31
- Fischer, E. H., and Krebs, E. G. (1955);** Conversion of phosphorylase-b to phosphorylase-a in muscle extracts; *J. Biol. Chem.* **216**, 121 - 132
- Fischer, E. H., and Krebs, E. G. (1956);** The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle; *Biochim. Biophys. Acta* **20**, 150 - 157
- Gangal, M., Clifford, T., Deich, J., Cheng, X., Taylor, S. S., and Johnson, D. A. (1999);** Mobilization of the A-kinase-N-myristate through an isoform-specific intermolecular switch; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 12394 - 12399
- Gibbs, C. S., and Zoller, M. J. (1991a);** Identification of electrostatic interactions that determine the phosphorylation site specificity of the cAMP-dependent protein kinase; *Biochemistry* **30**, 5329 - 5334

- Gibbs, C. S., and Zoller, M. J. (1991b)**; Rational scanning mutagenesis of a protein kinase identifies functional regions involved in catalysis and substrate interactions; *J. Biol. Chem.* **266**, 8923 - 8931
- Gibbs, C. S., Knighton, D. R., Sowadski, J. M., Taylor, S. S., and Zoller, M. J. (1992)**; Systematic mutational analysis of cAMP-dependent protein kinase identifies unregulated catalytic subunits and defines regions important for recognition of the regulatory subunit; *J. Biol. Chem.* **267**, 4806 - 4814
- Gibson, R. M., and Taylor, S. S. (1997)**; Dissecting the cooperative reassociation of the regulatory and catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinase. Role of Trp-196 in the catalytic subunit; *J. Biol. Chem.* **272**, 31998 - 32005
- Gibson, R. M., Yi-Buechler, J., and Taylor, S. S. (1997a)**; Identification of electrostatic interaction sites between the regulatory and catalytic subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase; *Protein Sci.* **6**, 1825 - 1834
- Gibson, R. M., Yi-Buechler, J., and Taylor, S. S. (1997b)**; Interaction of the Regulatory and Catalytic Subunits of cAMP-dependent Protein Kinase, Electrostatic Sites on the Type I α Regulatory Subunit; *J. Biol. Chem.* **272**, 16343 - 16350
- Gill, G. N., and Garren, L. D. (1969)**; On the mechanism of action of adrenocorticotrophic hormone: the binding of cyclic-3',5'-adenosine monophosphate to adrenal cortical protein; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **63**, 512 - 519
- Girod, A. (1997)**; Untersuchungen zum molekularen Wirkungsmechanismus von Proteinkinasen am Modell der katalytischen Untereinheit C α der Proteinkinase A; Dissertation, Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld, 1997
- Girod, A., Kinzel, V., and Bossemeyer, D. (1996)**; In vivo activation of recombinant cAPK catalytic subunit active site mutants by coexpression of the wild-type enzyme, evidence for intermolecular cotranslational phosphorylation; *FEBS Lett.* **391**, 121 - 125
- Gjertsen, B. T., and Doskeland, S. O. (1995)**; Protein phosphorylation in apoptosis; *Biochim. Biophys. Acta* **1269**, 187 - 199
- Glass, D. B., Masaracchia, R. A., Feramisco, J. R., and Kemp, B. E. (1978)**; Isolation of phosphorylated peptides and proteins on ion exchange papers; *Anal. Biochem.* **87**, 566 - 575
- Grant, B. D., and Adams, J. A. (1996)**; Pre-steady state kinetic analysis of cAMP-dependent protein kinase using rapid quench flow techniques; *Biochemistry* **35**, 2022 - 2029
- Grant, B. D., Hemmer, W., Tsigelny, I., Adams, J. A., and Taylor, S. S. (1998)**; Kinetic analysis of mutations in the glycine-rich loop of cAMP-dependent protein kinase; *Biochemistry* **37**, 7708 - 7715

- Grieco, D., Awedimento, E. V., and Gottesman, M. E. (1994);** A role for cAMP-dependent protein kinase in early embryonic divisions; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9896 - 9900
- Guthrie, C. R., Skalhegg, B. S., and McKnight, G. S. (1997);** Two novel brain-specific splice variants of the murine Cbeta gene of cAMP-dependent protein kinase; *J. Biol. Chem.* **272**, 29560 - 29565
- Hanahan, D. J. (1983);** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids; *Mol. Biol.* **166**, 557-580
- Hanks, S. K., Quinn, A. M. (1991);** Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members; *Methods Enzymol.* **200**, 38 - 81
- Hanks, S. K., Quinn, A. M., and Hunter, T. (1988);** The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains; *Science* **241**, 42 - 52
- Hemmer, W., McGlone, M., Tsigelny, I., and Taylor, S. S. (1997);** Role of the glycine triad in the ATP-binding site of cAMP-dependent protein kinase; *J. Biol. Chem.* **272**, 16946 - 16954
- Herberg, F. W., and Taylor, S. S. (1993);** Physiological inhibitors of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase: effect of MgATP on protein-protein interactions; *Biochemistry* **32**, 14015 - 14022
- Herberg, F. W., Bell, S. M., and Taylor, S. S. (1993);** Expression of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli*: multiple isoenzymes reflect different phosphorylation states; *Protein Eng.* **6**, 771 - 777
- Herberg, F. W., Doyle, M. L., Cox, S., and Taylor, S. S. (1999);** Dissection of the Nucleotide and Metal-Phosphate Binding Sites in cAMP-dependent Protein Kinase; *Biochemistry* **38**, 6352 - 6360
- Holland, P. M., and Cooper, J. A. (1999);** Protein modification: Docking sites for kinases; *Current Biology* **9**, R329 - R331
- Huang, C.-Y., Yuan, C.-J., Luo, S., and Graves, D. J. (1994);** Mutational analysis of the metal ion and substrate binding site of phosphorylase kinase γ subunit; *Biochemistry* **33**, 5877 - 5883
- Hubbard, S. R., and Till, H. (2000);** Protein Tyrosine Kinase Structure And Function; *Annu Rev Biochem* **69**, 373 - 398
- Hubbard, S. R., Wie, L., Ellis, L., and Hendrickson, W. A. (1994);** Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor, *Nature* **372**, 746 - 754
- Hunter, T. (1995);** Protein Kinases and Phosphatases - The Yin and Yang of Protein Phosphorylation and Signaling; *Cell* **80**, 225 - 236

- Iwami, G., Kawabe, J.-I., Ebina, T., Cannon, P. J., Homcy, C. J., and Ishikawa, Y. (1995); Regulation of adenylyl cyclase by protein kinase A; *J. Biol. Chem.* **270**, 12481 - 12484
- Jahnsen, T., Hedin, L., Kidd, V. J., Beattie, W. G., Lohmann, S. M., Walter, V., Durica, J., Schulz, T. Z., Schlitz, E., Browner, M., *et al.* (1986); Molecular cloning, cDNA structure, and regulation of the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase from rat ovarian granulosa cells; *J. Biol. Chem.* **261**, 12352 - 12361
- James, G., and Olson, E. N. (1990); Fatty acylated proteins as components of intracellular signaling pathways; *Biochemistry* **29**, 2623 - 2634
- Jedrzejewski, P. T., Girod, A., Tholey, A., König, N., Thullner, S., Kinzel, V., and Bossemeyer, D. (1998); A conserved deamidation site at Asn 2 in the catalytic subunit of mammalian cAMP-dependent protein kinase detected by capillary LC-MS and tandem mass spectrometry; *Protein Sci.* **7**, 457 - 469
- Jelesarov, I. and Bosshard, H. R. (1999); Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition; *J. Mol. Recognit.* **12**, 3 - 18
- Johnson, L. N., Noble, M., and Owen, D. J. (1996); Active and Inactive Protein Kinases - Structural Basis for Regulation; *Cell* **85**, 149 - 158
- Jung, S., Hoffmann, R., Rodriguez, P. H., Mutzel, R., and Hofer, H. W. (1995); The catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase from *Ascaris suum*. The cloning and structure of a novel subtype of protein kinase A; *Eur. J. Biochem.* **232**, 111 - 117
- Kemp, B. E., and Pearson, R. B. (1991); Intrasteric regulation of protein kinases and phosphatases, *Biochim. Biophys. Acta* **1094**, 67 - 76
- Kemp, B. E., Graves, D. J., Benjamini, E., Krebs, E. G. (1977); Role of Multiple Basic Residues in Determining the Substrate Specificity of cyclic AMP-dependent Protein Kinase; *J. Biol. Chem.* **252**, 4888 - 4894
- Klauk, T. M., Faux, M. C., Labudda, K., Langeberg, L. K., Jaken, S., and Scott, J. D. (1996); Coordination of three signaling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein; *Science* **271**, 1589 - 1592
- Knighton, D. R., Bell, S. M., Zheng, J. H., Teneyck, L. F., Xuong, N. H., Taylor, S. S., and Sowadski, J. M. (1993); 2.0-angstrom refined crystal-structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with a peptide inhibitor and detergent; *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **49**, 357
- Knighton, D. R., Zheng, J. H., Ten-Eyck, L. F., Ashford, V. A., Xuong, N. H., Taylor, S. S., and Sowadski, J. M. (1991a); Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic monophosphate-dependent protein kinase; *Science* **253**, 407 - 414

- Knighton, D. R., Zheng, J. H., Ten-Eyck, L. F., Xuong, N. H., Taylor, S. S., and Sowadski, J. M. (1991b)**; Structure of a peptide inhibitor bound to catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase; *Science* **253**, 414 - 420
- Kong, C., and Cook, P. F. (1988)**; Isotope partitioning in the adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinase indicates a steady-state random kinetic mechanism; *Biochemistry* **27**, 4795 - 4799
- Krebs, E. G. (1985)**; The phosphorylation of proteins: a major mechanism for biological regulation; *Biochem. Soc. Trans.* **13**, 813 - 820
- Krebs, E. G. (1989)**; The Albert Lasker Medical Award. Role of the catalytic cAMP-dependent protein kinase in signal transduction; *JAMA* **262**, 1815 - 1818
- Krupinski, J. (1991)**; The adenylyl cyclase family; *Mol. Cell. Biochem.* **104**, 73 - 79
- Laemmli, U. K. (1970)**; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; *Nature* **227**, 680 - 685
- Laemmli, U. K. and Favre, M. (1973)**; Maturation of the head of the bacteriophage T4. I. DNA packing events; *J. Mol. Biol.* **80**, 575 - 599
- Lee, D. C., Carmichael, D. F., Krebs, E. G., and McKnight, G. S. (1983)**; Isolation of a cDNA Clone for the Type I Regulatory Subunit of Bovine cAMP-Dependent Protein Kinase; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 3608 - 3612
- Lew, J., Taylor, S. S., and Adams, J. A. (1997)**; Identification of a partially rate-determining step in the catalytic mechanism of cAMP-dependent protein kinase; *Biochemistry* **36**, 6717 - 6724
- Lew, J., Coruh, N., Tsigelny, I., Garrod, S., and Taylor, S. S. (1996)**; Synergistic Binding of Nucleotides and Inhibitors to cAMP-dependent Protein Kinase Examined by Acrylodan Fluorescence Spectroscopy; *J. Biol. Chem.* **272**, 1506 - 1513
- Madhusudan, Trafny, E. A., Xuong, N. H., Adams, J. A., Ten Eyck, L. F., Taylor, S. S., and Sowadski, J. M. (1994)**; cAMP-dependent protein kinase: Crystallographic insights into substrate recognition and phosphotransfer; *Protein Sci.* **3**, 176 - 187
- Maeda, T., Watanabe, Y., Kunitomo, H., and Yamamoto, M. (1994)**; Cloning of the PKA1 gene encoding the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*; *J. Biol. Chem.* **269**, 9632 - 9637
- Melendez, A., Li, W., and Kalderon, D. (1995)**; Activity, expression and function of a second *Drosophila* protein kinase A catalytic subunit gene; *Genetics* **141**, 1507 - 1520
- Mochly-Rosen, D. (1995)**; Localisation of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction; *Science* **268**, 247 - 251

- Nowak, I., Seipel, K., Schwarz, M., Jans, D. A., and Hemmings, B. A. (1987);** Isolation of a cDNA and characterization of the 5' flanking region of the gene encoding the type I regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase; *Eur. J. Biochem.* **167**, 27 - 33
- Olsen, S. R., and Uhler, M. D. (1989);** Affinity purification of C alpha and C beta isoforms of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase; *J. Biol. Chem.* **264**, 18662 - 18666
- Olsen, S. R., and Uhler, M. D. (1991a);** Inhibition of protein kinase A by overexpression of the cloned human protein kinase inhibitor; *Mol. Endocrinol.* **5**, 1246 - 1256
- Olsen, S. R., and Uhler, M. D. (1991b);** Isolation and characterization of cDNA clones for an inhibitor protein of cAMP-dependent protein kinase; *J. Biol. Chem.* **266**, 11158 - 11162
- Orellana, S. A., and McKnight, G. S. (1992);** Mutations in the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase result in unregulated biological activity; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4726 - 4730
- Pawson, T. and Hunter, T. (1994);** Signal transduction and growth control in normal and cancer cells; *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 1 - 4
- Pepperkok, R., Hotz-Wagenblatt, A., König, N., Girod, A., Bossemeyer, D., and Kinzel, V. (2000);** Intracellular distribution of mammalian protein kinase A catalytic subunit altered by conserved Asn 2 deamidation; *J. Cell. Biol.* **148**, 715 - 726
- Picciolo, A. L. (2001);** Untersuchungen zur Kern-Cytoplasma-Translokation der katalytischen Untereinheit C α der Proteinkinase A; Dissertation, Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld, 2001
- Prade, L., Engh, R. A., Girod, A., Kinzel, V., Huber, R., and Bossemeyer, D. (1997);** Staurosporine-induced conformational changes of cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit explain inhibitory potential; *Structure* **5**, 1627
- Qamar, R., and Cook, P. F. (1993);** pH dependence of the kinetic mechanism of the adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinase catalytic subunit in the direction of magnesium adenosine 5'-diphosphate phosphorylation; *Biochemistry* **32**, 6802 - 6806
- Qamar, R., Yoon, M., and Cook, P. F. (1992);** Kinetic mechanism of the adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinase catalytic subunit in the direction of magnesium adenosine 5'-diphosphate phosphorylation; *Biochemistry* **31**, 9986 - 9992

- Qi, M., Zhuo, M., Skalhegg, B. S., Brandon, E. P., Kandel, E. R., McKnight, G. S., and Idzerda, R. L. (1996);** Impaired hippocampal plasticity in mice lacking the C β I catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1571 - 1576
- Rall, T. W., and Sutherland, E. W. (1958);** Formation of a cyclic adenine ribonucleoside by tissue particles; *J. Biol. Chem.* **232**, 1065 - 1076
- Reithmann, C., Gierschik, P., and Jakobs, K. H. (1990);** Stimulation and inhibition of adenylyl cyclase; *Symp. Soc. Exp. Biol.* **44**, 207 - 224
- Robinson, M. J., Harkins, P. C., Zhang, J., Baer, R., Haycock, J. W., Cobb, M. H., and Goldsmith, E. J. (1996);** Mutation of position 52 in ERK2 creates a nonproductive binding mode for adenosine 5'-triphosphate; *Biochemistry* **35**, 5641 - 5646
- Roth, J. S., Hsieh, L.-L., Peraino, C., and Weinstein, I. B. (1990);** Isolation of a complementary DNA encoding the catalytic subunit of protein kinase A and studies on the expression of this sequence on rat hepatomas and regenerating liver; *Cancer Research* **50**, 1675 - 1680
- Saito-Ito, A., Kimura, S. H. M., Matsumara, T., and Tanabe, K. (1995);** Cloning and structural analysis of the gene for cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from *Plasmodium yoelii*; *Biochim. Biophys. Acta* **1269**, 1 - 5
- Sandberg, M., Levy, F. O., Oyen, O., Hansson, V., and Jahnsen, T. (1988);** Molecular cloning, cDNA structure and deduced amino acid sequence for the hormone-induced regulatory subunit (RII beta) of cAMP-dependent protein kinase from rat ovarian granulosa cells; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**, 705 - 711
- Scarpetta, M. A., and Uhler, M. D. (1993);** Evidence for two additional isoforms of the endogenous protein kinase inhibitor from the mechanism used by proteins with a classical nuclear localization signal; *J. Cell. Sci.* **111**, 1823 - 1830
- Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P., Miller, W. T., Clarkson, B., and Kuriyan, J. (2000);** Structural Mechanism for STI-571 Inhibition of Abelson Tyrosine Kinase; *Science* **289**, 1938 - 1942
- Scott, J. D., Glaccum, M. B., Zoller, M. J., Uhler, M. D., Helfman, D. M., McKnight, G. S., and Krebs, E. G. (1987);** The molecular cloning of a type II regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase from rat skeletal muscle and mouse brain; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5192 - 5196
- Shaffner, J., and Adams, J. A. (1999a);** An ATP-Linked Structural Change in Protein Kinase A Precedes Phosphoryl Transfer under Physiological Magnesium Concentrations; *Biochemistry* **38**, 5572 - 5581

- Shaffner, J., and Adams, J. A. (1999b)**; Detection of Conformational Changes along the Kinetic Pathway of Protein Kinase A Using a Catalytic Trapping Technique; *Biochemistry* **38**, 12072 - 12079
- Shoji, S., Parmelee, D. C., Wade, R. D., Kumar, S., Ericsson, L. H., Walsh, K. A., Neurath, H., Long, G. L., Demaille, J. G., Fischer, E. H., et al. (1981)**; Complete Amino Acid Sequence of the Catalytic Subunit of Bovine Cardiac Muscle Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 848 - 851
- Solberg, R., Sandberg, M., Natarajan, V., Torjesen, P. A., Hansson, V., Jahnsen, T., and Tasken, K. (1997)**; The human gene for the regulatory subunit RI alpha of cyclic adenosine 3', 5'- monophosphate-dependent protein kinase: two distinct promoters provide differential regulation of alternately spliced messenger ribonucleic acids; *Endocrinology* **138**, 169 - 181
- Songyuang, Z., Blechner, S., Hoagland, N., Hoekstra, M. F., Piwnica-Worms, H., and Cantley, L. C. (1994)**; Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases; *Curr. Bio.* **4**, 973 - 982
- Songyuang, Z., Lu, K. P., Kwon, Y. T., Tsai, L. H. Filhol, O., Cochet, C., Brickey, D. A., Soderling, T. R., Bartleson, C., Graves, D. J. et al. (1996)**; A structural basis for substrate specificities of protein ser/thr kinases - primary sequence preferences of casein kinases i and ii, nima, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase ii, cdk5, and erk1; *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6486 - 6493
- Splauding, S. W. (1993)**; The ways in which hormones change adenosine 3', 5'- monophosphate-dependent protein kinase subunits, and how such changes affect cell behaviour; *Endocr. Rev.* **14**, 632 - 650
- Steinberg, R. A. (1991)**; A kinase-negative mutant of S49 mouse lymphoma cells is defective in posttranslational maturation of catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase; *Mol. Cell. Biol.* **11**, 705 - 712
- Sutherland, E. W., and Robinson, G. A. (1966)**; The role of cyclic-3', 5'-AMP in responses to catecholamines and other hormones; *Pharmacol. Rev.* **18**, 145 - 161
- Sutherland, E. W., and Wosilait, W. Y. (1955)**; Inactivation and activation of liver phosphorylase; *Nature* **175**, 169 - 170
- Tabor, S. (1990)**; Expression using the T7 RNA polymerase/promotor system; *Current Protocols in Molecular Biology*, pp. 16.2.1 - 16.2.11
- Takio, K., Smith, S. B., Krebs, E. G., Walsh, K. A., and Titani, K. (1982)**; Primary Structure of the Regulatory Subunit of type II cAMP-Dependent Protein Kinase from Bovine Cardiac Muscle; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2544 - 2548

- Tasken, K. A., Knutsen, H. K., Attramadal, H., Tasken, K., Jahnsen, T., Hansson, V., and Eskild, W. (1991)**; Different mechanisms are involved in cAMP-mediated induction of mRNAs for subunits of cAMP-dependent protein kinases; *Mol. Endocrinol.* **5**, 21 - 28
- Tasken, K., Skalhegg, B. S., Solberg, R., Andersson, K. B., Taylor, S. S., Lea, T., Blomhoff, H. K., Jahnsen, T., and Hansson, V. (1993)**; Novel isoenzymes of cAMP-dependent protein kinase exist in human cells due to formation of RI alpha-RI beta heterodimeric complexes; *J. Biol. Chem.* **268**, 21276 - 21283
- Taylor, S. S., and Radzioandzelm, E. (1994)**; Three protein kinase structures define a common motif; *Structure* **2**, 345 - 355
- Taylor, S. S., Radzio-Andzelm, E., and Hunter, T. (1995)**; How do protein kinases discriminate between serine/threonine and tyrosine? Structural insights from the insulin receptor kinase; *FASEB J.* **9**, 1255 - 1266
- Thullner, S., Gesellchen, F., Wiemann, S., Pyerin, W., Kinzel, V., and Bossemeyer, D. (2000)**; The protein kinase A catalytic subunit C β 2: molecular characterization and distribution of the splice variant; *Biochem. J.* **351**, 123 - 132
- Tomoda, T., Murata, T., Arai, K., Muramatsu, M. (1993)**; Mutations on 170Glu, a substrate recognition residue in mouse cAMP-dependent protein kinase, generate enzymes with altered substrate affinity and biological functions; *Biochim. Biophys. Acta* **1175**, 333 - 342
- Towler, D. A., Gordon, J. I., Adams, S. P., and Glaser, L. (1988)**; The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation; *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 69 - 99
- Uhler, M. D., Carmichael, D. F., Lee, D. C., Chrivia, J. C., Krebs, E. G., and McKnight, G. S. (1986a)**; Isolation of cDNA clones coding for the catalytic subunit of mouse cAMP-dependent protein kinase; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1300 - 1304
- Uhler, M. D., Chrivia, J. C., and McKnight, G. S. (1986b)**; Evidence for a second isoform of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase; *J. Biol. Chem.* **261**, 15360 - 15363
- Van Patten, S. M., Ng, D. C., Th'ng, J. P., Angelos, K. L., Smith, A. J., and Walsh, D. A. (1991)**; Molecular cloning of a rat testis form of the inhibitor protein of cAMP-dependent protein kinase; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5383 - 5387
- Vogelstein, B. and Gillespie, D. (1979)**; Preparative and analytical purification of DNA from agarose; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 615 - 619
- Walsh, D. A., and Van-Patten, S. M. (1994)**; Multiple pathway signal transduction by the cAMP- dependent protein kinase; *FASEB J.*; **8**, 1227 - 1236
- Walsh, D. A., Perkins, J. P., and Krebs, E. G. (1968)**; An adenosine 3', 5'-monophosphate dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle; *J. Biol. Chem.* **234**, 3763 - 3765

- Wen, W., and Taylor, S. S. (1994);** High affinity binding of the heat-stable protein kinase inhibitor to the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase is selectively abolished by mutation of Arg 133; *J. Biol. Chem.* **269**, 8423 - 8430
- Wen, W., Taylor, S. S., and Meinkoth, J. L. (1995);** The expression and intracellular distribution of the heat-stable protein kinase inhibitor is cell cycle regulated; *J. Biol. Chem.* **270**, 2041 - 2046
- White, R. R., Kwon, Y. G., Taing, M., Lawrence, D. S., and Edelman, A. M. (1998);** Definition of optimal substrate recognition motifs of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinases IV and II reveals shared and distinctive features; *J. Biol. Chem.* **273**, 3166 - 3172
- Whitehouse, S., and Walsh, D.A. (1983);** MgATP-dependent interaction of the inhibitor protein of the cAMP-dependent protein kinase with the catalytic subunit; *J. Biol. Chem.* **258**, 3682 - 3692
- Whitehouse, S., Feramisco, J. R., Casnellie, J. E., Krebs, E. G., and Walsh, D. A. (1983);** Studies on the kinetic mechanism of the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase; *J. Biol. Chem.* **258**, 3693 - 3701
- Wiemann, S., Kinzel, V., and Pyerin, W. (1991a);** Isoform C β 2, an unusual form of the bovine catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase; *J. Biol. Chem.* **266**, 5140 - 5146
- Wiemann, S., Kinzel, V., and Pyerin, W. (1992);** Cloning of the C α catalytic subunit of the bovine cAMP-dependent protein kinase; *Biochim. Biophys. Acta* **1171**, 93 - 96
- Wiemann, S., Voss, H., Kinzel, V., and Pyerin, W. (1991b);** Rat C alpha catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase: cDNA sequence and evidence that it is the only isoform expressed in myoblasts; *Biochim. Biophys. Acta* **1089**, 254 - 256
- Wilcox, C., Hu, J.-S., and Olson, E. N. (1987);** Acylation of proteins with myristic acid occurs cotranslationally; *Science Reports*, 1275 - 1278
- Yamamoto, K. K., Gonzalez, G. A., Biggs, W. H. I., and Montminy, M. R. (1988);** Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB; *Nature* **334**, 494 - 498
- Yonemoto, W., McGlone, M. L., and Taylor, S. S. (1993);** N-myristylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase conveys structural stability; *J. Biol. Chem.* **268**, 2348 - 2352
- Yonemoto, W., McGlone, M. L., Grant, B., and Taylor, S. S. (1997);** Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli*; *Protein-Eng.* **10**, 915 - 925

- Yoon, M., and Cook, P. F. (1987);** Chemical mechanism of the adenosine cyclic 3', 5'-monophosphate dependent protein kinase from pH-studies; *Biochemistry* **26**, 4118 - 44125
- Zetterqvist, Ö., Ragnarsson, U., and Engström, L. (1990);** Substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase; *Peptides and Protein Phosphorylation* B. E. Kemp. Boca Raton, CRC Press, Inc.: 171 - 187
- Zheng, J. H., Trafny, E. A., Knighton, D. R., Xuong, N. H., Taylor, S. S., Teneyck, L. F., and Sowadski, J. M. (1993);** 2.2-angstrom refined crystal-structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MnATP and a peptide inhibitor; *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **49**, 362
- Zheng, J., Knighton, D. R., Xuong, N. H., Taylor, S. S., Sowadski, J. M., and Ten Eyck, L. F. (1993);** Crystal structures of the myristylated catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase reveal open and closed conformations; *Protein Sci.* **2**, 1559 - 1573
- Zhou, J., and Adams, J. A. (1997a);** Is there a catalytic base in the active site of cAMP-dependent protein kinase?; *Biochemistry* **36**, 2977 - 2984
- Zhou, J., and Adams, J. A. (1997b);** Participation of ADP dissociation in the rate-determining step in cAMP-dependent protein kinase; *Biochemistry* **36**, 15733 - 15738

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

1 x g	einfache Erdbeschleunigung
AKAP	A-Kinase-Ankerprotein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bidest	bidestilliertes Wasser
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
Cb	Carbenicillin
cpm	counts per minute
CRE	cAMP-responsives Element
CREB	cAMP-responsives Element Bindeprotein
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)- carbodiimid
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
k_{ass}	Assoziationsgeschwindigkeitskonstante
k_{ass}^{kin}	Assoziationsgeschwindigkeitskonstante, ermittelt durch kinetische Auswertung
K_D	Dissoziationsgleichgewichtskonstante
k_{diss}	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
k_{diss1}	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante der ersten Phase der Dissoziation
k_{diss2}	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante der zweiten Phase der Dissoziation
k_{diss}^{kin}	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante, ermittelt durch kinetische Auswertung
K_D^{kin}	Dissoziationsgleichgewichtskonstante, ermittelt durch kinetische Auswertung
K_D^{therm}	Dissoziationsgleichgewichtskonstante, ermittelt durch thermodynamische Auswertung
K_i	Inhibitorische Konstante
K_M	Michaeliskonstante
Kn	Kanamycin
k_{on}	apparente Assoziationsgeschwindigkeitskonstante
MES	2-[n-morpholino]-ethansulfonsäure
MOPS	3-[N-morpholino]-propansulfonsäure
Mu	Mutante
NHS	N-Hydroxysuccinimid
Ni-NTA	nickel nitrilo-triacetic acid
o.D.	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS/T	Phosphat-gepufferte Saline mit Tween 20-Zusatz
PKA	Proteinkinase A
PKI	hitzestabiler Proteinkinase Inhibitor
PKI(5-24)	Peptid des hitzestabilen Proteinkinase Inhibitors
rC α	rekombinant exprimierte katalytische Untereinheit (Isoenzym α) der PKA
RMA	Resonant Mirror Affinography
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sgDNA	einzelsträngige DNA
TBS/T	Tris-gepufferte Saline mit Tween 20-Zusatz
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylenethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
üN	über Nacht
Unit	Enzymeinheit
v/v	volume per volume
V _{max}	spezifische Maximalgeschwindigkeit
w/v	weight per volume
WT	Wildtyp

7.2 Peptidsequenzen

Kemptid:

L R R A S L G

$C_{32}H_{61}N_{13}O_9$

Masse der freien Base: 771,9

Proteinkinase Inhibitor-Peptid PKI(5-24):

T T Y A D F I A S G R T G R R N A I H D

$C_{94}H_{148}N_{32}O_{31}$

Masse der freien Base: 2222,4

His-tag:

M G S S H H H H H S S G L V P R G S H

Sequenz, die vom pET-28b⁺-Vektor (Novagen) als Fusionspeptid codiert wird

7.3 Sequenzen der verwendeten Mutagenese-Primer

1) C α E91Q: GAG CAC ACC CTG AAT **CAG** AAG CGC ATC CTG CAG G

2) C α E91Qrev II: C CTG CAG GAT GCG CTT **CTG** ATT CAG GGT GTG CTC

3) C α E91A: GAG CAC ACC CTG AAT **GCG** AAG CGC ATC CTG CAG G

4) C α E91Arev II: C CTG CAG GAT GCG CTT **CGC** ATT CAG GGT GTG CTC

Die mutierten Triplets sind fett dargestellt.

7.4 Limits [Å] für van der Waals-Wechselwirkungen

C-C:	4.11	C-N:	3.78
N-N:	3.44	C-O:	3.72
O-O:	3.33	N-O:	3.39

7.5 Kavitäten unterschiedlicher C α bzw. rC α -Formen

AS-Reste, die an den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kavitäten beteiligt sind:

Kavität 1: L103, I150, T153, F154, L157, Y164, D166, L167, K168, N171, L172, V182,
F/L/W185

Kavität 2: I94, L157, L162, I163, Y164, F/L/W185, A188, K189

Kavität 3: F102, Q149, I150, T153, I180, V182

7.6 C α -DNA- und Aminosäuresequenz

		NdeI																	
		CAT	ATG	GGC	AAC	GCC	GCC	GCC	GCC	AAG	AAG	GGC	AGC	GAG	CAA	GAA	AGC	GTG	
		M	G	N	A	A	A	A	A	K	K	G	S	E	Q	E	S	V	15
49		AAA	GAG	TTC	TTA	GCC	AAA	GCC	AAA	GAA	GAT	TTT	CTT	AAA	AAA	TGG	GAA		
		K	E	F	L	A	K	A	K	E	D	F	L	K	K	W	E		31
97		AAT	CCT	GCT	CAG	AAC	ACA	GCC	CAC	TTG	GAT	CAG	TTT	GAA	CGA	ATC	AAG		
		N	P	A	Q	N	T	A	H	L	D	Q	F	E	R	I	K		47
145		ACC	CTG	GGT	ACG	GGC	TCC	TTC	GGG	CGG	GTG	ATG	CTG	GTG	AAG	CAC	ATG		
		T	L	G	T	G	S	F	G	R	V	M	L	V	K	H	M		63
193		GAG	ACC	GGG	AAC	CAC	TAC	GCC	ATG	AAG	ATC	CTC	GAC	AAA	CAG	AAG	GTG		
		E	T	G	N	H	Y	A	M	K	I	L	D	K	Q	K	V		79
241		GTG	AAG	CTG	AAA	CAG	ATT	GAG	CAC	ACC	CTG	AAT	GAG	AAG	CGC	ATC	CTG		
		V	K	L	K	Q	I	E	H	T	L	N	E	K	R	I	L		95
289		CAG	GCG	GTC	AAC	TTT	CCG	TTC	CTT	GTC	AAA	CTC	GAG	TTC	TCC	TTC	AAG		
		Q	A	V	N	F	P	F	L	V	K	L	E	F	S	F	K		111
337		GAC	AAC	TCA	AAT	TTA	TAC	ATG	GTC	ATG	GAG	TAC	GTG	CCC	GGT	GGG	GAG		
		D	N	S	N	L	Y	M	V	M	E	Y	V	P	G	G	E		127
385		ATG	TTC	TCA	CAC	CTG	CGA	CGG	ATC	GGG	AGG	TTC	AGT	GAG	CCC	CAC	GCA		
		M	F	S	H	L	R	R	I	G	R	F	S	E	P	H	A		143
433		CGC	TTC	TAC	GCC	GCC	CAG	ATT	GTC	CTG	ACC	TTT	GAG	TAC	CTG	CAC	TCG		
		R	F	Y	A	A	Q	I	V	L	T	F	E	Y	L	H	S		159
481		CTT	GAT	CTC	ATT	TAC	CGG	GAC	CTG	AAG	CCA	GAG	AAC	CTC	CTC	ATC	GAC		
		L	D	L	I	Y	R	D	L	K	P	E	N	L	L	I	D		175
529		CAG	CAG	GGC	TAC	ATT	CAG	GTG	ACA	GAC	TTT	GGT	TTC	GCC	AAG	CGT	GTG		
		Q	Q	G	Y	I	Q	V	T	D	F	G	F	A	K	R	V		191
577		AAA	GGC	CGC	ACC	TGG	ACC	TTG	TGT	GGG	ACC	CCT	GAG	TAC	TTG	GCC	CCC		
		K	G	R	T	W	T	L	C	G	T	P	E	Y	L	A	P		207
625		GAG	ATC	ATC	CTG	AGT	AAA	GGC	TAC	AAC	AAA	GCT	GTG	GAC	TGG	TGG	GCC		
		E	I	I	L	S	K	G	Y	N	K	A	V	D	W	W	A		223
673		CTG	GGG	GTC	CTC	ATC	TAC	GAA	ATG	GCC	GCA	GGC	TAC	CCG	CCC	TTC	TTT		
		L	G	V	L	I	Y	E	M	A	A	G	Y	P	P	F	F		239
721		GCC	GAC	CAG	CCC	ATC	CAG	ATC	TAC	GAG	AAG	ATT	GTC	TCT	GGG	AAG	GTG		
		A	D	Q	P	I	Q	I	Y	E	K	I	V	S	G	K	V		255
769		CGG	TTT	CCA	TCC	CAC	TTC	AGC	TCT	GAC	TTG	AAG	GAT	CTG	CTG	CGC	AAC		
		R	F	P	S	H	F	S	S	D	L	K	D	L	L	R	N		271
817		CTC	CTA	CAA	GTG	GAC	CTC	ACC	AAG	CGC	TTT	GGG	AAC	CTC	AAG	AAT	GGG		
		L	L	Q	V	D	L	T	K	R	F	G	N	L	K	N	G		287
865		GTC	AAT	GAT	ATC	AAG	AAC	CAC	AAG	TGG	TTT	GCC	ACA	ACT	GAC	TGG	ATT		
		V	N	D	I	K	N	H	K	W	F	A	T	T	D	W	I		303
913		GCC	ATC	TAC	CAG	AGG	AAG	GTG	GAA	GCT	CCC	TTC	ATA	CCA	AAG	TTT	AAA		
		A	I	Y	Q	R	K	V	E	A	P	F	I	P	K	F	K		319
961		GGC	CCT	GGG	GAC	ACA	AGT	AAC	TTT	GAC	GAC	TAT	GAG	GAG	GAA	GAG	ATC		
		G	P	G	D	T	S	N	F	D	D	Y	E	E	E	E	I		335
1009		CGA	GTC	TCT	ATC	AAT	GAG	AAG	TGT	GGC	AAG	GAG	TTT	TCT	GAG	TTC	TAG		
		R	V	S	I	N	E	K	C	G	K	E	F	S	E	F	Stop		350
1057		GGT	GTG	CCT	GTG	CGG	ATC	CGG	G										

BamHI

Abb. 7.1: DNA- und Aminosäuresequenz von C α

Sequenzbezeichnung: BTPKINCA; EMBL/GenBank/DBJ Databases. Das N-terminale Methionin wird sowohl in Eukaryoten als auch in *E. coli* abgespalten.

7.7 Grundeinstellungen des IAsys Auto⁺

Autosampler Setup

Tray "A" type	Type 3 Eppendorf Tubes
Tray "B" type	Type 3 Eppendorf Tubes
Active Cells	1 and 2
Num. bubbles	2
Bubble size	5 μ l
Num. washes	2
Vol. washes	50 μ l
Tray temp	15 °C

Instrument Parameters

Sampling	0,3
Stirrer	50
Temp.	25 °C

7.8 Scripte für RMA-Messungen

TScellsave.rms

```

INPUT #title$           DEFAULT "cellsave.rmd"; EXPERIMENTAL TITLE
INPUT #cell_no          DEFAULT 3;      which cell to use
INPUT #equil_time       DEFAULT 600;    Time to leave cell to equilibrate
INPUT #b_rate           DEFAULT 3;      Data collection rate
INPUT #inst_temp        DEFAULT 25;     EXPERIMENTAL TEMPERATURE
INPUT #stir_rate        DEFAULT 50;     STIRRER SETTING
INPUT #do_res           DEFAULT 0;      If !=0 then print resonance scan
INPUT #buf_vol[1]       DEFAULT 45;     Vol buffer left in Cell 1 after wash
INPUT #buf_vol[2]       DEFAULT 45;     Vol buffer left in Cell 2 after wash
INPUT #num_wash         DEFAULT 100;    Number of wash cycles post experiment
INPUT #freq             DEFAULT 3600;   Time between num_wash cycles (seconds)

BEGIN

CALL IAEQUILIBRATION[#cell_no, #equil_time, #stir_rate, #inst_temp,
[#buf_vol]]
CALL IAINSTRUMENT_GO[#cell_no, #b_rate, #do_res]
CALL IACELL_SAVE[#cell_no, #num_wash, #freq, [#buf_vol]]

END

```

ImmoCMD.rms

```

; $Revision: 3.0 [IMMOCMD.RMS]

;EDC/NHS mediated immobilisation into a single Cell.
;Enables repeat activation and ligand injection cycles.
;Ligand diluted into Cell.
;Un-reacted ligand can be recovered into TRAY_A[1, cell_no used].
;Reagents taken from REAGENT_B locations EXCEPT regeneration solution
;which is taken from REAGENT_A[Cell used].
;NOTE this script will continue to wash CELL after experiment
;has finished and data saved.
;Puts the values selected for the major variables into the notebook.

INPUT #title$      DEFAULT "immo.rmd";  EXPERIMENTAL TITLE
INPUT #cell_no    DEFAULT 1;           WHICH CELL TO USE
INPUT #edc_loc    DEFAULT 8;           REAGENT_B LOC FOR EDC
INPUT #nhs_loc    DEFAULT 7;           REAGENT_B LOC FOR NHS
INPUT #act_loc    DEFAULT 6;           REAGENT_B LOC FOR EDC/NHS
INPUT #immbuf_loc DEFAULT 1;           REAGENT_B LOC FOR IMMO BUFF
INPUT #immbuf_vol DEFAULT 45;          VOLUME IMMO BUFF IN CELL
INPUT #lig_loc    DEFAULT 5;           REAGENT_B LOC FOR LIGAND
INPUT #lig_vol    DEFAULT 5;           VOL LIGAND INJECTED INTO CELL
INPUT #imm_time   DEFAULT 600;         IMMOBILISATION TIME (seconds)
INPUT #block_loc  DEFAULT 2;           REAGENT_B LOC FOR BLOCKING REAGENT
INPUT #num_pretreat DEFAULT 3;         NUMBER OF PRETREATMENT CYCLES
INPUT #stir_rate  DEFAULT 50;         STIRRER SETTING
INPUT #inst_temp  DEFAULT 25;         EXPERIMENTAL TEMPERATURE
INPUT #equil_time DEFAULT 600;         Time to leave cell to equilibrate
INPUT #b_rate     DEFAULT 3;           Data collection rate for experiment
INPUT #do_res     DEFAULT 1;           If not 0, print resonance scan
INPUT #base_time  DEFAULT 300;         Length of baselines (seconds)
INPUT #buf_vol[1] DEFAULT 45;          Vol buffer left in Cell 1 after wash
INPUT #buf_vol[2] DEFAULT 45;          Vol buffer left in Cell 2 after wash
INPUT #act_time   DEFAULT 420;         Length of activation cycle (seconds)
INPUT #num_reps_act DEFAULT 1;         Number of activation cycles
INPUT #num_reps_lig DEFAULT 1;         Number of ligand injection cycles
INPUT #do_rec_lig DEFAULT 0;           If not 0 recover ligand to
TRAY_A[1,cell_no]
INPUT #block_time DEFAULT 180;         Length of blocking step (seconds)
INPUT #reg_time   DEFAULT 120;         Length of regeneration step (seconds)
INPUT #num_wash   DEFAULT 100;         Number of wash cycles post experiment
INPUT #freq       DEFAULT 3600;        Time between num_wash cycles (seconds)
BEGIN

CALL IAEQUILIBRATION[#cell_no, #equil_time, #stir_rate, #inst_temp,
[#buf_vol]]
CALL IAINSTRUMENT_GO[#cell_no, #b_rate, #do_res]
CALL IAINFOTABLE_2[#cell_no, #act_time, #num_reps_act, #num_reps_lig,
#lig_vol, #immbuf_vol, #imm_time, #block_time, #base_time, 0, #reg_time, 0,
#num_pretreat]
WAIT #base_time SECONDS

```

```

CALL IAACTIVATION[#cell_no, 180, #edc_loc, 180, #nhs_loc, #act_loc,
#act_time, #num_reps_act, 30, [#buf_vol]]
CALL IALIG_INJECT[#cell_no, #num_reps_lig, #immbuf_vol, #immbuf_loc,
#lig_vol, #lig_loc, #imm_time, #do_rec_lig, [#buf_vol], [immobase]]
CALL IABLOCK_SINGLE[#cell_no, 30, #block_loc, #block_time, 1, [#buf_vol],
[immobase]]
CALL IAPRETREATMENT[#cell_no, #num_pretreat, #base_time, #reg_time,
[#buf_vol], [immobase], #b_rate]
CALL IAINSTRUMENT_STOP[#cell_no, #do_res, #title$]
STATUS "EXPERIMENT HAS FINISHED, CELL SAVE MODE IN OPERATION"
CALL IACELL_SAVE[#cell_no, #num_wash, #freq, [#buf_vol]]

END

```

ImmoCMDboth.rms

```

; $Revision: 3.0 [IMMOCMDBOTH.RMS]
;
;Immobilisation into both channels, allows different
;ligands to be immobilised for different times.
;Other functionality as 1CIMMO.RMS.
;To allow maximum flexibility LIGAND taken from and
;recovered to TRAY_B.
;Ligand taken from TRAY_B[1,1] or [2, 1] and recovered
;to TRAY_B[1,2] and [2,2] respectively.
;Defaults are to take same reagents for both Cells, e.g ligand from
;TRAY_B[1, 1] for both Cells.
;NOTE this script will continue to wash Cell after
;experiment has finished and data saved.

INPUT #title$      DEFAULT "immo.rmd"; EXPERIMENTAL TITLE
INPUT #edc_loc     DEFAULT 8;      REAGENT_B LOC FOR EDC
INPUT #nhs_loc     DEFAULT 7;      REAGENT_B LOC FOR NHS
INPUT #act_loc     DEFAULT 6;      REAGENT_B LOC FOR EDC/NHS MIX
INPUT #immbuf_loc[1] DEFAULT 1;    REAGENT_B LOC for IMMO BUFF for Cell 1
INPUT #immbuf_loc[2] DEFAULT 1;    REAGENT_B LOC for IMMO BUFF for Cell 2
INPUT #immbuf_vol[1] DEFAULT 45;   VOL IMMOBILISATION BUFF FOR CELL 1
INPUT #immbuf_vol[2] DEFAULT 45;   VOL IMMOBILISATION BUFF FOR CELL 2
INPUT #lig_loc[1]  DEFAULT 1;      TRAY_B X COORD FOR LIGAND FOR CELL 1
INPUT #lig_loc[2]  DEFAULT 1;      TRAY_B X COORD FOR LIGAND FOR CELL 2
INPUT #lig_vol[1]  DEFAULT 5;      VOL LIGAND INJECTED INTO CELL 1
INPUT #lig_vol[2]  DEFAULT 5;      VOL LIGAND INJECTED INTO CELL 2
INPUT #imm_time[1] DEFAULT 600;    IMMO TIME CELL 1 (seconds)
INPUT #imm_time[2] DEFAULT 600;    IMMO TIME CELL 2 (seconds)
INPUT #block_loc[1] DEFAULT 2;     REAGENT_B LOC BLOCKING reagent CELL 1
INPUT #block_loc[2] DEFAULT 2;     REAGENT_B LOC BLOCKING reagent CELL 2
INPUT #num_pretreat DEFAULT 3;     NUMBER OF PRETREATMENT CYCLES
INPUT #stir_rate   DEFAULT 50;     STIRRER SETTING
INPUT #inst_temp    DEFAULT 25;    EXPERIMENTAL TEMPERATURE
INPUT #equil_time  DEFAULT 600;    Time to leave Cell to equilibrate

```

```

INPUT #b_rate      DEFAULT 3;    Data collection rate for experiment
INPUT #do_res      DEFAULT 1;    IF not 0, print resonance scan
INPUT #base_time   DEFAULT 300;  Length of baselines (seconds)
INPUT #buf_vol[1]  DEFAULT 45;   Vol buffer left in Cell 1 after wash
INPUT #buf_vol[2]  DEFAULT 45;   Vol buffer left in Cell 2 after wash
INPUT #act_time    DEFAULT 420;  Length of activation cycle (seconds)
INPUT #num_reps_act DEFAULT 1;    Number of activation cycles
INPUT #num_reps_lig DEFAULT 1;    Number of ligand injection cycles
INPUT #do_rec_lig  DEFAULT 0;    IF not 0, recover ligands from Cells
INPUT #block_vol[1] DEFAULT 30;   Vol blocking solution left in Cell 1
INPUT #block_vol[2] DEFAULT 30;   Vol blocking solution left in Cell 2
INPUT #block_time[1] DEFAULT 180; Length of blocking step Cell 1 (seconds)
INPUT #block_time[2] DEFAULT 180; Length of blocking step Cell 2 (seconds)
INPUT #reg_time    DEFAULT 120;  Length of regeneration step (seconds)
INPUT #num_wash    DEFAULT 100;  Number of wash cycles post experiment
INPUT #freq        DEFAULT 3600;  Time between num_wash cycles (seconds)
BEGIN

CALL IAEQUILIBRATION[3, #equil_time, #stir_rate, #inst_temp, [#buf_vol]]
CALL IAINSTRUMENT_GO[3, #b_rate, #do_res]
CALL IAINFOTABLE_3[#act_time, #num_reps_act, #num_reps_lig, [#lig_vol],
[#immbuf_vol], [#imm_time], [#block_time], #base_time, #reg_time,
#num_pretreat]
WAIT #base_time SECONDS
CALL IAACT_BOTH[3, 180, #edc_loc, 180, #nhs_loc, #act_loc, #act_time,
#num_reps_act, 30, [#buf_vol]]
CALL IALIG_INJECT_BOTH[#num_reps_lig, [#immbuf_vol], [#immbuf_loc],
[#lig_vol], [#lig_loc], [#imm_time], #do_rec_lig, [#buf_vol], [immobase]]
CALL IABLOCK_BOTH[#block_vol], [#block_loc], [#block_time], 1, [#buf_vol],
[immobase]]
SET immobase[1] TO 100
SET immobase[2] TO 100
CALL IAPRETREATMENT[3, #num_pretreat, #base_time, #reg_time, [#buf_vol],
[immobase], #b_rate]
CALL IAINSTRUMENT_STOP[3, #do_res, #title$]
STATUS "EXPERIMENT HAS FINISHED, CELL SAVE MODE IN OPERATION"
CALL IACELL_SAVE[3, #num_wash, #freq, [#buf_vol]]

END

```

TSbindcontrol.rms

```
;TSBINDCONTROL.RMS
```

```
; $Revision: 3.0 [BINDCONTROL.RMS]
```

```
;
```

```
;This script injects a sample from TRAY_A[x, y] dilutes into CELL 1 and then
;dilutes it into CELL 2.
```

```
;It assumed that CELL 2 is a non-specific control for CELL 1.
```

;Optional dissociation with Ass/DissB from TRAY_B [x, y], followed by regeneration.

;Binding and dissociation events are reported for the same lengths of time in both CELLS.

;NOTE this script will continue to wash CELL after experiment has finished and data saved.

```

INPUT #title$      DEFAULT "BIND.RMD";EXPERIMENTAL TITLE
INPUT #x_start    DEFAULT 1;      FIRST X (L to R)
INPUT #y_start    DEFAULT 1;      FIRST Y (F to B)
INPUT #x_finish   DEFAULT 8;      FINAL X (L to R)
INPUT #y_finish   DEFAULT 12;     FINAL Y (F to B)
INPUT #samp_vol[1] DEFAULT 5;      SAMPLE VOLUME TO INJECT for CELL 1
INPUT #samp_vol[2] DEFAULT 5;      SAMPLE VOLUME TO INJECT for CELL 2
INPUT #buf_vol[1]  DEFAULT 45;     VOL BUFFER sample diluted into CELL 1
INPUT #buf_vol[2]  DEFAULT 45;     VOL BUFFER sample diluted into CELL 2
INPUT #bind_time  DEFAULT 600;     LENGTH OF BINDING PHASE (seconds)
INPUT #diss_time  DEFAULT 300;     LENGTH OF DISSOCIATION PHASE (seconds)
INPUT #base_time  DEFAULT 300;     LENGTH OF BASELINES (seconds)
INPUT #stir_rate  DEFAULT 50;      STIRRER SETTING
INPUT #inst_temp  DEFAULT 25;      EXPERIMENTAL TEMPERATURE
INPUT #equil_time DEFAULT 600;     Time to leave Cell to equilibrate
INPUT #do_res     DEFAULT 0;       If not 0, print res scans
INPUT #do_con     DEFAULT 1;       If not 0, reports a specific value
INPUT #b_rate     DEFAULT 3;       Data collection rate for baselines
INPUT #s_rate     DEFAULT 0.3;     Data collection rate for binding/dissoc
INPUT #reg_time   DEFAULT 120;     Length regeneration phase (seconds)
INPUT #num_wash   DEFAULT 100;     Number of wash cycles post experiment
INPUT #freq       DEFAULT 3600;    Time between num_wash cycles
BEGIN

CALL IAEQUILIBRATION[3, #equil_time, #stir_rate, #inst_temp, [#buf_vol]]
CALL IAINSTRUMENT_GO[3, #b_rate, #do_res]
CALL IAINFOTABLE_4[1, #x_start, #y_start, #x_finish, #y_finish, [#samp_vol],
[#buf_vol], #bind_time, #diss_time, #base_time, #reg_time]
CALL TSBINDCYCLE_CON[#s_rate, #x_start, #y_start, #x_finish, #y_finish,
[#samp_vol], [#buf_vol], #base_time, #bind_time, #diss_time, #reg_time,
#b_rate, #do_con, [result]]
CALL IAREPORT[#x_start, #y_start, #x_finish, #y_finish, [result], 0, "+Ve",
"-Ve", "Response"]
CALL IAINSTRUMENT_STOP[3,#do_res, #title$]
STATUS "EXPERIMENT HAS FINISHED, CELL SAVE MODE IN OPERATION"
CALL IACELL_SAVE[3, #num_wash, #freq, [#buf_vol]]

END
;    TSBINDCYCLE_CON
;
;Takes a sample from TRAY_A[X,Y] and injects into CELL 1
;and into CELL 2.
;Sample diluted into both CELLS.
;Allows for association, dissociation and regeneration

```

```

;Dissociation is generated by Ass/DissB in TRAY_B [x, y]
;Option to generate a specific value for the binding if
;using Cell 2 as a control.
;Generates an array of the results if using Cell 2 as a control.
;
;USES FOLLOWING ARGUMENTS:
;s_rate  Data collection rate for binding
;x_start  First x (L to R) position containing sample
;y_start  First y (F to B) position containing sample
;x & y_finish Final sample positions for x and y
;[samp_vol] Volume sample diluted into Cell
;[buf_vol] Volume buffer left in Cell after washing
;base_time Length of baselines (seconds)
;bind_time Length of binding phase (seconds)
;diss_time Length of dissociation phase (seconds)
;reg_time Length of regeneration step (seconds)
;b_rate  Data collection rate for baseline
;do_con  If not 0, Cell 2 is being used as a control
;[result] Array to hold the specific responses
;
FUNCTION  TSBINDCYCLE_CON[s_rate,  x_start,  y_start,  x_finish,  y_finish,
[samp_vol],  [buf_vol],  base_time,  bind_time,  diss_time,  reg_time,  b_rate,
do_con, [result]]

;LOOP AROUND EACH SAMPLE IN TURN

      COUNT y FROM y_start TO y_finish STEP 1
      COUNT x FROM x_start TO x_finish STEP 1

      REPLACE 1 WITH 45 FROM TRAY_B[x, y]
      CALL IANEEDELEWASH
      REPLACE 2 WITH 45 FROM TRAY_B[x, y]
      CALL IANEEDELEWASH

;WAIT FOR BASELINE
      WAIT base_time SECONDS

;CHANGE DATA COLLECTION RATE
      SAMPLING s_rate

;RECORD THE STARTING SHIFT & INJECT THE SAMPLE INTO BOTH CELLS
      COUNT n FROM 1 TO 2 STEP 1
      STATUS "BINDING PHASE"
SET title$ TO "SAMPLE FROM..." + "\n\t" + "TRAY_A [" + x + ", " + y + "]"
      SET base$ TO "BASELINE STARTED"
      MARK BASELINE base$ IN n
      EVENT BINDING title$
      TRANSFER samp_vol[n] FROM TRAY_A[x, y] TO CELL[n]
      CALL IANEEDELEWASH
      STATUS "BINDING PHASE"
      SET start_time[n] TO FUNCTION TIME[n, BINDING]
SET start_shift[n] TO FUNCTION RESPONSE[n, (start_time[n]- 1)]

```



```
ENDCOUNT

;WAIT THE APPROPRIATE LENGTH OF TIME
  SET now TO FUNCTION TIME
  WAIT (bind_time - (now - start_time[1])) SECONDS

;RECORD THE RESPONSE OF SAMPLE 1
SET end_shift[1] TO FUNCTION RESPONSE[1, (start_time[1] + bind_time)]

;WAIT ANY EXTRA TIME REQUIRED AND RECORD SHIFT OF SAMPLE IN CELL 2
  SET now TO FUNCTION TIME
  IF (( now - start_time[2]) < bind_time) THEN
    WAIT (bind_time - (now - start_time[2])) SECONDS
  ENDIF
SET end_shift[2] TO FUNCTION RESPONSE[2, (start_time[2] + bind_time)]

  SET resp[1] TO (end_shift[1] - start_shift[1])
  SET resp[2] TO (end_shift[2] - start_shift[2])

;IF USING CELL 2 AS A CONTROL THEN GENERATE A SPECIFIC SHIFT
  SET specshift TO (resp[1] - resp[2])
  IF do_con != 0 THEN
SET header$ TO "BINDING DATA..." + "\n"
SET V2$ TO "\t" + "Binding response CELL 1 = " + resp[1] + "arc seconds" +
"\n"
SET V3$ TO "\t" + "Binding response CELL 2 = " + resp[2] + "arc seconds"+
"\n"
SET V4$ TO "\t" + "Specific response = "+ specshift + "arc seconds"
SET V5$ TO header$ + V2$ + V3$ + V4$
MARK USER V5$
  ELSE
SET header$ TO "BINDING DATA..." + "\n"
SET V2$ TO "\t" + "Binding response CELL 1 = " + resp[1] + "arc seconds" +
"\n"
SET V3$ TO "\t" + "Binding response CELL 2 = " + resp[2] + "arc seconds"+
"\n"
SET V4$ TO header$+ V2$ + V3$
MARK USER V4$
  ENDIF

;CREATE ARRAY OF SPECIFIC RESULT
  SET result[x, y] TO specshift

;DISSOCIATE IF d_t > 0
  IF diss_time !=0 THEN
    CALL TSDISSOCIATE_BOTH[x, y, diss_time]
  ENDIF

;REGENERATE
CALL IAREGENERATION[3, reg_time, b_rate, [start_reg]]

;ENSURE BOTH CELLS REGENERATED FOR SAME LENGTH OF TIME
```

```
CALL IACELL_WASH[1, [buf_vol]]
SET now TO FUNCTION TIME
IF (now - start_reg[2]) < reg_time THEN
  WAIT (reg_time - (now - start_reg[2])) SECONDS
ENDIF
CALL IACELL_WASH[2, [buf_vol]]

ENDCOUNT
SAVE "SAMPLES"+y+".RMD"
SET saved$ TO "ALL data to this point saved as SAMPLES"+y+".RMD"
MARK USER "SAVED DATA..." + "\n" + saved$
ENDCOUNT

ENDFUNCTION
;      TSDISSOCIATE_BOTH
;
;Performs a DISSOCIATION for both CELLS for same length of time with
Ass/DissB from TRAY_B [x, y]
;
;USES FOLLOWING ARGUMENTS:
;diss_time    Length of dissociation phase (seconds)
;
FUNCTION TSDISSOCIATE_BOTH[x, y, diss_time]

  STATUS "DISSOCIATION PHASE"

  SET title$ TO "DISSOCIATION"

;RECORD ANGLES, LOG EVENT AND WASH THE CELLS
COUNT n FROM 1 TO 2 STEP 1
  EVENT DISSOCIATION title$
  REPLACE n WITH 80 FROM TRAY_B [x, y]
  CALL IANEEDELEWASH
  STATUS "DISSOCIATION PHASE"
  SET start_time[n] TO FUNCTION TIME[n, DISSOCIATION]
  SET start_shift[n] TO FUNCTION RESPONSE[n, (start_time[n] - 3)]
ENDCOUNT

;NOW SEE HOW MUCH TIME IS REMAINING
SET now TO FUNCTION TIME
WAIT diss_time - (now - start_time[1]) SECONDS
;RECORD THE ANGLE AND TIME
SET end_time[1] TO FUNCTION TIME
SET end_shift[1] TO FUNCTION RESPONSE[1, (start_time[1] + diss_time)]
;WAIT FOR OTHER CELL
WAIT start_time[2] - start_time[1] SECONDS
SET end_time[2] TO FUNCTION TIME
SET end_shift[2] TO FUNCTION RESPONSE[2, (start_time[2] + diss_time)]

;RECORD AND RETURN FINAL RESPONSES
SET V1$ TO "DISSOCIATION DATA:..." + "\n"
```

```

COUNT n FROM 1 TO 2 STEP 1
  SET dishift[n] TO start_shift[n] - end_shift[n]
  SET distime[n] TO end_time[n] - start_time[n]
  SET V2$ TO "\t" + "CELL " + n + ":" + "\n"
SET V3$ TO "\t\t" + "Dissociation response = " + dishift[n] + " arc seconds"
+ "\n"
SET V4$ TO "\t\t" + "Dissociation time = " + distime[n] + "seconds" + "\n"
  SET output$[n] TO V2$ + V3$ + V4$
ENDCOUNT

  SET rep$ TO " "

  COUNT data FROM 1 TO 2 STEP 1
SET rep$ TO rep$ + output$[data]
  ENDCOUNT

SET log$ TO V1$ + rep$
  MARK USER log$

ENDFUNCTION

```

Pretreat.rms

```

; $Revision: 3.0 [PRETREAT.RMS]
;
;This script is for running pretreatments to cells stored with ligate bound.

INPUT #title$      DEFAULT "pretreat.rmd"; EXPERIMENTAL TITLE
INPUT #cell_no     DEFAULT 1;      WHICH CELL TO USE (3 = BOTH)
INPUT #stir_rate   DEFAULT 50;    STIRRER SETTING
INPUT #inst_temp   DEFAULT 25;    EXPERIMENTAL TEMPERATURE
INPUT #num_pretreat DEFAULT 3;    NUMBER OF PRETREATMENTS
INPUT #equil_time  DEFAULT 600;   Time to leave cell to equilibrate
INPUT #b_rate      DEFAULT 3;     Data collection rate
INPUT #do_res      DEFAULT 1;     If !=0 then print resonance scan
INPUT #base_time   DEFAULT 300;   Length of baselines in seconds
INPUT #buf_vol[1]  DEFAULT 45;    Volume buffer left in CELL 1 after washing
INPUT #buf_vol[2]  DEFAULT 45;    Volume buffer left in CELL 2 after washing
INPUT #reg_time    DEFAULT 120;   Length of regeneration step
BEGIN

CALL IAEQUILIBRATION[#cell_no, #equil_time, #stir_rate, #inst_temp,
[#buf_vol]]
CALL IAINSTRUMENT_GO[#cell_no, #b_rate, #do_res]
WAIT #base_time SECONDS
IF #cell_no >2 THEN
READ ANGLE 1 INTO immobase[1]
READ ANGLE 2 INTO immobase[2]
ELSE
READ ANGLE #cell_no INTO immobase[#cell_no]

```

```

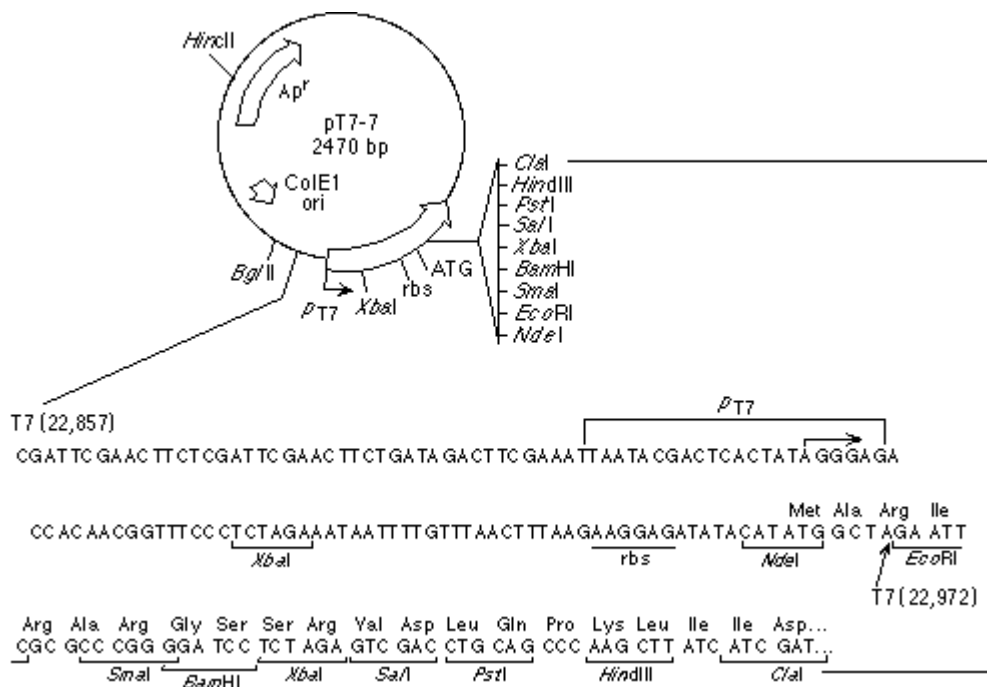
ENDIF
CALL IAPRETREATMENT[#cell_no, #num_pretreat, #base_time, #reg_time,
[#buf_vol], [immobase], #b_rate]
CALL IAINSTRUMENT_STOP[#cell_no, #do_res, #title$]
STATUS "EXPERIMENT HAS FINISHED, CELL SAVE MODE IN OPERATION"
CALL IACELL_SAVE[#cell_no, 100, 60*60, [#buf_vol]]

END

```

7.8 Plasmidkarten

pT7-7:

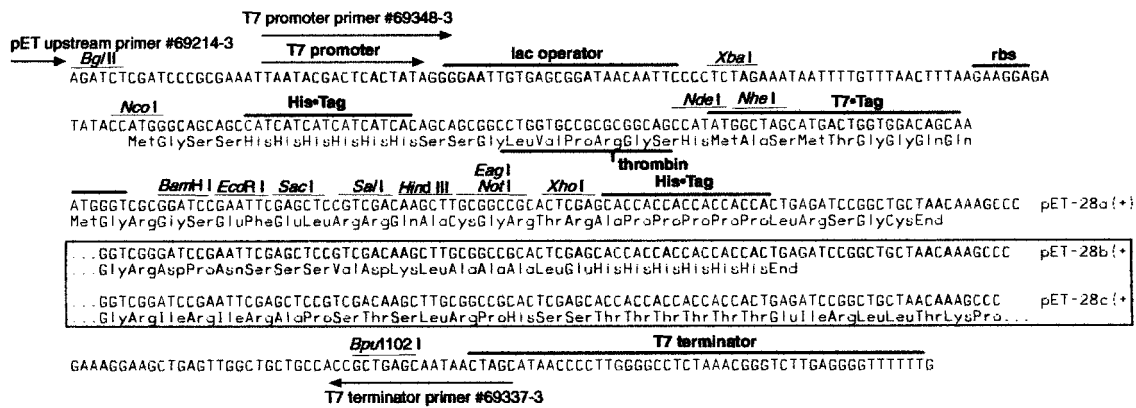
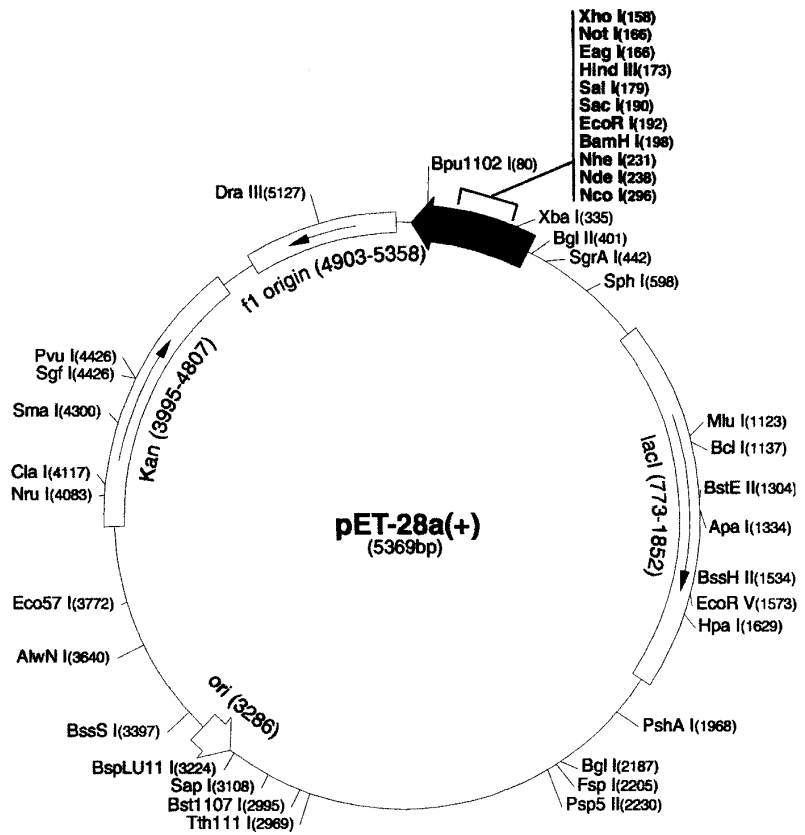


pET-28a(+), pET-28b(+), pET-28c(+):

pET-28a(+) sequence landmarks

T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (<i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198.



Danksagung

Danken möchte ich Herrn Dr. D. Bossemeyer für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. E. K. Pistorius gilt mein Dank für ihre Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten und vor der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld zu vertreten.

Herrn Prof. Dr. V. Kinzel möchte ich meinen Dank aussprechen für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung für Pathochemie am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg anfertigen zu können.

Herr Dr. R. A. Engh hat die Röntgenstrukturanalysen für diese Arbeit durchgeführt. Für diese Kooperation möchte ich ihm meinen Dank aussprechen.

Frau Dr. J. Reed und Herrn Dr. D. Kübler danke ich für wertvolle Ratschläge und Diskussionen.

Für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen und die gute Zusammenarbeit möchte ich Herrn Andreas Schlosser danken.

Frau Angelika Lampe, Herrn Norbert König und Herrn James Richards danke ich für die Hilfsbereitschaft im Laboralltag.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Anna Lisa Picciolo für die kollegiale Zusammenarbeit sowie für ihre tatkräftige Unterstützung.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Pathochemie sowie den Kollegen der Zentralen Spektroskopie danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Geraldine Friedrich möchte ich meine Dank aussprechen für ihr großes Verständnis und für ihre stete moralische Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die mich in jeder Situation vorbehaltlos und in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

Erklärung

Ich versichere, diese Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die genannten Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Thorsten Schneider

Heidelberg, Januar 2002

