

## Petra Censarek: Kritische Aminosäurepositionen für die Bindung von ApoCalmodulin an die Stickoxidsynthase Typ I und II. 2001

Calmodulin (CaM) ist ein ubiquitäres  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensorprotein aus der Familie der EF-Hand-Proteine. In seiner  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Form reguliert es eine Vielzahl von Signalwegen. Aber auch die Interaktion von  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem CaM (ApoCaM) mit Zielproteinen ist möglich und wird wahrscheinlich in ihrer physiologischen Bedeutung unterschätzt.

Die drei Isoformen der Stickoxidsynthasen (NOS) benötigen CaM als Cofaktor zur Synthese von Stickoxid und besitzen ein klassisches  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Bindungsmotiv. Während die beiden Isoformen I und III  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig durch CaM aktiviert werden, zeigt die NOS-II auch in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  Aktivität.

Bei einem Vergleich der CaM-Bindungssequenzen der NOS-I und NOS-II fielen vier nicht konservative Aminosäureaustausche an den Positionen 3, 6, 9 und 13 des CaM-Bindungs-motives (NOS-I : AS 731-744; NOS-II : AS 509-522) auf. Um deren Bedeutung für die CaM-Bindung der beiden Isoformen zu untersuchen, wurden Peptidmutanten der CaM-Bindungsstellen, sowie Mutanten der Enzyme hergestellt, bei denen die vier Aminosäuren einzeln oder in Gruppen reziprok ausgetauscht waren.

In den Peptidstudien stellte sich heraus, daß der Austausch der Position 6 in der NOS-I-Sequenz ausreichte, um eine ApoCaM-Bindungsstelle zu erzeugen. Weitere Austausche an den Positionen 3, 9 und 13 erhöhten die Affinität zu ApoCaM. Die Mutationen der NOS-II-Sequenz bewirkten eine Affinitätsabnahme zu ApoCaM. Nur das NOS-II-Peptid mit einer Einzelmutation an Position 6 band weder an  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM noch an ApoCaM. Auf die Affinität der Peptide zu  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM hatten die Mutationen einen geringeren Einfluß.

Ein deutlicher Unterschied zeigte sich in der Thermodynamik der  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM- und ApoCaM-Peptid-Bindung. Die Bindung der NOS-Peptide an ApoCaM war entropisch, die Bindung an  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM dagegen enthalpisch getrieben.

Klassische ApoCaM-Bindungsmotive (IQ-Motive) weisen an Position 6 eine hoch konservierte positive Ladung auf. Diese positive Ladung findet sich auch in der NOS-II-CaM-Bindungssequenz und scheint für die Bindung an ApoCaM eine große Rolle zu spielen. Durch eine niedrigere Hydrophobizität besonders im N-terminalen Bereich des NOS-II-Bindungs-motives nimmt die Affinität zu ApoCaM scheinbar ab. Die Interaktion zu ApoCaM scheint wie bei IQ-Motiven über den N-terminalen Bereich der Bindungssequenz zu erfolgen.

Die Auswirkungen der Mutationen auf die Aktivität der heterolog exprimierten NOS waren weniger deutlich. Es bestand kein signifikanter Unterschied in den Enzymaktivitäten in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ .

---

Calmodulin (CaM) is a ubiquitous  $\text{Ca}^{2+}$ -sensorprotein, which belongs to the superfamily of EF-hand-proteins. In its  $\text{Ca}^{2+}$  bound form it regulates a variety of signalling pathways and cellular processes. The  $\text{Ca}^{2+}$  free form (ApoCaM) also binds to some target proteins and its physiological role has long been underestimated.

The nitric oxide synthase (NOS) isoforms all have a classical  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM binding motif and need CaM as a cofactor for nitric oxide synthesis. Both, NOS-I and NOS-III are activated by CaM in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent way, whereas NOS-II binds to CaM even in absence of  $\text{Ca}^{2+}$ .

Comparing the CaM-binding sites of NOS-I and NOS-II, four non conservative amino acid exchanges at positions 3, 6, 9, and 13 of the CaM-binding motif (NOS-I : aa 731-744; NOS-II : aa 509-522) become evident. To investigate their role in the CaM-binding of both isoforms, peptides of the CaM-binding sites with reciprocally exchanged amino acids were synthesized. Enzyme-mutants with the same exchanges were also constructed.

CaM-binding studies with the peptides revealed, that the exchange of position 6 in the NOS-I CaM-binding site results in ApoCaM binding. Further exchanges at positions 3, 9, and 13 enhanced

the affinity for ApoCaM. Mutations at the critical positions in the NOS-II CaM-binding site resulted in a decrease of ApoCaM affinity. The peptide with a single mutation at position 6 bound neither ApoCaM nor  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM.

A striking difference lay in the thermodynamic of peptide CaM-binding. The binding of NOS peptides to  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM was enthalpically favoured, whereas the binding to ApoCaM was entropically driven. Classical ApoCaM-binding motifs (IQ-motifs) show a highly conserved positive charge at position 6. This positive amino acid is also found in the NOS-II CaM-binding sequence and appears to be decisive for ApoCaM binding. Decrease of the NOS-II CaM-binding site's hydrophobic character especially in the N-terminal part leads to an decrease in ApoCaM affinity. The N-terminal part of the motif seems to be responsible for ApoCaM-interaction, as it is the case for IQ-motifs.

The mutations had no significant effect on the  $\text{Ca}^{2+}$  dependent activation of heterologously expressed enzymes.