

**Untersuchung von
p38 α MAP-Kinase/Inhibitor-Komplexen
in Lösung mittels
Kernresonanzspektroskopie**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Valerie Simone Honndorf
aus Buchen im Odenwald**

Marburg/Lahn 2008

Vom Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 22.08.2008 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. G. Klebe

Zweitgutachter: Prof. Dr. C. Griesinger

Tag der mündlichen Prüfung am **10.10.2008**

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abbildungsverzeichnis | I |
| Tabellenverzeichnis | III |
| Zusammenfassung | VII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Allgemeine Mechanismen der Signalübertragung | 1 |
| 1.1.1 Signalübertragung durch Rezeptoren | 1 |
| 1.1.2 Intrazelluläre Signalübertragung und Proteinkinasen | 4 |
| 1.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinase - Signaltransduktionskaskaden | 6 |
| 1.2.1 Signaltransduktionskaskaden | 6 |
| 1.2.2 Struktur der MAP-Kinasen | 9 |
| 1.2.3 Die MAP-Kinase-Kaskaden ERK, JNK und p38 | 13 |
| 1.3 Mechanismus und Inhibierung der p38 MAP-Kinasen | 17 |
| 1.3.1 Aktivierungsmechanismus der Kinasen | 17 |
| 1.3.2 p38 α MAPK und ihre Inhibitoren | 24 |
| 1.3.3 NMR und Docking | 32 |
| 1.3.4 Zielsetzung der Arbeit | 34 |
| 2 Material und Methoden | 37 |
| 2.1 Verwendete Materialien | 37 |
| 2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide | 37 |
| 2.1.2 Oligonukleotide für die Mutagenese und Klonierung | 39 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 2.1.3 | Medien und Antibiotika | 39 |
| 2.1.4 | Puffer und Lösungen | 41 |
| 2.1.5 | Enzyme und Chemikalien | 43 |
| 2.1.6 | Materialien | 44 |
| 2.1.7 | Software | 45 |
| 2.2 | Methoden | 46 |
| 2.2.1 | Molekularbiologische Verfahren | 46 |
| 2.2.2 | Proteinexpression und Reinigung | 50 |
| 2.2.3 | Kernresonanzspektroskopie | 56 |
| 2.2.4 | Docking Experimente | 62 |
| 3 | Ergebnisse | 65 |
| 3.1 | Herstellung des Proteins p38 α MAP-Kinase | 65 |
| 3.1.1 | Klonierung und Transformation von p38 α | 65 |
| 3.1.2 | Expression und Reinigung von p38 α aus <i>E. coli</i> | 67 |
| 3.2 | Sequenzspezifische Resonanzzuordnung | 74 |
| 3.2.1 | Experimente zur Zuordnung der Proteinrückgrat-Resonanzen der unkomplexierten und Inhibitor-gebundenen p38 α MAP-Kinase | 74 |
| 3.3 | Charakterisierung der Inhibitoren | 88 |
| 3.3.1 | Charakterisierung von SB203580 | 89 |
| 3.3.2 | Charakterisierung von NR243 | 93 |
| 3.3.3 | Klassifizierung der Inhibitoren anhand des DFG-Motivs | 98 |
| 3.4 | Residuale dipolare Kopplungen (RDC) | 100 |
| 3.4.1 | Residuale dipolare Kopplungen von unkomplexiertem p38 α | 100 |
| 3.4.2 | Residuale dipolare Kopplungen von Inhibitor-gebundenem p38 α | 102 |
| 3.5 | Bestimmung der Inhibitorbindestellen aus NOE-Korrelationen | 103 |
| 3.5.1 | NOE-Korrelationen zwischen p38 α und SB203580 | 104 |
| 3.5.2 | NOE-Korrelationen zwischen p38 α und NR243 | 108 |
| 3.6 | HADDOCK als Docking-Werkzeug zur Darstellung des p38 α /NR243-Komplexes | 113 |
| 4 | Diskussion | 117 |
| 4.1 | Optimierung der Proteinreinigung der p38 α MAP-Kinase | 117 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.2 | Spezifische Resonanzzuordnung der freien sowie Inhibitor-gebundenen p38 α - Formen | 119 |
| 4.2.1 | Vollständigkeit der Resonanzzuordnungen von unkomplexiertem p38 α | 119 |
| 4.2.2 | Vollständigkeit der Resonanzzuordnungen der p38 α /SB203580- und p38 α /NR243-Komplexe | 120 |
| 4.3 | Messung residueller dipolarer Kopplungen | 123 |
| 4.3.1 | Vergleich der RDCs der <i>Hinge Region</i> von freiem p38 α mit p38 α im Komplex mit Wasserstoffbrückenakzeptoren | 123 |
| 4.3.2 | Die Kristallstrukturen von p38 α /Wasserstoffbrückenakzeptor- Komplexen | 124 |
| 4.4 | Komplexstrukturbestimmung mit NMR, Kristallstruktur und Docking mit HADDOCK | 129 |
| 4.4.1 | Der p38 α /SB203580-Komplex | 129 |
| 4.4.2 | Der p38 α /NR243-Komplex | 131 |
| 4.5 | Zusammenfassung und Ausblick | 134 |
| 4.5.1 | Methode der Strukturlösung mit spezieller Markierungstechnik und Modelling | 134 |
| 4.5.2 | Bindung verschiedener Inhibitoren und Verhalten der Proteinbindetasche - <i>conformational sampling</i> | 136 |
| 5 | Anhang | 139 |
| 5.1 | Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole | 139 |
| 5.2 | Ein- und Dreibuchstaben-Aminosäure-Kode | 142 |
| 5.3 | Pulsprogramm des ¹⁵ N-unterdrückten (¹ H, ¹ H)-NOESY | 143 |
| | Literaturverzeichnis | 146 |
| | Danksagung | 165 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|--|----|
| 1.1 | Signaltransduktion in Zellen | 2 |
| 1.2 | Eukaryotischer Proteinkinasebaum | 5 |
| 1.3 | Signaltransduktion in der MAP-Kinase-Kaskade | 8 |
| 1.4 | Kristallstruktur von freiem p38 α | 10 |
| 1.5 | Überlagerung der Kristallstrukturen von p38 α und ASK1 | 11 |
| 1.6 | Überlagerung der Kristallstrukturen von p38 α und Abl Kinase | 12 |
| 1.7 | p38 MAP-Kinase-Kaskade | 16 |
| 1.8 | Wichtige katalytische Motive veranschaulicht in der Kristallstruktur von freiem p38 α | 18 |
| 1.9 | Kristallstruktur von PKA im aktivierten Zustand | 19 |
| 1.10 | Bindetasche der Kristallstruktur von PKA im aktivierten Zustand | 20 |
| 1.11 | Bindestellen am Beispiel von p38 α | 23 |
| 1.12 | p38 α im Komplex mit SB203580 | 25 |
| 1.13 | Überlagerung der p38 α /SB203580-Komplexstruktur mit freiem p38 α | 26 |
| 1.14 | Struktur des Inhibitors VX745 | 27 |
| 1.15 | p38 α im Komplex mit BIRB796 | 28 |
| 1.16 | Vergleich der Komplexstrukturen von p38 α /SB203580 und p38 α /BIRB79 | 29 |
| 1.17 | Darstellung der beiden Inhibitoren NR243 und JH256 | 31 |
| 2.1 | Vektorbild der für p38 α kodierenden DNA in pET16b-TEV | 38 |
| 3.1 | Agarosegel nach Amplifikation | 66 |
| 3.2 | (¹⁵ N- ¹ H)-TROSY-HSQC-Spektrum von protoniertem, ¹⁵ N-markiertem p38 α | 67 |
| 3.3 | SDS-Gel nach Ni-NTA-Aufreinigung | 70 |
| 3.4 | Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie von p38 α | 70 |

| | | |
|------|--|-----|
| 3.5 | Chromatogramme der Anionenaustauschchromatographie von p38 α -Proben mit und ohne Koexpression der Phosphatase YopH | 71 |
| 3.6 | Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie von p38 α | 72 |
| 3.7 | (¹⁵ N- ¹ H)-TROSY-HSQC von perdeutertem, ¹⁵ N-markiertem p38 α | 73 |
| 3.8 | Streifen der C α -H ^N -Ebene des TROSY-HNCA von unkomplexiertem p38 α | 76 |
| 3.9 | Überlagerung der (¹⁵ N- ¹ H)-TROSY-HSQC-Spektren von uniform markiertem und selektiv His/Leu-markiertem p38 α | 78 |
| 3.10 | Überlagerung eines (¹⁵ N- ¹ H)-TROSY-HSQC- und eines HN(CO)-Spektrums von selektiv Leu/Met-markiertem unkomplexiertem p38 α | 79 |
| 3.11 | (¹⁵ N- ¹ H)-TROSY-HSQC-Spektrum von unkomplexiertem p38 α | 81 |
| 3.12 | Ausschnitt aus dem (¹⁵ N- ¹ H)-TROSY-HSQC-Spektrum von unkomplexiertem p38 α | 82 |
| 3.13 | Überlagerung der (¹⁵ N- ¹ H)-TROSY-HSQC-Spektren von Histidin/Leucin-markiertem, unkomplexiertem und SB203480-gebundenem p38 α | 84 |
| 3.14 | Überlagerung der HN(CO)-Spektren von Leucin/Methionin-markiertem unkomplexiertem und SB203580-gebundenem p38 α | 85 |
| 3.15 | Überlagerung der (¹⁵ N- ¹ H)-TROSY-HSQC-Spektren von Histidin/Leucin-markiertem, unkomplexiertem und NR243-gebundenem p38 α | 87 |
| 3.16 | Überlagerung der HN(CO)-Spektren von Leucin/Methionin-markiertem, unkomplexiertem und NR243-gebundenem p38 α | 88 |
| 3.17 | 1D ¹ H-Spektrum von SB203580 | 89 |
| 3.18 | (¹³ C- ¹ H)-HSQC-Spektrum von SB203580 | 90 |
| 3.19 | (¹³ C- ¹ H)-HBMC-Spektrum von SB203580 | 91 |
| 3.20 | (¹ H- ¹ H)-NOESY-Spektrum von SB203580 | 92 |
| 3.21 | 1D ¹ H-Spektrum von NR243 | 94 |
| 3.22 | (¹³ C- ¹ H)-HSQC-Spektrum von NR243 | 95 |
| 3.23 | (¹³ C- ¹ H)-HMBC-Spektrum von NR243 | 96 |
| 3.24 | (¹ H- ¹ H)-NOESY-Spektrum von NR243 | 97 |
| 3.25 | (¹⁵ N- ¹ H)-TROSY-HSQC-Spektren einer Phenylalanin-markierten Probe von p38 α im Komplex mit NR243 und BIRB796 | 99 |
| 3.26 | RDC-Fit der freien Form von p38 α | 101 |
| 3.27 | RDC-Fits der Komplexstrukturen | 102 |

| | | |
|------|--|-----|
| 3.28 | (^1H - ^1H)-NOESY-Spektrum von selektiv Leucin-protoniertem p38 α im Komplex mit SB203580 | 104 |
| 3.29 | (^1H - ^1H)-NOESY-Spektrum von selektiv Threonin-protoniertem p38 α im Komplex mit SB203580 | 107 |
| 3.30 | (^1H - ^1H)-NOESY-Spektrum von selektiv Leucin-protoniertem p38 α im Komplex mit NR243 | 109 |
| 3.31 | (^1H - ^1H)-NOESY-Spektrum von selektiv Threonin-protoniertem p38 α im Komplex mit NR243 | 110 |
| 3.32 | (^1H - ^1H)-NOESY von selektiv Tyrosin-protoniertem p38 α im Komplex mit NR243 | 112 |
| 3.33 | Die drei besten Modellstrukturen von NR243 in der Bindetasche von p38 α | 114 |
| 3.34 | Drei beste Modellstrukturen von NR243 in der Bindetasche von p38 α . . . | 115 |
| 4.1 | Vollständigkeit der Resonanzzuordnung von unkomplexiertem p38 α verdeutlicht an der Kristallstruktur des Komplexes p38 α /SB203580 | 120 |
| 4.2 | Vollständigkeit der Resonanzzuordnung von p38 α im Komplex mit SB203580 und NR243 verdeutlicht an der Kristallstruktur des p38 α /SB203580-Komplexes | 122 |
| 4.3 | Inhibitoren mit Wasserstoffbrückenakzeptoren | 124 |
| 4.4 | Überlagerung der Kristallstrukturen 1OVE.pdb, 1OUY.pdb und 1M7Q.pdb | 125 |
| 4.5 | Einzeln dargestellte Ausschnitte der Bindetasche der Kristallstrukturen 1OVE.pdb, 1OUY.pdb und 1M7Q.pdb | 126 |
| 4.6 | Peptid-Flip der <i>Hinge Region</i> bei Met 109 und Gly 110 in der Kristallstruktur 1OUY.pdb | 127 |
| 4.7 | Peptid-Flip der <i>Hinge Region</i> bei Met 109 und Gly 110 in der Kristallstruktur 1KV2.pdb | 128 |
| 4.8 | Beispiel einer Komplexstruktur nach Docking-Berechnungen | 133 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|------|---|-----|
| 2.1 | Verwendete Bakterienstämme | 37 |
| 2.2 | Verwendete Plasmide | 38 |
| 2.3 | Verwendete Mutageneseprimer | 39 |
| 2.4 | Medien und Antibiotika | 40 |
| 2.5 | Puffer und Lösungen | 41 |
| 2.6 | Enzyme und Chemikalien | 43 |
| 2.7 | Laborinstrumente | 44 |
| 2.8 | Verwendete Software | 45 |
| 2.9 | Modifiziertes M9-Minimalmedium | 51 |
| 2.10 | SDS-PAGE-Gel Zusammensetzung | 55 |
| 2.11 | Akquisitions- und Prozessierungsparameter der NMR-Experimente | 58 |
| 3.1 | Nicht zugeordnete Aminosäuren der Lösungsstruktur 6468 von p38 α | 77 |
| 3.2 | Nicht zugeordnete Aminosäuren | 80 |
| 3.3 | Docking-Protokoll | 114 |

Zusammenfassung

Zur Entwicklung potentieller Arzneistoffe ist eine genaue Kenntnis des Bindungsverhaltens eines Inhibitors im Zielprotein notwendig. Einige Proteine lassen sich im Komplex mit potentiellen Inhibitoren kristallisieren und deren Bindungsweise erforschen. In Lösung dagegen findet man das Protein eher in seinem natürlichen dynamischen Verhalten als im Kristall, so dass eine Strukturlösung eines Protein-Inhibitor-Komplexes mittels NMR nicht nur einen Aufschluss über die Struktur gibt, sondern auch über die Änderung des dynamischen Verhaltens im Vergleich zu freiem Protein in Lösung.

p38 α MAP-Kinase spielt eine wichtige Rolle in den Wechselwegen, die für die Stressantwort der Zelle zuständig sind, und ist ein wichtiges Zielprotein in der Entwicklung von Inhibitoren, die bei der Behandlung von Krebs, Entzündungen und Autoimmunkrankheiten eingesetzt werden. Aus diesem Grund wurde die Struktur und das dynamische Verhalten des Proteins im Komplex mit zwei verschiedenen Inhibitoren untersucht. SB203580 ist der Prototyp der p38 α -Inhibitoren und NR243 gehört zu einer neuen Gruppe hochselektiver Inhibitoren, die von der Gruppe von Prof. Laufer an der Universität Tübingen synthetisiert und zur Verfügung gestellt wurde und bisher nicht in einer Komplexkristallstruktur mit p38 α in der Proteindatenbank zu finden ist.

Durch eine Vielzahl an α -Helices im Carboxy-Terminus des Proteins, deren Aminosäuren in 2D HSQC-Spektren ähnliche chemische Verschiebungen aufweisen, kommt es zu Überlagerungen, so dass eine Zuordnung dieser Resonanzen erschwert wird. Deshalb wurde die Methode der selektiven Markierung angewendet, so dass sich HSQC- und HN(CO)-Spektren übersichtlicher gestalteten. Auf diese Weise konnten zwischen 60 % (bei den p38 α -Inhibitor-Komplexen) und 71 % (bei freiem p38 α) der Rückgratresonanzen der Aminosäuren im Protein zugeordnet werden.

Desweiteren wurden Messungen residualer dipolarer Kopplungen des freien und Inhibitor-gebundenen Proteins durchgeführt und im Vergleich mit der Kristallstruktur des freien Proteins festgestellt, dass neben der Übereinstimmung der globalen Struktur in Lösung und im Kristall die Hinge Region, die den Amino- und Carboxyterminus von p38 α verbindet, in Lösung anders als im Kristall des freien Proteins vorliegt. Sie nimmt eine Konformation ein, die nur in Kristallstrukturen von Komplexformen der Kinase mit Quinazolinon- bzw. Pyridol-Pyrimidin-Inhibitoren beobachtet wird.

Die Aufnahme intermolekularer *Kern-Overhauser-Effekt*-Wechselwirkungen (NOESY-

Spektren) von selektiv markierten Protein-Inhibitor-Komplexproben sollte es ermöglichen, ohne eine Seitenkettenuordnung die Komplexstrukturen aufzuklären, wobei die Kristallstruktur des p38 α /SB203580-Komplexes als Kontrolle verwendet wurde. Das Ausmaß des NOE-Effekts hängt sehr stark vom Abstand der beiden dipolar-gekoppelten Spins ab, was NOEs zu sehr sensitiven Messinstrumenten von kurzen inter- bzw. intramolekularen Wechselwirkungen macht. Um nun die Anzahl von Störelementen möglichst gering zu halten, wurde p38 α bis auf einen selektiv protonierten Aminosäuretyp, der idealerweise nur vereinzelt in der Bindetasche vorkommt, vollständig perdeutert hergestellt. Die Messung von intermolekularen NOE-Wechselwirkungen von selektiv protonierten Aminosäuren zu Inhibitorprotonen erwies sich als erfolgreich, was die Auswertungen von NOESY-Spektren des p38 α /SB203580-Komplexes bei Markierung von Leucin, Threonin oder Tyrosin im Protein beweisen. Die NOE-Signale bestätigen einerseits, dass die Position des Inhibitors in der Bindetasche im Einklang mit der Kristallstruktur steht, andererseits kann man aber anhand der TROSY-HSQC-Spektren und RDC-Daten von einer Ansammlung verschiedener ähnlicher Komplexstrukturen aufgrund der Beweglichkeit des Proteins sprechen, wovon die Kristallstruktur nur eine Konformation widerspiegelt. Mit Hilfe eines Intensitätenvergleichs von intramolekularen zu intermolekularen NOE-Signalen, konnten obere Distanzeinschränkungen der entsprechenden Inhibitorprotonen zu den Methylprotonen der Seitenketten bestimmt werden. Diese Distanzen und die Bestimmung der mit dem Inhibitor wechselwirkenden Aminosäuren durch das Ausschlussprinzip, ermöglichte die Modellierung einer Komplexstruktur des p38 α /NR243-Komplexes mit HADDOCK, die ein Ergebnis lieferte.

Es ist also möglich, ohne eine Kristallkomplexstruktur sowie eine vollständige Resonanzzuordnung eines Proteins auf die in dieser Arbeit beschriebene Weise eine Protein-Inhibitor-Struktur zu lösen, wie es hier im Falle des p38 α /NR243-Komplexes gezeigt wurde. Ist das Verfahren etabliert, könnte es eine Alternative zur Kristallographie darstellen oder eine Struktur innerhalb kürzester Zeit zu erhalten, was ein Vorteil beim *Screening* von Inhibitoren ist.

Für meine Mutter

Nicht weil es schwer ist, wagen wir es nicht,
sondern weil wir es nicht wagen, ist es schwer.

(Seneca)

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Allgemeine Mechanismen der Signalübertragung

Eukaryoten regulieren ihre Entwicklung und funktionelle Integrität durch das komplexe Zusammenwirken unterschiedlich differenzierter Zellen. Die Fähigkeit von Zellen sich ihrer Umgebung anzupassen und mit dieser zu interagieren ist ein grundlegender Prozess in der Zellbiologie. Diese Interaktion wird hauptsächlich durch eine Vielzahl von Rezeptoren erreicht, die an der Zelloberfläche exponiert liegen und auf unterschiedliche Art und Weise auf die extrazelluläre Umgebung reagieren.

Durch die Komplexbildung von Signalmolekül und Rezeptor werden intrazelluläre Signalwege aktiviert. Am Ende der Signalübertragung wird die gewünschte Zellantwort durch Expression der erforderlichen Proteine erreicht, wodurch Stoffwechsel und Entwicklung der Zelle beeinflusst werden (Uings & Farrow, 2000). Wird das Signalmolekül wieder vom Oberflächenrezeptor entfernt, erlischt die Signaltransduktion (Lodish, Berk, Zipursky, Matsudaira, Baltimore, & Darnell, 2001).

1.1.1 Signalübertragung durch Rezeptoren

Membranrezeptoren transportieren Informationen durch die Zellmembran ins Innere der Zelle. Es gibt zwar unpolare Signalmoleküle, wie Östrogene, Lipopolysaccharide und andere Steroidhormone, die einfach durch die Zellmembran diffundieren können, an Proteine binden oder direkt mit DNA interagieren, wodurch sie die Transkription modulieren, aber die meisten Signalmoleküle sind zu groß und zu polar, als dass sie die Zellmembran einfach

passieren könnten. Deshalb gibt es ein System, das die Information in die Zelle leitet, ohne dass die Signalmoleküle die Zellmembran passieren müssen.

Solch ein Informationssystem beinhaltet Membranrezeptoren. Dies sind intrinsische Membranproteine, die sowohl eine intra- wie auch eine extrazelluläre Domäne besitzen. An der extrazellulären Domäne befindet sich eine spezifische Bindungsstelle für Signalmoleküle (Ligand, primäre Botenstoffe oder auch *primary messenger*). Die Interaktion des Liganden mit dem Rezeptor induziert eine Veränderung der Tertiär- oder sogar Quartärstruktur des Rezeptors, wodurch in der intrazellulären Domäne Konformationen entstehen, die die Bindungen weiterer Proteine wie z.B. cAMP, cGMP oder Inositoltriphosphat ermöglicht (intrazelluläre Signalmoleküle, sekundäre Botenstoffe oder *second messenger*), wodurch die Signale weitergeleitet und verstärkt werden (Keltner & Gorman, 2007).

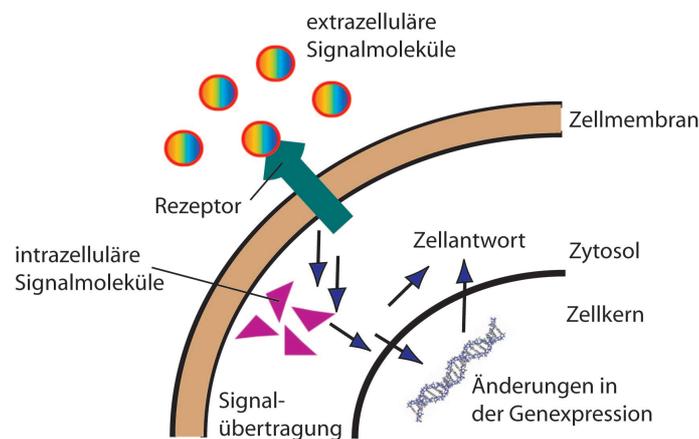


Abbildung 1.1: Schema der allgemeinen Signalweiterleitung. Extrazelluläre Signalmoleküle binden spezifisch an einen Rezeptor. Durch Konformationsänderung des Rezeptors werden intrazelluläre Signalmoleküle (sekundäre Botenstoffe) aktiviert, die durch ihre Vielzahl das Signal verstärken und an verschiedene Proteine weiterleiten, wodurch eine Signalkaskade ausgelöst wird. Im Zellkern wird durch Übertragung des Signals auf spezifische Transkriptionsfaktoren die Expression von Proteinen eingeleitet und somit die Zellantwort vollzogen.

Es gibt verschiedene Arten von Rezeptoren, die auf unterschiedliche Signalmoleküle reagieren. Membranständige, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (*G-protein coupled receptors*, GPCR) sind die größte Gruppe der Rezeptoren, verantwortlich für die Verarbeitung von Licht-, Geruchs- und Geschmacksreizen und spielen eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen, Zellproliferation und -differenzierung (Ji et al., 1998). Sie binden Hormone, wie Adrenalin oder Glucagon, und Neurotransmitter, wie Serotonin und Acetylcholin. Sie

zeichnen sich aus durch sieben membrandurchspannende Helices, die durch Loopregionen unterschiedlicher Länge miteinander verbunden sind und in einer intrazellulären carboxy-terminalen Domäne enden, die das Signal hauptsächlich über heterotrimere G-Proteine ins Zellinnere weiterleiten.

Zytokinrezeptoren reagieren auf Glykoproteine (Zytokine), die zelluläre Prozesse wie Apoptose, Zellwachstum und -teilung regulieren und in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden (Orkin, 1996, Campbell, 1998). Liganden für Typ I Zytokinrezeptoren oder Hämatopoietin-Rezeptoren sind Interleukine (IL) und koloniestimulierende Faktoren (*colony stimulating factor*, CSF). Diese Rezeptoren zeichnen sich durch zwei globuläre extrazelluläre Domänen aus, die eine fassartige Struktur bilden und durch eine *Hinge Region* verbunden sind, die als Ligandenbindetasche fungiert (Theze et al., 1996). Typ II Zytokinrezeptoren sind strukturell ähnlich aufgebaut, binden aber Interferone (IFN; DeMaeyer & DeMaeyer-Guignard, 1998). Typ III Zytokinrezeptoren (*death receptors*) zeichnen sich durch Cystein-reiche extrazelluläre Domänen aus und sind Rezeptoren für Tumornekrosefaktoren (TNF; Smith et al., 1994), und Typ IV Zytokinrezeptoren binden verschiedene Interleukine und besitzen eine extrazelluläre Domäne, die aus drei immunoglobulinartigen Regionen besteht (Colotta et al., 1994).

Desweiteren gibt es spannungsgesteuerte und ligandengesteuerte Ionenkanäle. Bei spannungsgesteuerten Ionenkanälen besteht der Stimulus aus einer Veränderung der Membranspannung, die zu einer Konformationsänderung des Kanals führt (z.B. Calciumionen-Kanäle; Bezanilla, 2000), während ligandengesteuerte Ionenkanäle auf die Bindung eines Signalmoleküls mit der Öffnung des Kanals reagieren, um verschiedene Arten von Ionen, z.B. Chloridionen oder Natriumionen, passieren zu lassen (Swope et al., 1992). Membranständige, Tyrosin-Kinase-gekoppelte Rezeptoren rekrutieren nach der Signalmolekülbindung zytoplasmatische Tyrosinkinasen, die dann zahlreiche weitere Proteine phosphorylieren. Die Kinase-Domäne befindet sich bei Tyrosin-Kinase-gekoppelten Rezeptoren meist nicht am Rezeptor selbst, sondern an einem nicht kovalent-gebundenen Protein. Ein Beispiel einer Signaltransduktion bei Tyrosin-Kinase-gekoppelten Rezeptoren ist der Jak-STAT-Signalweg (*Janus-kinase - signal transducer and activator of transcription - pathway*; Darnell, 1996).

Bei Rezeptor-Tyrosinkinase (RTKs) erfolgt die Aktivierung durch Bindung eines Wachstumsfaktors, da RTKs für die Zellproliferation, Reifung und Funktion der Zelle zuständig sind (Ebert et al., 2000). RTKs zeichnen sich durch eine aminoterminalen,

extrazelluläre Domäne, einer Membranhelix sowie einer carboxyterminalen, intrazellulären Kinasedomäne aus (Hubbard, 1999). Eine Ligandbindung führt zur Homo- bzw. Heterodimerisierung der RTKs, wodurch deren Aktivität gesteigert wird. Es erfolgt eine Autophosphorylierung an zwei Tyrosin- bzw. Threoninresten im Aktivierungsloop der Kinasedomäne, die eine Konformationsänderung nach sich zieht, so dass spezifische Bindungsstellen für intrazelluläre Proteine entstehen (Heldin et al., 1998). Anschließend übertragen RTKs unter ATP-Hydrolyse Phosphatgruppen auf Tyrosin- oder Threoninseitenketten der Substratproteine, wodurch diese aktiviert werden und Bindestellen für weitere Signalmoleküle entstehen. Zu den verschiedenen RTKs gehören der EGF-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*), der Insulin- oder der NGF-Rezeptor (*nerve growth factor receptor*; Wells, 1999). Auch die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges verläuft über Rezeptor-Tyrosinkinase (Kapitel 1.2; Pearson et al., 2001).

1.1.2 Intrazelluläre Signalübertragung und Proteinkinasen

Bei der intrazellulären Signalübertragung spielen verschiedene konservierte Proteine eine Rolle, nachdem diese durch extrazelluläre Signale in einem rezeptorvermittelten Vorgang aktiviert wurden. Dazu gehören die GTPasen, die als Schaltproteine in der Signaltransduktionskette fungieren und durch alternierende Bindung der Nukleotide GDP (inaktivierte GTPase-Aktivität) und GTP (aktivierte GTPase-Aktivität) reguliert werden (Hall, 2000). GTPasen sind involviert in den Aufbau des Zytoskeletts sowie Exo- und Endozytose und den intrazellulären Vesikeltransport. Heterotrimere G-Proteine besitzen beispielsweise eine GTPase-Funktion.

Es gibt Adapterproteine, die als Bindungsstellen für Proteine dienen und somit Multiproteinkomplexe, die so genannten Signalosome, aufbauen. Damit verbinden sie nicht nur Enzym und Substrat innerhalb einzelner Signalwege, sondern koppeln auch ganze Kaskaden aneinander (Takeda et al., 2006).

Außerdem gibt es die Familie der Proteinkinasen, die die Signalweiterleitung in eukaryotischen Zellen übernehmen (Lander et al., 2001). Sie kontrollieren die meisten der intrazellulären Prozesse wie zum Beispiel Zellteilung, Proliferation, Transkription oder Apoptose, nachdem sie durch Phosphorylierung aktiviert wurden. Ihre Fähigkeit zur Phosphorylierung weiterer Substratproteine spielt eine wichtige Rolle bei intrazellulärer Kommunikation, physiologischer Antwort und fehlerfreiem Arbeiten des Nerven- und

Immunsystems (Manning et al., 2002). Da Proteinkinasen an dieser Vielzahl von Prozessen beteiligt sind, sind sie auch in die Entstehung vieler Krankheitsbilder wie Krebs, Diabetes oder Entzündungen involviert, was sie zu einem wichtigen Ziel für die Entwicklung von Medikamenten macht (Cohen, 2002). Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms hat die Existenz von mehr als 500 Proteinkinasen enthüllt (Manning et al., 2002). Abb. 1.2 zeigt den eukaryotischen Proteinkinasebaum und eine Hervorhebung der MAP-Kinasen.

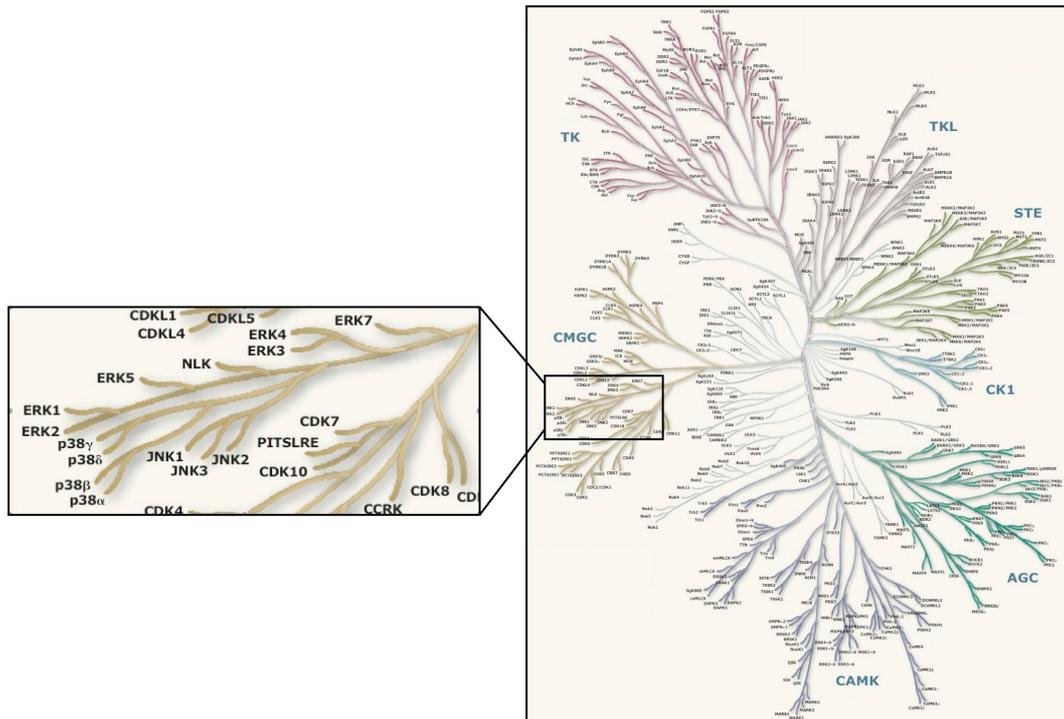


Abbildung 1.2: Eukaryotischer Proteinkinasebaum, auch menschliches Kinom genannt. Der Stammbaum ist in die Kinasefamilien der Tyrosinkinasen (TKs), der Tyrosinkinase-ähnlichen Proteine (TKL), der Homologen der Hefeproteine Steril-7-, Steril-11- und Steril-20-Kinasen (STE), der Caseinkinasen 1 (CK1), der Gruppe der A, G und C Proteinkinasen (AGC), der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen (CAMK) und der Gruppe von Zyclin-abhängigen Proteinkinasen, MAP-Kinasen, Glykogen-Synthase-Kinase 3-Familie, der Clk-Familie und der Casein-Kinase 3-Familie (CMGC) eingeteilt. Hervorgehoben ist der Teil der CMGC-Familie, der die MAP-Kinasen enthält (Kapitel 1.2; Manning et al., 2002).

Alle diese Enzyme benötigen ATP zur Phosphorylierung spezifischer Serin-, Threonin- und Tyrosinreste ihrer Substratproteine (Yoon & Seger, 2006). Außerdem wird die Proteinkinase selbst durch Phosphorylierung an spezifischen Resten aktiviert. Das bedeutet, dass alle Mitglieder der unterschiedlichen Kinasefamilien denselben katalytischen Mechanismus

aufweisen und da die Kinasedomäne strukturell konserviert ist, stellt die Entwicklung von Inhibitoren, die spezifisch an eine bestimmte Kinase binden, eine Herausforderung dar (Kapitel 1.2). Trotzdem sind bereits erfolgreich niedermolekulare Verbindungen als Medikamente entwickelt worden, wie zum Beispiel Gleevec (Imatinib) zur Behandlung chronisch myeloider Leukämie (*chronic myeloid leukemia*, CML) und Magen-Darm-Gewebetumoren (*gastrointestinal stromal tumors*, GIST) oder Iressa (Gefitinib) und Tarceva (Erlotinib) zur die Behandlung von Lungenkrebs (Sawyers, 2004, Dowell et al., 2005).

Eine Inaktivierung von Kinasen wird durch die Entfernung der zuvor an die beiden Serin-, Threonin- bzw. Tyrosinreste gebundenen Phosphatreste durch spezifische Phosphatasen herbeigeführt. Es gibt insgesamt ca. 140 Phosphatasen. Die größte Familie ist die der Proteintyrosin-Phosphatasen (PTPs), die nur Tyrosinreste dephosphoryliert. Dazu gehört unter anderem die Unterfamilie der dualspezifischen Phosphatasen, die sowohl Tyrosin- als auch Serin- und Threoninreste dephosphoryliert. Die zweite große Familie ist die der Serin-, Threonin-Proteinphosphatasen, die durch die Unterfamilien der Metall-bindenden Phosphatasen und der haloaciden Dehalogenasen repräsentiert wird (Almo et al., 2007). Die Aktivierung bzw. Deaktivierung der Kinasen und deren Substratproteine durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung erlaubt eine transiente, hochkontrollierte Signalweiterleitung sowie -verstärkung in der Zelle.

1.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinase - Signaltransduktionskaskaden

1.2.1 Signaltransduktionskaskaden

Proteinkinasen und andere Übertragungssysteme bilden ein hochkompliziertes Kommunikationsnetz, um die Funktionstüchtigkeit der Zellen in einem Organismus zu sichern. In diesem Repertoire der Signalübertragungen gibt es eine Klasse von Proteinkinase-Kaskaden, die so genannten Mitogen-aktivierten Protein-Kinase-Module (MAPK; Gustin et al., 1998). Diese Kaskaden enthalten mindestens drei nacheinander geschaltete Proteinkinasen, von denen nur die letzte Kinase der Kaskade zur CMGC-Familie der MAP-Kinasen gehört, während die anderen Kinasen zur STE-Familie zählen (Kinasestammbaum Abb. 1.2). MAP-Kinasen spielen die wichtigste Rolle in Signalwegen,

die Embryogenese, Zellteilung, Proliferation und Apoptose kontrollieren.

Alle MAP-Kinasen werden durch Phosphorylierung an zwei Resten, einem Serin- und einem Threonin- bzw. Tyrosinrest, aktiviert. Diese Reste sind durch eine Aminosäure voneinander getrennt und befinden sich im so genannten Aktivierungsloop der Kinase. Die phosphorylierte MAP-Kinase aktiviert anschließend selbst unterschiedliche Substratproteine durch Phosphorylierung an Serin- und Threonin- bzw. Tyrosinresten (Abb. 1.4). Zu diesen Substratproteinen gehören zum Beispiel Transkriptionsfaktoren im Zellkern, die die Expression wichtiger Proteine steuern, welche wiederum für den Zellzyklus und die Zelldifferenzierung von entscheidender Bedeutung sind (Johnson & Lapadat, 2002).

Die Aktivierung einer klassischen MAP-Kinase-Kaskade (Abb. 1.3) wird eingeleitet, nachdem bestimmte Rezeptoren, z.B. RTKs und GPCRs, im aktiven Zustand die Bildung von Multiproteinkomplexen initiierten, die die Signalübertragung in Gang setzen. Teil dieses Aktivierungsprozesses sind sowohl kleine als auch heterotrimere G-Proteine, die für die Aktivierung der Kinase-Kaskaden zuständig sind (Vojtek & Cooper, 1995). Aktivierung der Kinase-Kaskaden durch extrazelluläre Signale kann jedoch auch ohne die Hilfe der Rezeptoren erfolgen, wie z.B. durch inflammatorische Zytokine, Lipopolysaccharide, Strahlung, Hitzeschock, reaktive Sauerstoffspezies und andere Stressfaktoren (Pawson & Scott, 1997). Obwohl die klassische MAP-Kinase-Kaskade aus drei hintereinander geschalteten Kinasen besteht, gibt es eine Reihe von Kinasen, die als MAP-Kinase-Kinase-Kinase-aktivierende Kinasen und viertes Glied in der Kaskade diskutiert werden (Diener et al., 1997, Su et al., 1997).

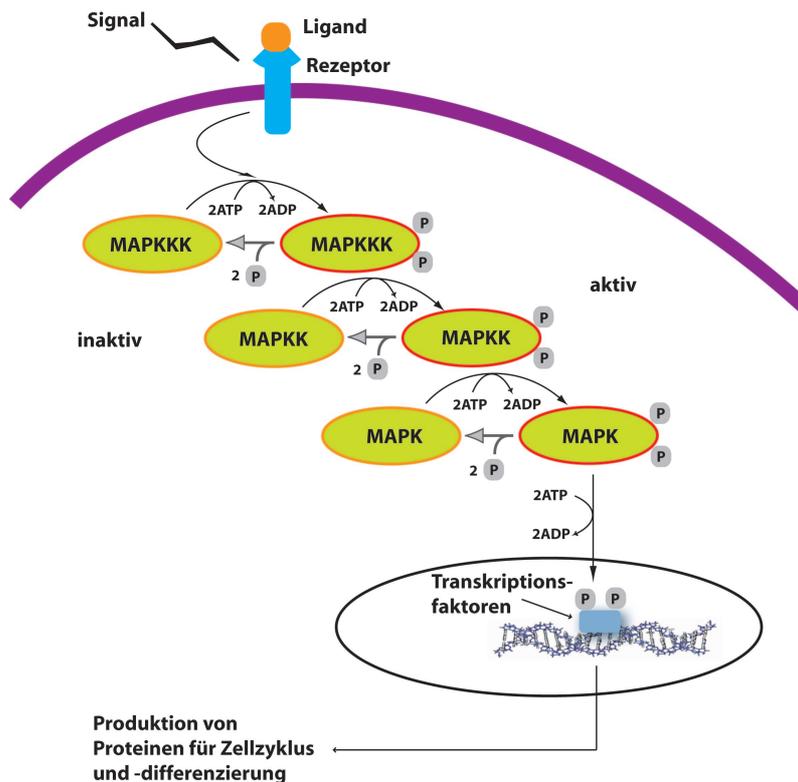


Abbildung 1.3: Aufbau einer klassischen MAP-Kinase-Kaskade. Die Kaskade wird durch ein extrazelluläres Signal (Strahlung, Hitzeschock, Zytokine und andere Stressfaktoren) oder über die Liganden bestimmter Rezeptoren (zum Beispiel GPCRs) aktiviert. Eine Kinase aktiviert jeweils die nächste in der Kaskade durch Phosphorylierung an zwei Serin- und Threonin- bzw. Tyrosinresten. Am Ende der Kaskade phosphoryliert eine MAP-Kinase verschiedene Transkriptionsfaktoren, die die Expression von Proteinen einleiten, die bei Entzündungen, Zellteilung, Proliferation und Apoptose eine wichtige Rolle spielen. Dephosphoryliert und somit inaktiviert werden die Kinasen durch verschiedene Phosphatasen.

Der Signalweg beginnt mit der Aktivierung einer MAPKK-Kinase (MAP-Kinase-Kinase-Kinase oder auch *mitogen activated extracellular signal regulated kinase kinase*, MEK-Kinase) durch deren Phosphorylierung an einem Tyrosin- und einem Threoninrest (Abb. 1.3). Die aktivierten MAPKK-Kinasen phosphorylieren wiederum MAPK-Kinasen (oder auch MEK) an einem Serin- und einem Threoninrest, die dadurch ebenfalls aktiviert werden (Alessi et al., 1994). MAPK-Kinasen sind entgegen der MAPKK-Kinasen bispezifische Proteinkinasen, die neben Serin- und Threonin- auch Tyrosinreste phosphorylieren können (Yoon & Seger, 2006). Sie aktivieren schließlich die MAP-Kinasen ERK (*extracellular signal-regulated kinase*; Kapitel 1.2.3.1), JNK (*c-Jun-N-terminale Kinase*

bzw. Stress-aktivierte Proteinkinase; Kapitel 1.2.3.2) und p38 (Kapitel 1.2.3.3) durch Phosphorylierung an zwei Threonin- und Tyrosinresten (Seger et al., 1992).

Die Lokalisierung und Interaktion von MAP-Kinasen wird stark beeinflusst von Gerüstproteinen. Zusätzlich zu den Hauptkaskadekomponenten (MAP-Kinasen, MAPK-Kinasen und MAPKK-Kinasen) werden Adapterproteine zur Bildung von Multiproteinkomplexen benötigt, die eine effiziente Interaktion zwischen den verschiedenen Kinasen ermöglichen (Morrison & Davis, 2003). Adapterproteine können die jeweils bindende Kinase auf verschiedene Arten beeinflussen. Zum Beispiel verursachen sie allosterische Konformationsänderungen der Kinase, welche die Aktivierung durch Nachahmung des aktiven Zustandes erleichtern sollen. Sie bewirken erhöhte Substrataffinität, platzieren die Kinasen an wichtigen Orten der Signalweiterleitung in der Zelle und regulieren deren Inaktivierung (Yasuda et al., 1999).

Die regulierte Dephosphorylierung der MAP-Kinasen spielt eine wichtige Rolle in der physiologischen Auswirkung der Signalweiterleitung. Zu diesem Zweck gibt es 10 dual-spezifische Threonin-Tyrosin-MAPK-Phosphatasen (MKPs). MKPs sind entweder sehr spezifisch und inaktivieren nur eine bestimmte Gruppe von MAP-Kinasen (z. B. reguliert die zytoplasmatische Phosphatase MKP3 die ERK-Aktivität; Groom et al., 1996) oder sie dephosphorylieren mehrere MAP-Kinasen (z. B. reguliert die Phosphatase MKP1 sowohl die Aktivität von ERK als auch JNK und p38; Slack et al., 2001). Daher hängt die Signalweiterleitung in den Kaskaden nicht nur von der Phosphorylierung der MAP-Kinasen, sondern auch von der Regulation der MAP-Kinasen durch Phosphatasen ab (Owens & Keyse, 2007).

1.2.2 Struktur der MAP-Kinasen

Im Allgemeinen bestehen alle Kinasen aus zwei Domänen, einer kleineren amino-terminalen mit einem großen Anteil an β -Faltblattstrukturen und einer größeren überwiegend α -helikalen carboxy-terminalen. Im Spalt zwischen den beiden Domänen befindet sich die Substrat- und die ATP-Bindestelle. Die ATP-Bindestelle besteht aus der *Hinge Region* (Abb. 1.4 in grün), die die beiden Domänen miteinander verbindet, der hydrophoben Tasche I (Abb. 1.4 in rot) und dem Glycin-reichen Loop (Abb. 1.4 in blau). Bei MAP-Kinasen befinden sich im Aktivierungsloop die beiden Threonin- und Tyrosinreste, die von einer

in der Kaskade voranstehenden Kinase phosphoryliert werden und so die Aktivierung der Kinase herbeiführen. Im aktiven Zustand binden MAP-Kinasen ATP und ein Proteinsubstrat und übertragen die γ -Phosphatgruppe des ATPs auf Serin- oder Threoninreste des Substrats, die in vielen Fällen benachbart zu einem Prolin liegen (Zhang et al., 1995).

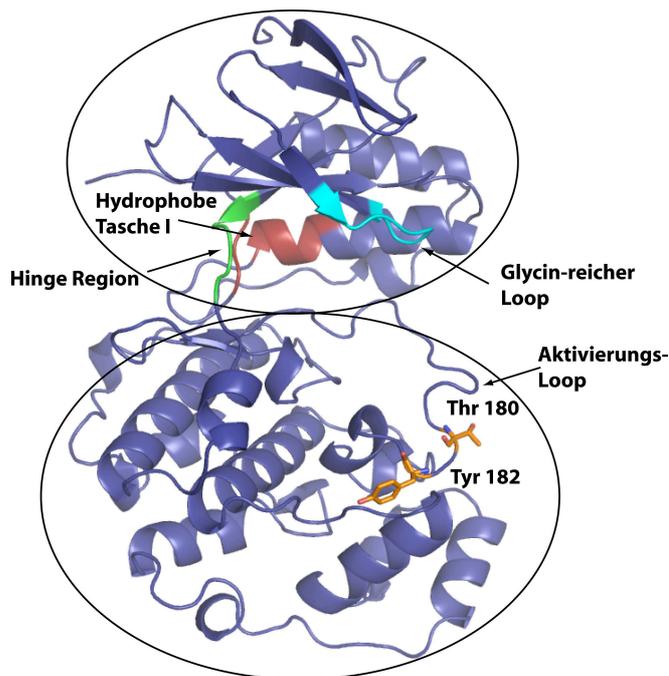


Abbildung 1.4: In der Darstellung der Kristallstruktur 1P38.pdb von freiem p38 α sind die wichtigsten Teile der Kinase hervorgehoben (Wang et al., 1997). Im oberen Teil der Abbildung befindet sich der Amino-Terminus, im unteren Teil der Carboxy-Terminus der Kinase. Wichtige Regionen in der Bindetasche sind der Glycin-reiche Loop (hellblau), die hydrophobe Tasche I (rot) in der aminoterminalen Domäne sowie die *Hinge Region* (grün), die die Verbindung zwischen den beiden Domänen darstellt. Thr 180 und Tyr 182 im Aktivierungsloop werden phosphoryliert, um die Kinase zu aktivieren.

Abbildung 1.4 zeigt die Kristallstruktur der MAP-Kinase p38 α (1P38.pdb, Auflösung 2.1 Å; Wang et al., 1997) als Beispiel für den strukturellen Aufbau dieser Proteinklasse. Die MAP-Kinase p38 α ist mit mehr als 40 Kristallstrukturen in der Proteindatenbank (pdb) vertreten, denn durch ihre äußerst wichtige Rolle in der Regulation der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und dem Zusammenhang erhöhter Zytokinproduktion mit einigen Autoimmunkrankheiten (rheumatoide Arthritis, Diabetes oder der Bowel's Krankheit) ist sie ein Zielprotein für die Entwicklung verschiedenartiger Inhibitoren (Thaimattam et al., 2007).

Wie schon in Kapitel 1.1.2 erwähnt, besitzen alle Kinasen eine sehr ähnliche Struktur. Das soll an zwei Beispielen gezeigt werden. Die Struktur von p38 α (1P38.pdb) wird einerseits mit einer Kinase aus der MAP-Kinase-Kaskade, MAPKK-Kinase 5 oder ASK1 (*Apoptosis-signal regulating kinase 1*), und andererseits mit einer Tyrosinkinase, *Abelson* Tyrosinkinase (Abl), strukturell verglichen (Abb. 1.5 und 1.6).

ASK1 gehört zur Familie der STE-Kinasen und ist eine der ersten Kinasen in den Kaskaden, die für die Aktivierung der JNK- und p38-Kinasen zuständig sind (Kapitel 1.1.2). Sie wird aktiviert durch oxidativen Stress, Zytokine oder Kalziumionen (Matsukawa et al., 2004). Eine Überproduktion an ASK1 kann sowohl Apoptose als auch Zelldifferenzierung je nach den Bedürfnissen der Zelle induzieren und spielt eine wichtige Rolle für Signalweiterleitung bei Entzündungsprozessen (Matsuzawa et al., 2005). In der Bindetasche von ASK1 befindet sich der unselektiv aber hochpotente Proteinkinase-hemmende, ATP-kompetitive Inhibitor Staurosporin.

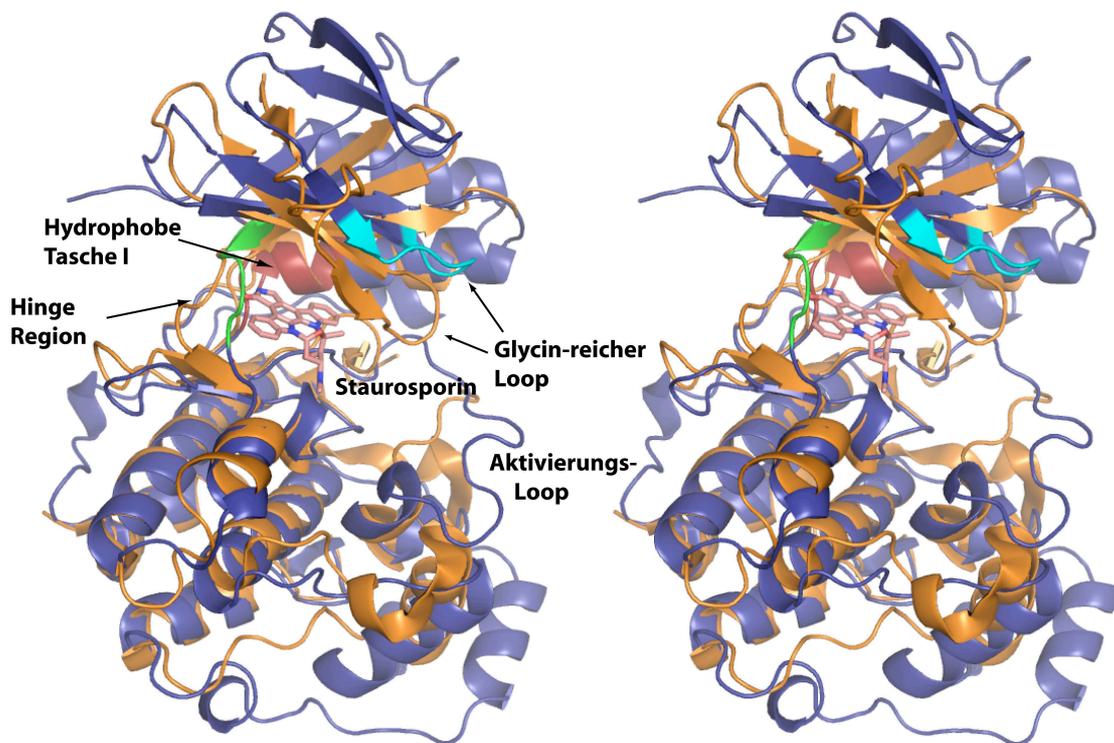


Abbildung 1.5: Überlagerung der beiden Kristallstrukturen von p38 α (1P38.pdb in blau, Wang et al., 1997) und der unphosphorylierten ASK1 (2CLQ.pdb in gold; Bunkoczi et al., 2007). Die Beschriftungen beziehen sich jeweils auf die linke Struktur des Stereobildes und kennzeichnen die wichtigen Bereiche der Kinase an der Struktur 1P38.pdb: den Glycin-reichen Loop (hellblau), die hydrophobe Tasche I (rot) und die *Hinge Region* (grün).

1P38.pdb (Abb. 1.5 in blau) ist die Kristallstruktur des unphosphorylierten, inaktiven p38 α und 2CLQ.pdb (Abb. 1.5 in gold) zeigt die Kristallstruktur der unphosphorylierten Kinase-domäne von ASK1 im Komplex mit dem Inhibitor Staurosporin (Bunkoczi et al., 2007).

Die Sequenzen der beiden Kinasen sind zu 44.6 % identisch. Trotz der nur knapp 50 %igen Sequenzidentität sieht man in Abb. 1.5, dass das Faltungsmuster im Raum fast identisch ist. Die Anordnung der β -Stränge in der Amino-terminalen Domäne variiert nur im Glycin-reichen Loop signifikant. Dieser weist allerdings keine geordnete Sekundärstruktur auf, so dass seine Position meist von Interaktionen mit eventuell gebundenen Liganden und der Kristallpackung abhängt (Raumgruppe $P6_522$ in 2CLQ.pdb mit einer Auflösung von 2.3 Å und $P2_12_12_1$ in 1P38.pdb mit einer Auflösung von 2.1 Å). Die Positionen der *Hinge Regionen* weichen ebenfalls voneinander ab, was jedoch an der Bindung des Inhibitors an ASK1 in 2CLQ.pdb liegen kann. Im Carboxy-Terminus sieht man mit wenigen Ausnahmen die Übereinstimmung der räumlichen Ausrichtung der α -Helices. Der Aktivierungsloop ist in der ASK1-Struktur nicht zu erkennen, da auch dieser aufgrund eines Mangels an Sekundärstrukturelementen verschiedene Positionen in der Kristallpackung einnehmen kann.

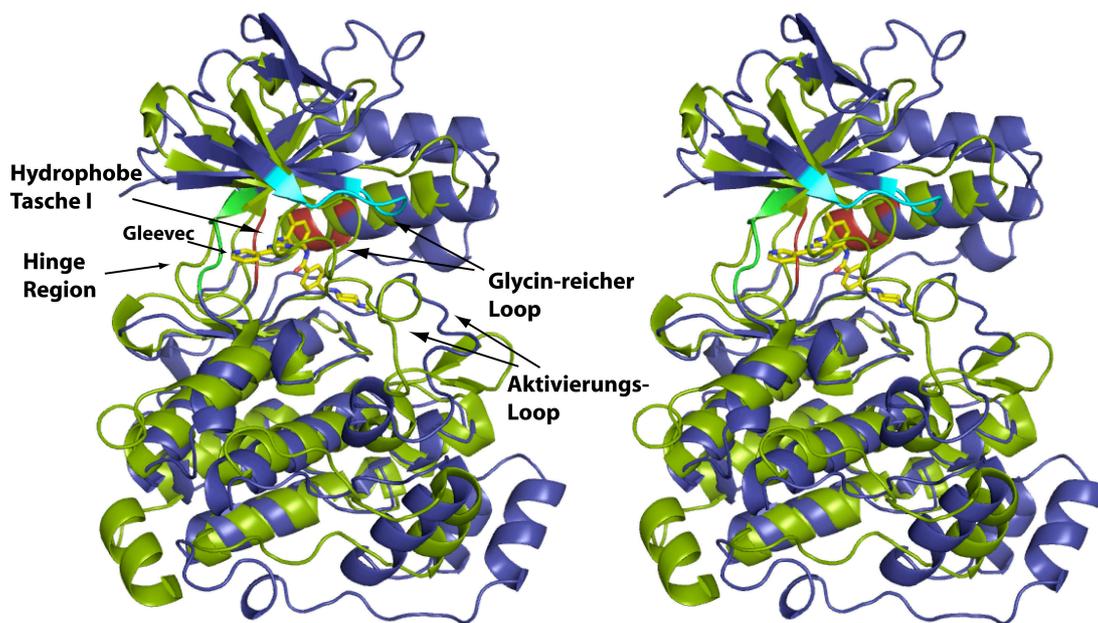


Abbildung 1.6: Überlagerung der beiden Kristallstrukturen von p38 α (1P38.pdb in blau) und der Abl-Kinase (2G2I.pdb in grün; Levinson et al., 2006). Die wichtigen Bereiche der Kinase sind an der Struktur 1P38.pdb markiert: der Glycin-reiche Loop (hellblau), die hydrophobe Tasche I (rot) und die *Hinge Region* (grün).

Untersucht man eine andere Kinasefamilie, wie die Familie der Tyrosinkinase, so ist die c-Abl-Kinase (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog kinase*) ein bekanntes

Beispiel, da die Kinase als Fusionsprotein mit dem Transkriptionsprodukt des BCR-Gens (*breakpoint cluster region gene*) in der Bildung chronisch myeloischer Leukämie und akut lymphatischer Leukämie eine wichtige Rolle spielt. In Abb. 1.6 wird die inaktive Kinasedomäne von Abl (1OPJ.pdb, Auflösung 1.75 Å; Nagar et al., 2003) mit der Struktur von inaktivem p38 α (1P38.pdb) verglichen.

In der ATP-Bindetasche der Kinasedomäne der Abl-Kinase bindet Gleevec, ein Inhibitor, der die Aktivität der Kinase *in vivo* blockiert, indem er an die inaktive Form bindet und diese stabilisiert (Druker et al., 1996). Trotz einer Sequenzidentität von nur 29.4 % ist die Gesamtstruktur der beiden Kinasen sehr ähnlich. Die Abl-Kinase weist zwar einen zwei Aminosäure längeren Glycin-reichen Loop auf und auch der Aktivierungsloop nimmt eine andere Position ein als bei p38 α , jedoch zeigen die Sekundärstrukturbereiche keine signifikanten Änderungen auf. Obwohl nun die beiden Kinasen zu zwei unterschiedlichen Kinasefamilien und zu verschiedenen Signaltransduktionskaskaden gehören (p38 α ist eine Serin-/Threonin-Kinase, Abl ist eine Tyrosin-Kinase), sind sie beide für die Übertragung der γ -Phosphatgruppe des ATPs auf ein Substrat zuständig und deshalb in ihrer Struktur konserviert.

1.2.3 Die MAP-Kinase-Kaskaden ERK, JNK und p38

1.2.3.1 Die ERK-1/2-Kaskade

ERK1 und ERK2 (*extracellular regulated kinase*) sind beteiligt an der Regulation von Meiose, Mitose und postmitotischen Funktionen in der Zelldifferenzierung. Der ERK-1/2-Signalweg wird durch unterschiedliche Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Liganden der GPCRs sowie Karzinogenen aktiviert (Boulton et al., 1991). ERK1 und ERK2 werden von den MAP/ERK-Kinasen MAPK-Kinase 1 und MAPK-Kinase 2 phosphoryliert (Kyriakis et al., 1992).

Am Beispiel von ERK2 stellte Ferrell (1997) einen möglichen Phosphorylierungsmechanismus für MAP-Kinasen vor. Mit Kinetikmessungen zeigten sie, dass die duale Phosphorylierung einer MAP-Kinase einem distributiven Mechanismus mit zweifacher Kollision unterliegt. Bei der Phosphorylierung von ERK2 durch MAPK-Kinase 1 *in vitro* wird ERK2 zuerst am Tyrosin des TXY-Motivs (bei ERK ein Thr-Glu-Tyr-Motiv) im Aktivierungsloop phosphoryliert. Da monophosphoryliertes ERK2 im Überschuss verglichen mit MAPK-Kinase 1 vorlag, muss MAPK-Kinase 1 von pTyr-ERK2 zwischen dem ersten und dem

zweiten Phosphorylierungsschritt dissoziieren. Eine Phosphorylierung der MAP-Kinase am Threonin hängt wiederum von der Konzentration der MAPK-Kinase 1 und der Konzentration von einfach phosphoryliertem ERK2 ab, was ebenfalls für die Präzision eines distributiven Mechanismus spricht. Khokhlathev et al. (1998) fanden am Beispiel von ERK2 heraus, dass dual-phosphoryliertes ERK2 entweder Homodimere oder mit mono- bzw. unphosphoryliertem ERK2 in der Aktivität gedrosselte Heterodimere ausbildet. Diese Dimerisierung ist wichtig für die intrazelluläre Translokation und erzeugt eine zusätzliche Feinabstimmung der Regulation der Kaskade und Interaktion mit in der Kaskade nachfolgenden Substraten. Die Dimerisierung von MAP-Kinasen ist auch bei der JNK/SAPK-Kaskade (Kapitel 1.2.3.2) und der p38-Kaskade (Kapitel 1.2.3.3) zu beobachten.

MAPK-Kinase 1 und MAPK-Kinase 2 werden nicht nur über die MAPKK-Kinase 1, sondern auch über die Familie der Raf-Proteine (*rapidly growing fibrosarcoma proteins*) aktiviert (Kyriakis et al., 1992). Die Raf-Proteine sind ausschließlich in dieser MAP-Kinase-Kaskade zu finden und setzen sich zusammen aus A-Raf, B-Raf und Raf-1, wobei Raf-1 in allen Zellen präsent ist, während A-Raf speziell im urogenitalen Gewebe und B-Raf im neuronalen Gewebe auftritt (Morrison & Cutler, 1997). Raf existiert als Multiprotein-komplex zusammengesetzt aus einer der erwähnten Raf-Isoformen, dem Hitzeschockprotein 90 (hsp90), p50 und einer variablen Zahl von 14-3-3 Proteinen (dimere, Phosphoserin-bindende Proteine), die Raf-1 stabilisieren (Stancato et al., 1993). Raf-1 wird wiederum durch Ras-Proteine aktiviert (Hamilton & Wolfman, 1998), und seine Aktivität wird noch weiter gesteigert, indem Proteine wie Proteinkinase C (PKC), Proteinkinase B (PKB) oder p21 (aktivierte Proteinkinase, PAK) in seinen Phosphorylierungszustand eingreifen (Morisson et al., 1993).

1.2.3.2 Die JNK/SAPK-Kaskade

Es gibt drei Isoformen der JNK (c-Jun-N-terminale Kinase), JNK1 - 3, die zu mehr als 85 % identisch sind und auch als Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPKs) bezeichnet werden. Diese werden an einem Threonin-(Prolin)-Tyrosin-Motiv im Aktivierungsloop durch die MAPK-Kinasen 4 und 7 phosphoryliert und somit aktiviert (Drijard et al., 1994). Diese MAP-Kinase-Kaskade wird aktiviert durch Zytokine, Stress, Wachstumsfaktoren oder verschiedene Proteine, die mit der DNA- und Proteinsynthese interferieren und spielt eine wichtige Rolle im programmierten Zelltod (Tournier et al., 2000). JNKs phosphorylieren unter anderem das DNA-bindende Protein c-Jun, das ein Bestandteil des Transkriptions-

komplexes AP-1 ist (Meier et al., 1996). Eine große Zahl MAPKK-Kinasen reguliert diese Kaskade, was bedeutet, dass eine Vielzahl unterschiedlicher Stimuli die Kaskade aktivieren kann. Die MAPK-Kinase 4 wird zum Beispiel aktiviert durch ASK1 (Abb. 1.5), die wiederum durch die MAPKKK-Kinasen 1 und 5 aktiviert wird.

1.2.3.3 Die p38-Kaskade

Die p38 MAP-Kinasen gehören zu den Serin-, Threonin-Kinasen und werden auch Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPKs) genannt. Sie spielen eine Rolle bei Entzündungen, rheumatoider Arthritis oder chronischer Bronchitis (Kaminska, 2005). Es gibt vier Isoformen von p38, die alle das Phosphorakzeptormotiv Thr-Gly-Tyr in ihrem Aktivierungsloop aufweisen (Goedert et al., 1997).

p38 α ist das wichtigste Protein der Gruppe und wurde auf drei verschiedene Arten entdeckt. In Zellextrakten, die mit entzündungsfördernden Zytokinen behandelt wurden, wurde p38 α als ein Tyrosin-Phosphoprotein charakterisiert (Han et al., 1994). Die MAP-Kinase-aktivierte Proteinkinase 2 (MAPKAP-Kinase 2) wurde als Substratprotein von p38 α entdeckt (Rouse et al., 1994). Und als nach Zielproteinen für Pyridinimidazolinhibitoren gesucht wurde, die für die Produktion von Tumornekrosefaktor α (TNF α) verantwortlich sind, wurde p38 α entdeckt und als zytokinunterdrückendes, entzündungshemmendes Inhibitorbindungsprotein bezeichnet (*cytokine suppressive anti-inflammatory drug-binding protein*, CSBP; Lee et al., 1994).

Außer der vier Isoformen von p38 gibt es ein weiteres Protein, das sich in diese Familie eingliedern lässt. Mxi ist eine Spaltvariante von p38 α , bei der die letzten 80 Aminosäuren durch einen anderen 17 Aminosäure langen Carboxy-Terminus ersetzt sind (Zervos et al., 1995) und im Gegensatz zu p38 α nicht nur von Stressfaktoren, sondern auch durch Wachstumsfaktoren aktiviert wird (Sanz et al., 2000).

Eine Vielzahl von Substanzen wie zum Beispiel proinflammatorische Zytokine (z.B. TNF α), Interleukin 1, verschiedene Hormone, osmotischer Schock bzw. Hitzeschock sowie andere Stressauslöser aktivieren die p38 MAP-Kinase-Kaskade über Rezeptoren oder direkte Diffusion der Aktivatoren in die Zelle (Wang et al., 1998). Die p38 MAP-Kinasen wiederum regulieren indirekt die Expression vieler Zytokine, die bei Entzündungen eine Rolle spielen (Johnson & Lapadat, 2002), indem sie die Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren sowie der MAPKAP-Kinase 2 katalysieren (Treisman, 1996). Die MAPKAP-Kinasen gehören zur Familie der CAMK (Abb. 1.2) und befinden sich überwiegend im

Zellkern. Wird MAPKAP-Kinase 2 von p38 α aktiviert, kann es innerhalb und außerhalb des Zellkerns Proteine aktivieren, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, mit dem Zytoskelett interagierende Proteine, mRNA-bindende Proteine oder Regulatorproteine des Zellzyklus und der Apoptose (Gaestel, 2006). Mitglieder der MAPK-Kinasefamilie MAPK-Kinase 3, 6 sowie auch 4 aktivieren die p38 MAP-Kinasen (Abb. 1.7; Drijard et al., 1995).

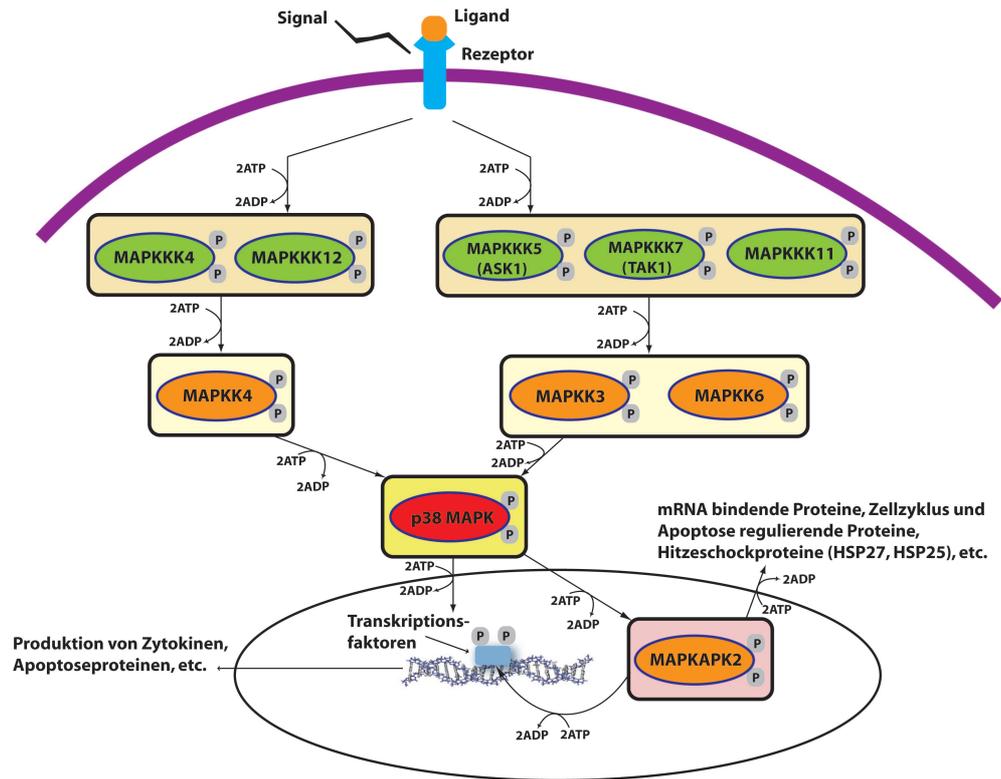


Abbildung 1.7: Die p38 MAP-Kinase-Kaskade wird durch proinflammatorische Zytokine, Interleukin 1, Hormone, osmotischen Schock bzw. Hitzeschock sowie andere Stressauslöser aktiviert. Die MAP-Kinasen der Kaskade werden durch gegenseitige duale Phosphorylierung aktiviert und über Phosphatasen inaktiviert. Die p38-Proteine bilden das Ende der Kaskade und phosphorylieren Transkriptionsfaktoren oder MAPKAP-Kinasen an Serin- und Threoninresten. Dadurch wird die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, Apoptose- und Zellzyklus-Regulatorproteinen, mRNA-bindenden Proteinen oder Hitzeschockproteinen angeregt.

MAPK-Kinase 3 phosphoryliert die Isoformen p38 α und p38 β , während MAPK-Kinase 6 alle p38 MAP-Kinasen aktiviert (Enslin et al., 2000). Die MAPK-Kinasen 3 und 6 werden durch die MAPKK-Kinasen 5, 7 und 11 aktiviert. Zusätzlich werden MAPK-Kinasen 3, 4 und 6 ebenso wie MAPK-Kinasen 4 und 7 aus der JNK-Kaskade durch die Serin-

/Threoninkinase ASK1 phosphoryliert (Abb. 1.5; Wang et al., 1996).

Eine ASK1 verwandte Kinase (ASK2) kann durch Bildung eines heterotrimeren Komplexes mit ASK1 als MAPKK-Kinase fungieren und somit ebenso die MAPK-Kinasen 3 und 6 phosphorylieren (Takeda et al., 2007). Desweiteren werden MAPK-Kinasen 3 und 6 auch durch die MAPKK-Kinase 7 (TAK1, *transforming growth factor- β -activated kinase 1*) und die TAO1-Kinase (*thousand and one amino acid kinase*) phosphoryliert, welche zur Familie der MAPKK-Kinasen gehört und für die Regulierung der p38-Kaskade in der Antwort auf genotoxische Stimuli zuständig ist (Raman et al., 2007, Wu & Wang, 2008).

Zusätzlich wird p38 α durch TAB1 (*transforming growth factor-beta-activated protein kinase 1 (TAK1)-binding protein 1*) aktiviert, welches nicht zur Familie der MAPK-Kinasen gehört und eher ein Adapterprotein mit ungeklärter Aktivität für p38 α zu sein scheint (Ge et al., 2002).

1.3 Mechanismus und Inhibierung der p38 MAP-Kinasen

1.3.1 Aktivierungsmechanismus der Kinasen

Alle Proteinkinasen katalysieren im aktiven Zustand dieselbe chemische Reaktion in eukaryotischen Zellen: die Übertragung der γ -Phosphatgruppe von ATP auf ein Proteinsubstrat. Diese Reaktion erfolgt in der Tasche zwischen der aminoterminalen und der carboxyterminalen Domäne. Um eine unkontrollierte Funktion der MAP-Kinase zu verhindern, wird diese streng durch Phosphorylierung, die zur Aktivierung führt, und Dephosphorylierung, die die Kinase in den inaktiven Zustand zurück versetzt, geregelt. Diese beiden Zustände unterscheiden sich in den katalytischen Bereichen konformell sehr stark voneinander (Kornev et al., 2006).

In der Kristallstruktur von freiem, unphosphoryliertem p38 α liegt die Kinase im inaktiven Zustand vor (1P38.pdb; Wang et al., 1997). Der Übergang der Kinase vom inaktiven in den aktiven Zustand ruft extreme konformelle Änderungen im Bereich der Bindetasche des Proteins hervor. Es gibt verschiedene Motive in der Kinase, die durch das gesamte Kinom hindurch konserviert sind und wichtige Aminosäuren für die Bindung von ATP und der Ausbildung eines Wasserstoffbrückennetzwerks sind (Abb. 1.8).

Eine der wichtigsten Aminosäuren zur Katalyse der Phosphatgruppenübertragung ist

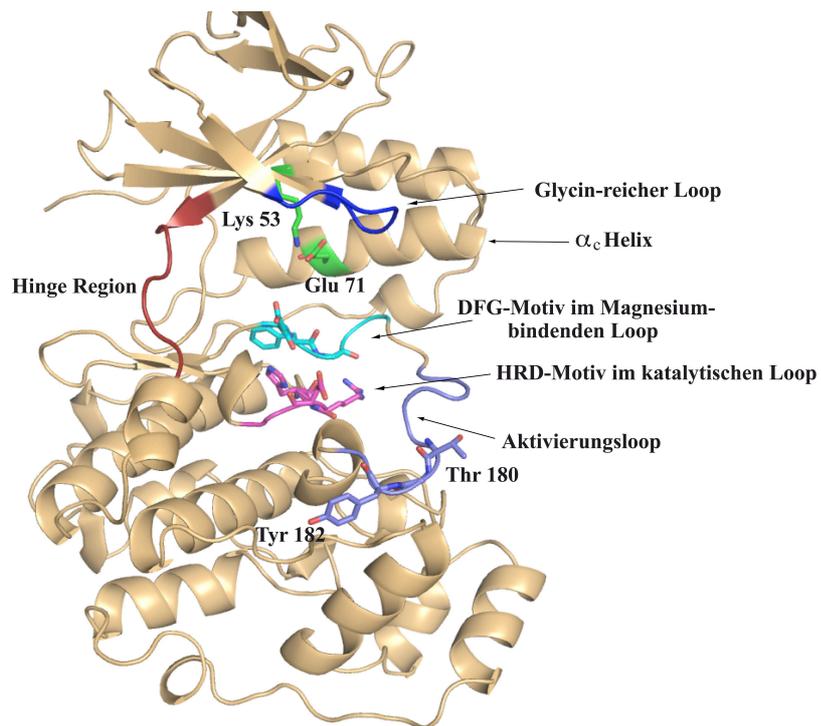


Abbildung 1.8: In der Kristallstruktur von inaktivem p38 α (1P38.pdb) sind die Motive markiert, die eine wichtige Rolle in der ATP-Bindung und der Phosphatgruppenübertragung spielen. Die *Hinge Region* (rot) verbindet die aminoterminalen mit der carboxyterminalen Domäne, in blau ist der Glycin-reiche Loop dargestellt, in grün die beiden Aminosäuren Lys 53 im β_3 -Strang und Glu 71 in der α_c -Helix, in hellblau der Magnesium-bindende Loop mit dem DFG-Motiv, in pink der katalytische Loop mit dem HRD-Motiv und in blaugrau der Aktivierungsloop mit den beiden zu phosphorylierenden Aminosäuren Thr 180 und Tyr 182.

Asp 168, das zu dem konservierten DFG-Motiv im Magnesium-bindenden Loop gehört. Die Konformation des DFG-Motivs in der inaktiven Form unterscheidet sich sehr stark von der aktiven Form, weshalb man auch von einer "DFG-in"- und einer "DFG-out"-Konformation spricht (Vogtherr et al., 2006). In der Kristallstruktur des inaktiven p38 α (1P38.pdb) liegt die "DFG-in"-Konformation vor (Abb. 1.8), in der die Seitenkette von Phe 169 in Richtung der α_c -Helix zeigt und die Seitenkette von Asp 168 so weit von der Amidgruppe von Gly 170 entfernt liegt, dass keine Wasserstoffbrücke ausgebildet werden kann. In der "DFG-out"-Konformation liegt der aromatische Ring von Phe 169 direkt in der Bindetasche und nimmt einen Teil des Platzes ein, der im aktiven Zustand von ATP besetzt wird. Im aktiven Zustand befindet sich Phe 169 in der "DFG-in"-Konformation und Gly 170

ändert seine Position ähnlich eines bipositionalen Schalters um ca. 2 Å, so dass die Bildung einer Wasserstoffbrücke zwischen der Amidgruppe von Gly 170 und dem Carboxysauerstoff von Asp 168 möglich wird, was ein Kriterium für die Aktivität der Kinase ist (Abb. 1.9; Kornev et al., 2006). Daher wird vermutet, dass die inaktive "DFG-in"-Konformation eine Art Zwischenzustand zwischen dem aktiven Zustand und der "DFG-out"-Konformation ist (Levinson et al., 2006).

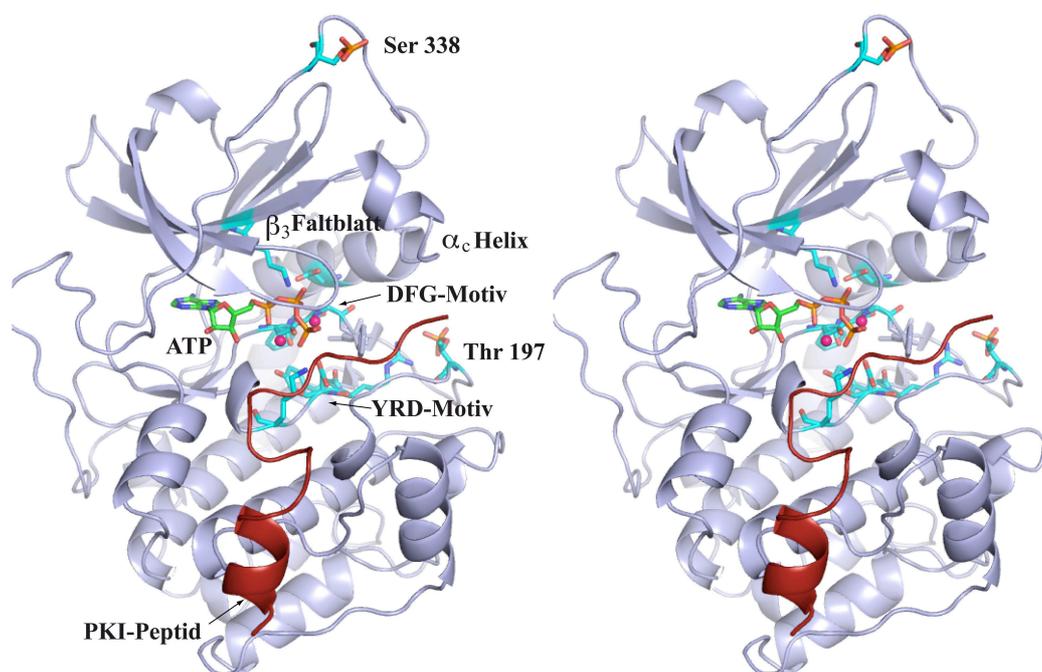


Abbildung 1.9: In der Kristallstruktur von aktivem PKA (1ATP.pdb; Zheng et al., 1993) ist ATP mit zwei Manganionen (pink) in der Bindetasche gebunden. Die wichtigen Motive sind in hellblau hervorgehoben, das DFG-Motiv, das HRD-Motiv (bei PKA YRD-Motiv), die Aminosäuren Lys 72 im β_3 -Strang und Glu 91 in der α_c -Helix und die beiden phosphorylierten Aminosäuren Thr 197 und Ser 338.

Das HRD-Motiv ist im aktiven Zustand verantwortlich für die korrekte Ausrichtung des Phosphatgruppenakzeptors im Substrat. Das Motiv ist in sämtlichen eukaryotischen Kinasen hoch konserviert, wobei in manchen Kinasen der Histidinrest durch einen Tyrosinrest ausgetauscht ist (YRD-Motiv). Die Rolle des Argininrestes im Motiv ist der Aufbau von Wasserstoffbrücken zur Verknüpfung des Aktivierungsloops mit dem katalytischen und dem Magnesium-bindenden Loop im aktiven Zustand (Krupa et al., 2004).

Der aktive Zustand einer Kinase wird am Beispiel der cAMP-abhängigen Proteinkinase

(PKA) gezeigt, da eine Kristallstruktur von aktiviertem p38 α bisher nicht aufgeklärt wurde. Die die 2.2 Å Kristallstruktur des PKA im Komplex mit ATP und einem Inhibitorpeptid wurde von Zheng et al. (1993) gelöst.

In Abb. 1.9 ist die Kristallstruktur von PKA dargestellt, die an ihren beiden Aktivierungsstellen Thr 197 und Ser 338 phosphoryliert ist (1ATP.pdb). Das DFG-Motiv liegt im inneren Bereich der Bindetasche, Lys 72 im β_3 -Strang und Glu 91 in der α_c -Helix. Der Histidinrest des HRD-Motivs ist in dieser Kinase durch einen Tyrosinrest ersetzt (YRD-Motiv). In der Bindetasche ist ATP an zwei Manganionen koordiniert, da zur Kristallisation Manganionen anstelle von Magnesiumionen aufgrund ihrer stärkeren Streuintensität verwendet wurden, wodurch eine eindeutige Lokalisierung der Manganionen bei der Strukturlösung von Makromolekülen möglich ist. Zusätzlich ist ein 20 Aminosäuren langes Peptid gebunden, das den aminoterminalen Teil des natürlich auftretenden hitzestabilen Proteinkinaseinhibitors (PKI, *heat-stable protein kinase inhibitor*) darstellt.

In Abb. 1.10 ist die Bindetasche der Kristallstruktur von PKA vergrößert dargestellt (1ATP.pdb). Die Phosphatgruppen des ATP werden durch Wasserstoffbrücken in ihrer Position fixiert. Die Aminogruppe von Lys 72 im β_3 -Strang bildet nicht nur eine Wasserstoffbrücke zur Seitenkette von Glu 91 in der α_c -Helix aus, die eine wichtige Rolle in der Stabilisierung des aktiven Zustandes spielt, sondern auch Wasserstoffbrücken zu den α - und β -Phosphatgruppen des ATP (Iyer et al., 2005). Der Adenin-Ring des ATPs liegt in der hydrophoben Tasche I der amino-terminalen Domäne. Das ATP wird durch den Glycin-reichen Loop der amino-terminalen Domäne überdeckt. Die Spitze des Loops wechselwirkt mit der γ -Phosphatgruppe des ATP und hält diese in Position für den γ -Phosphatgruppentransfer auf das Substrat. Eine der katalytisch wichtigsten Aminosäuren ist Asp 184 des DFG-Motivs (Asp 184, Phe 185, Gly 186), das mit den beiden darauf folgenden Aminosäuren den Magnesium-bindenden Loop bildet. Asp 184 wechselwirkt mit allen Phosphatgruppen des ATP über die Koordination von Manganionen und bildet eine Wasserstoffbrücke zur Amidgruppe von Gly 186, so dass die aktive "DFG-in"-Konformation entsteht. Außerdem wird von der Amidgruppe von Asp 184 eine Wasserstoffbrücke zur Hydroxyl-Gruppe von Tyr 164 im YRD-Motiv (Tyr 164, Arg 165, Asp 166) des katalytischen Loops ausgebildet. Der Phenylalaninrest des DFG-Motivs wiederum interagiert über hydrophobe Kontakte mit der α_c -Helix und dem dazu benachbarten YRD-Motiv. Die Reste der YRD-Triade sind verantwortlich für die korrekte Ausrichtung der zu phosphorylierenden Hydroxylgruppe des Substratproteins (die Substratbindestellen werden in Kapi-

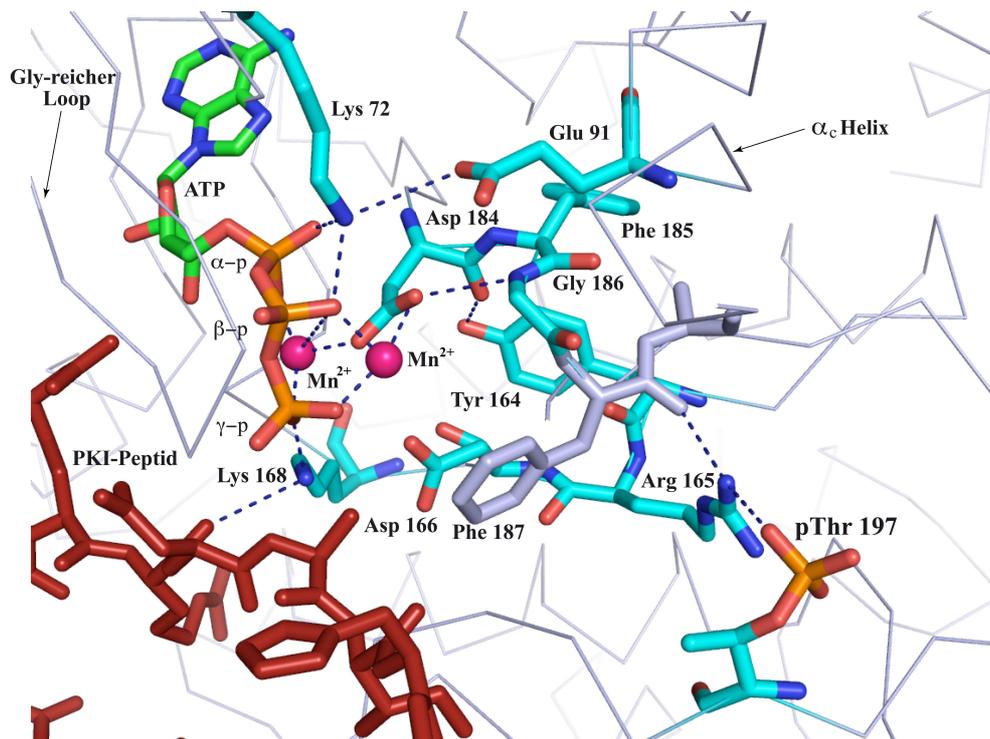


Abbildung 1.10: Ansicht der Bindetasche der Kristallstruktur 1ATP.pdb. Die Phosphatgruppen von ATP (grün) bilden Wasserstoffbrücken zu Lys 72 und Lys 168 (hellblau) und wechselwirken über die Manganionen mit Asp 184 des DFG-Motivs (Asp 184, Phe 185, Gly 186; hellblau). Das YRD-Motiv (Tyr 164, Arg 165, Asp 166; hellblau) stabilisiert das DFG-Motiv und den restlichen Teil des Magnesium-bindenden Loops (Aminosäuren in grau) und wechselwirkt mit der Phosphatgruppe des Tyr 197. Das PKI-Peptid ist in rot dargestellt.

tel 1.3.1 behandelt; Adams, 2003). Die Aminogruppe von Lys 168 ist ein Anker zwischen dem Substrat und der γ -Phosphatgruppe des ATP und verantwortlich für die Übertragung dieser auf die zu phosphorylierende Hydroxyl-Gruppe des Substrats.

Die Konformation des aktiven Zustands, in der die γ -Phosphatgruppe des ATP auf die Hydroxylgruppe des Substratproteins übertragen wird, wird als geschlossene Konformation bezeichnet. Um ADP und das phosphorylierte Substrat schließlich aus der Bindetasche zu entlassen, begibt sich die Kinase unter Verlust einiger Wasserstoffbrückenbindungen in die so genannte offene Konformation. Diese koordinierten Bewegungen finden innerhalb des katalytischen Zyklus der Kinase statt.

Die "DFG-in"-Konformation im aktiven Zustand ist Teil einer komplizierten Wasserstoffbrücken-Kaskade, die zu einer globalen Stabilisierung des Proteins im Vergleich zum in-

aktiven Zustand führt, die durch hydrophobe Wechselwirkungen von Aminosäuren der α_c -Helix mit den verschiedenen hydrophoben Seitenketten der hydrophoben Tasche I, dem Phenylalaninrest des DFG-Motivs und dem Histidin- bzw. Tyrosinrest des H(Y)RD-Motivs hervorgerufen wird (Iyer et al., 2005). Diese hydrophoben Wechselwirkungen reichen vom Zentrum der carboxy-terminalen Domäne zum Zentrum der amino-terminalen Domäne und werden als hydrophobes Rückgrat des Proteins bezeichnet (*hydrophobic spine*; Kornev et al., 2006). Wird die Kinase durch Dephosphorylierung deaktiviert, wird die Wasserstoffbrücke zwischen Asp 184 und Gly 186 im DFG-Motiv gelöst, was zur Unterbrechung und somit Aufhebung der Wasserstoffbrückenkaskade führt und den Magnesium-bindenden Loop aus seiner Position entlässt. Dies führt zu einem "DFG-flip" des Motivs in die inaktive "DFG-in"-Konformation.

In der Kristallstruktur der aktiven PKA sieht man zwei Manganionen in der Bindetasche. Bei geringer Mangankonzentration wird nur eine der beiden Position besetzt und zwar diejenige, in der das Manganion mit den β - und γ -Phosphatgruppen des ATP wechselwirkt (Zheng et al., 1993). Die zweite Manganionenbindestelle wird erst dann populiert, wenn die Manganionenkonzentration hoch genug ist. Da nach der γ -Phosphatgruppenübertragung von ATP auf ein Substrat das ADP durch die zusätzliche Koordination an das zweite Magnesiumion fest gebunden bleibt und die Freisetzung von ADP der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Katalyse ist, wird die Aktivität der Kinase behindert (Zhou & Adams, 1997). Das bedeutet für die Katalysereaktion, dass ein Magnesiumion für die Stabilisierung der Wechselwirkungen zwischen den β - und γ -Phosphatgruppen des ATP und dem Aspartatrest des DFG-Motivs und dem Aufbau der Wasserstoffbrücken-Kaskade erforderlich ist, aber ein zweites Magnesiumion, das die α -, β - und γ - Phosphatgruppen des ATP bindet, einen inhibierenden Effekt ausübt (Armstrong et al., 1979).

1.3.1.1 Besondere Substratbindestellen der MAP-Kinasen

ERK, JNK und p38 MAP-Kinasen besitzen außer ihrer ATP-Bindungsstelle weitere Proteinbindestellen an ihrer Oberfläche. Bei Proteinen, die elektrostatische Wechselwirkungen mit Kinasen ausbilden, konnten drei unterschiedliche Bindemotive unterschieden werden (Abb. 1.11).

Die wohl am besten untersuchten Proteinbindestellen zwischen MAP-Kinasen und deren Substraten sind die "D-Motive" (oder auch δ -Domäne, D-Seite, D-Box oder Kinaseinteraktionsmotiv, Abb. 1.11). Das *Docking*- oder D-Motiv besteht aus basischen und hydrophoben

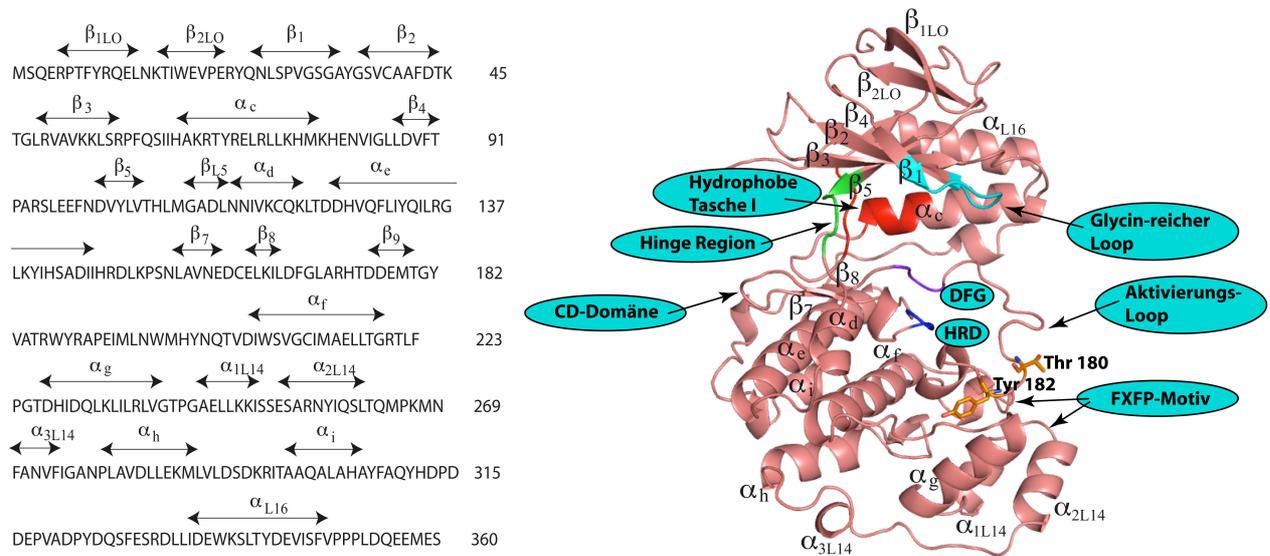


Abbildung 1.11: Links ist die Sequenz von p38 α mit den Sekundärstrukturelementen dargestellt (nach Wilson et al., 1996), rechts sind die wichtigen ATP- und Substratbindestellen ebenso wie die Sekundärstrukturbezeichnungen auf die Kristallstruktur des freien p38 α übertragen (1P38.pdb).

Aminosäuren und ist bei MAPK-Kinasen, verschiedenen Transkriptionsfaktoren sowie MAP-Kinasephosphatasen und anderen Substraten (z.B. MAPKAPs) zu finden (Yang et al., 1998). Die MAP-Kinase-Bindestelle für D-Motive besteht aus einer Ansammlung von sauren Aminosäuren in der carboxy-terminalen Verlängerung der Bindetasche in einem Spalt, der von den Helices α_d und α_e gebildet wird. Dieser Bindungsspalt wird als "CD-Domäne" (*common docking domain*) oder hydrophobe Dockingspalte bezeichnet (Tanoue et al., 2000). Damit das D-Motiv eines Substrates an die CD-Domäne einer MAP-Kinase binden kann, muss es als ausgebildete Helix vorliegen (Zhou et al., 2006). Eine Substratbindung in der CD-Domäne ruft konformelle Änderungen in der MAP-Kinase hervor. Bei p38 α ändert sich zum Beispiel die Konformation des Aktivierungsloops, so dass dieser besser phosphoryliert und somit die Kinase leichter aktiviert werden kann. In ERK, p38 und JNK MAP-Kinasen sind die CD-Domänen sehr unterschiedlich, so dass eine hohe Substratspezifität gewährleistet ist.

Als weiteres Bindemotiv ist das FXP-Motiv in dem ternären Komplexfaktor Elk-1 (*Ets-like protein 1*) und verschiedenen Adapterproteinen bekannt, mit dem die Bindung an ERK erfolgt. Die entsprechende Bindestelle der MAP-Kinase liegt in der Nähe der α_g -Helix und

ist das FXFP-Motiv (Zhang et al., 2003). Eine weitere Bindestelle wurde von Akella et al. (2008) für p38 α gefunden, die als Rückseitenbindestelle (*backsite binding site*) bezeichnet wird und in der Nähe der Hinge-Region liegt, wo die carboxy-terminale Helix die ATP-Bindetasche berührt.

1.3.2 p38 α MAPK und ihre Inhibitoren

Über den p38 MAP-Kinase-Signalweg wird die Produktion von inflammatorischen Zytokinen gesteuert (z.B. TNF α oder IL-1), die für die Ausbreitung von Entzündungen in Autoimmunkrankheiten verantwortlich sind (Dinarello, 1991). Therapien mit TNF α - oder IL-1-Antikörpern, die gegen diese inflammatorischen Zytokine gerichtet sind, können die Symptome der chronischen Entzündungen lindern (Jarvis & Faulds, 1999). Deshalb ist die Entwicklung von effektiven, oral-verfügbaren niedermolekularen Substanzen, die als Wirkstoffe im p38 MAP-Kinase-Signalweg verwendet werden können, für die Therapie von Autoimmunkrankheiten von größter Bedeutung. Die wichtigsten Prototypen von Inhibitoren werden nachfolgend vorgestellt.

1.3.2.1 SB203580

SB203580 (SmithKline Beecham), 4-(4'-Fluorophenyl)-2-(4'-methylsulfinylphenyl)-5-(4'-pyridinyl)-1*H*-imidazol, ist ein ATP-kompetitiver Inhibitor, der der Prototyp aller Pyridinyl-Imidazol-Inhibitoren ist und zur ersten Generation von p38 α -Inhibitoren gehört. p38 α und p38 β lassen sich durch Pyridinimidazolinhibitoren blockieren, während p38 γ und p38 δ darauf nicht ansprechen (Kumar et al., 1997). Zaman et al. (2006) bestimmten IC₅₀-Werte für die Bindung von SB203580 an aktives p38 α von IC_{50,aktiv} = 80 \pm 30 nM und inaktives p38 α von IC_{50,inaktiv} = 100 \pm 37.

Wang et al. (1996) lösten die Kristallstruktur von unphosphoryliertem p38 α im Komplex mit SB203580 mit einer Auflösung von 2.4 Å (1A9U.pdb, R_{cryst}/R_{free} 18.2 %/24.0 %). Ein Ausschnitt der Bindetasche mit dem gebundenen Inhibitor ist in Abb. 1.12 dargestellt.

SB203580 besitzt drei Sechsringe, die an einen Imidazolring gebunden sind, was eine propellerartige Form ergibt, in der der Pyridinring (Ring A) dieselbe Stelle in der Bindetasche einnimmt wie der Adeninring des ATP. Der Inhibitor bindet hauptsächlich an die amino-terminale Domäne des Proteins, wobei das Stickstoffatom des Pyridinrings eine Wasserstoffbrücke mit der Rückgrat-Amidgruppe von Met 109 der *Hinge Region* bildet (2.8 Å).

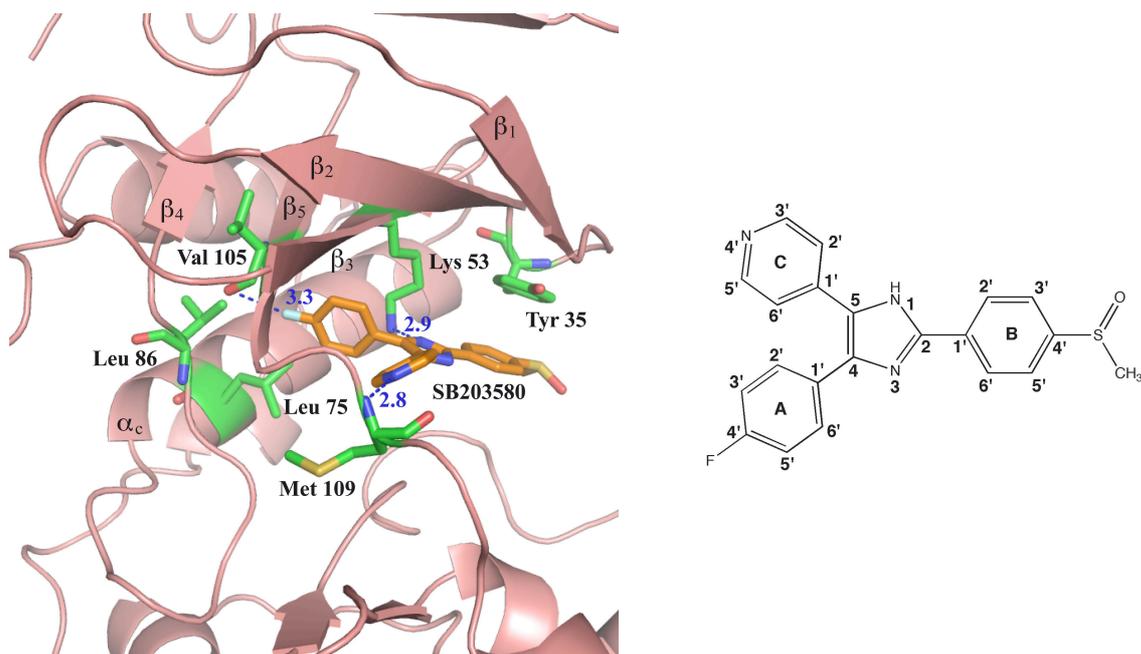


Abbildung 1.12: Links ist SB203580 in der Bindetasche von inaktivem, unphosphoryliertem p38 α (1A9U.pdb) dargestellt. SB203580 bindet an dieselbe Stelle im Protein wie ATP. In grün sind die Aminosäuren dargestellt, die mit dem Inhibitor wechselwirken. Rechts ist die Struktur des Inhibitors mit Beschriftung skizziert gezeigt.

Das unprotonierte N³-Atom des Imidazolrings bildet eine weitere Wasserstoffbrücke zu der terminalen N _{ϵ} H₂-Gruppe von Lys 53 (2.9 Å). Der Fluorophenylring des Inhibitors zeigt in die hydrophobe Tasche I, die von dem zentralen β -Faltblatt des Amino-Terminus sowie der α_c -Helix gebildet wird. Die eine Seite des Rings bildet van-der-Waals-Kontakte zu dem Aminosäurerückgrat der β_3 - und β_5 -Stränge, während die andere Seite des Rings mit Leu 75 der α_c -Helix und Leu 86 des β_4 -Strangs wechselwirkt. Das Fluoratom interagiert mit der Rückgrat-Amidgruppe von Val 105 (3.3 Å), obwohl die Geometrie nicht unbedingt optimal für die Bildung einer Wasserstoffbrücke ist (Baker & Hubbard, 1984). Die 4-Methylsulfinylphenyl-Gruppe des Inhibitors liegt in der Nähe des Glycin-reichen Loops und formt eine π - π -Wechselwirkung mit dem Phenylring von Tyr 35. Die Methylsulfinyleinheit liegt als racemisches Gemisch vor, wechselwirkt jedoch nicht mit dem Protein.

Im Vergleich zur 2.3 Å Kristallstruktur des freien p38 α (1P38.pdb, $R_{cryst}/R_{free} = 21.3\% / 29.7\%$; Wilson et al., 1996) mit der des p38 α /SB203580-Komplexes lassen sich keine extremen konformellen Unterschiede erkennen (Abb. 1.13). In den Regionen der Binde-

tasche ist der Phenylring von Tyr 35 im Glycin-reichen Loop in der freien Form nach außen gedreht, während er in der Komplexstruktur eine π - π -Wechselwirkung mit dem 4-Methylsulfinylphenyl-Ring des SB203580 zeigt. Ein weiterer Unterschied der Komplexstruktur ist die Bildung einer Wasserstoffbrücke zwischen dem O₅-Sauerstoff von Glu 71 und der N_εH₂-Gruppe von Lys 53 (2.7 Å), durch die die Position von Lys 53 zwischen Glu 71 und N³ des Imidazolrings von SB203580 fixiert wird. Dieses Wasserstoffbrücken-Netzwerk wird durch Bindung des Inhibitors initiiert.

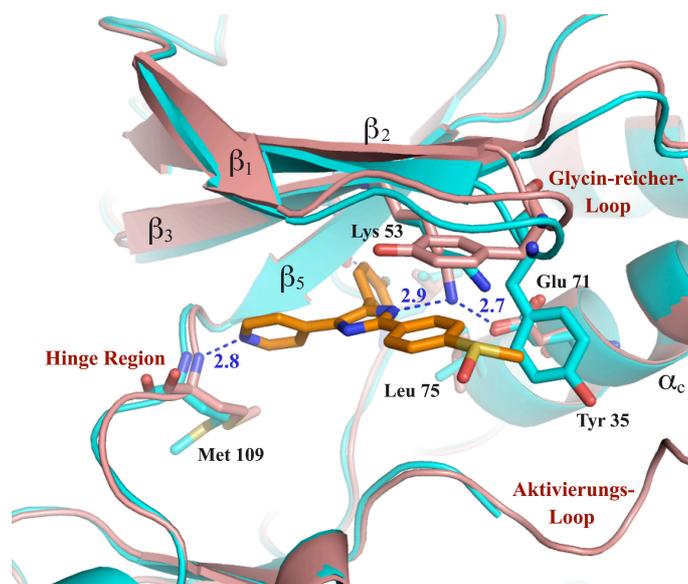


Abbildung 1.13: Überlagerung der Bindetaschen der beiden Kristallstrukturen 1P38.pdb von freiem p38 α in blau mit der p38 α /SB203580-Komplexstruktur 1A9U.pdb in rosé.

SB203580 musste allerdings aus den klinischen Studien zurück gezogen werden, da Lebertoxizität festgestellt wurde (Adams et al., 1998). Auf diesen Prototyp folgte die Entwicklung einer Reihe weiterer Inhibitoren. Der Austausch des Pyridinrings gegen einen Phenylring verschlechtert die Bindungsaffinität dramatisch, während das Ersetzen gegen einen Pyrimidinring sowohl die Affinität als auch die Selektivität des Inhibitors steigert (Liverton & Butcher, 1999). Neben vielen verschiedenen 2,4,5-trisubstituierten Imidazolen, wurde auch eine Klasse bizyklischer Imidazole entwickelt, bei der die korrekte Regiochemie am zentralen Heterozyklus über die p38 α -Affinität entscheidet (Lee et al., 1993). Nur ein Ringschluss zu dem dem Pyridinring-benachbarten Stickstoffatom im Imidazolring erlaubt eine Bindung an p38 α , ein Ringschluss zum anderen Stickstoffatom, das benachbart zum

Fluorophenylring liegt, setzt die Affinität zu p38 α stark herab (Boehm et al., 1996). Desweiteren wurden sowohl 2,3,4,5-tetrasubstituierte Imidazole entwickelt als auch Inhibitoren, bei denen der Imidazolring durch andere 5- oder 6-gliedrige Ringe ersetzt wurde (Liver-ton & Butcher, 1999, DeLaszlo et al., 1998). Es befinden sich bereits Inhibitoren mit tri-substituierten Imidazolen ebenso wie niedermolekulare Verbindungen mit einem mehrfach substituierten 6-gliedrigen Zentralring in klinischen Studien (Peifer et al., 2006).

1.3.2.2 VX745

VX745 ist ein Heterozyklus, der von der Firma Vertex Pharmaceuticals entwickelt wurde, eine hohe Selektivität im Vergleich zu anderen mit p38 α eng verwandten Kinasen zeigt und nicht auf einem Diarylsystem basiert (Natarajan et al., 2003). Der zentrale Baustein von VX745 ist ein 3,4-Dihydropyrido[3,2*d*]pyrimidon-Baustein. Der Inhibitor befindet sich bereits in der klinischen Phase II und scheint gut verträglich sowie erfolgreich in der Behandlung rheumatoider Arthritis zu sein (IC_{50} = 0.8 nM für aktives p38 α ; Fitzgerald et al., 2003).

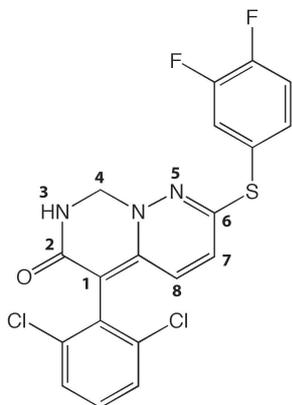


Abbildung 1.14: Struktur des Inhibitors VX745. Als Gerüst dient ein 3,4-Dihydropyrido[3,2*d*]pyrimidon-baustein.

Eine Kristallstruktur von VX745 im Komplex mit p38 α ist bisher nicht aufgeklärt worden. Jedoch ist VX745 der Prototyp einer Gruppe von Inhibitoren, die von ihrer Carbonylgruppe sowohl zur Amidgruppe von Met 109 als auch zu der von Gly 110 Wasserstoffbrücken ausbilden, und der Difluorophenylring zeigt in die hydrophobe Tasche I (Fitzgerald et al., 2003). Die Wasserstoffbrücke zum Gly 110 ist charakteristisch für diese Gruppe Inhibitoren, denn die Carbonylgruppe bewirkt als Wasserstoffbrückenakzeptor eine Drehung der Met 109 - Gly 110 - Amidbindung um 180°. Da der Drehwinkel sehr groß ist, ist dieser

so genannte Peptidflip nur möglich, wenn nach dem Met 109 ein Glycin in der Sequenz vorhanden ist. Deshalb ist diese Inhibitor-Klasse auch hoch selektiv für p38 MAP-Kinasen. Auf die Bedeutung des Peptidflips wird im Kapitel 4.3.2 der Diskussion dieser Arbeit näher eingegangen.

1.3.2.3 BIRB796

BIRB796 ist ein von Boehringer Ingelheim entwickelter Inhibitor mit einem Diarylharnstoff-Gerüst und stabilisiert eine Konformation von p38 α , die ATP den Zutritt zur Bindetasche verwehrt und weist deshalb alle Merkmale eines allosterischen Inhibitors auf (Pargellis et al., 2002). BIRB796 ist im Gegensatz zu SB203580 einer der potentesten und am langsamsten assoziierenden und dissoziierenden Inhibitoren (Pargellis et al., 2002). Eine Bindung von BIRB796 zu aktivem p38 α wurde mit einem IC₅₀-Wert von 11 \pm 5 nM und zu inaktivem p38 α von 11 \pm 3 nM bestimmt (Zaman et al., 2006). Drei strukturelle Merkmale sind für die hohe Affinität zu p38 α verantwortlich sind.

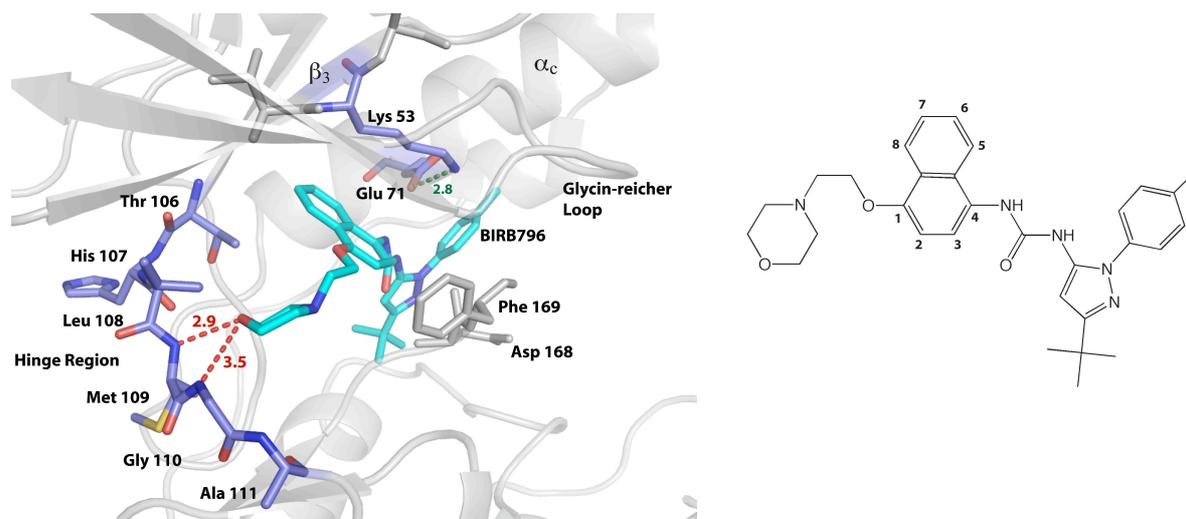


Abbildung 1.15: Ausschnitt aus der Kristallstruktur von p38 α im Komplex mit BIRB796 (1KV2.pdb, Auflösung 2.8 Å; Pargellis et al., 2002). Rechts ist die Struktur von BIRB796 dargestellt.

Die Einführung einer Tolygruppe sowie einer Naphthyleinheit und des Ethoxymorpholins steigern die Inhibierungseigenschaften um ein Vielfaches (Abb. 1.15; Pargellis et al., 2002). Eine Bindung von BIRB796 an p38 α ruft eine Konformationsänderung des DFG-Motivs hervor (Abb. 1.15). Der aromatische Ring des Phenylalaninreste des DFG-Motivs liegt

in der "in"-Konformation unter der α_c -Helix tief in der hydrophoben Tasche I vergraben. Bei Bindung des Inhibitors wird der Phenylalaninrest aus seiner Position verdrängt, da der tert-Butylpyrazolteil von BIRB796 weit in die hydrophobe Tasche I zeigt, so dass der Phenylalaninrest mit dem restlichen Motiv die "DFG-out"-Position einnimmt (Kapitel 1.3.1). Der aromatische Ring des Phenylalaninrestes wird um ca. 10 Å aus der ursprünglichen Position bewegt, wodurch eine eventuelle Bindung von ATP unmöglich wird (Abb. 1.16; Hancock et al., 2005). Diese Ausrichtung ist für N,N'-Diarylharnstoffinhibitoren charakteristisch. Man nimmt an, dass die Konformationsänderung aufgrund der Inhibitorbindung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei Bindung dieser Inhibitor-Klasse ist (Regan et al., 2003). Der Toly substituent am Pyrazolring interagiert über hydrophobe Wechselwirkungen mit der Seitenkette von Glu 71, was aber nicht die charakteristische Wechselwirkung zwischen Glu 71 und Lys 53 beeinflusst. Der Morpholinsubstituent bildet über seinen Sauerstoff zwei Wasserstoffbrücken zum Proteinerückgrat der *Hinge Region* mit den Rückgrat-Amidgruppen von Met 109 und Gly 110. Hier tritt wieder das Phänomen des Peptidflips auf, der in Kapitel 1.3.2.2 bereits erwähnt wurde und in Kapitel 4.3.2 ausführlich behandelt wird.

In Abb. 1.16 ist die Überlagerung der beiden Komplexstrukturen p38 α /SB203480 (1A9U.pdb) und p38 α /BIRB796 (1KV2.pdb) dargestellt. Die *Hinge Region* von p38 α ist farblich hervorgehoben, so dass der Unterschied der Carbonylgruppenposition von Met 109 deutlich wird. Die Carbonylgruppe von Met 109 im p38 α /SB203580 Komplex zeigt in die Bindetasche, während bei der p38 α /BIRB796-Struktur die Amidcarbonylgruppe von Met 109 um 180° nach außen gedreht ist. Zusätzlich unterscheidet sich die Position der nachfolgenden Carbonylgruppe von Gly 110 um 90° von der im p38 α /SB203480 Komplex.

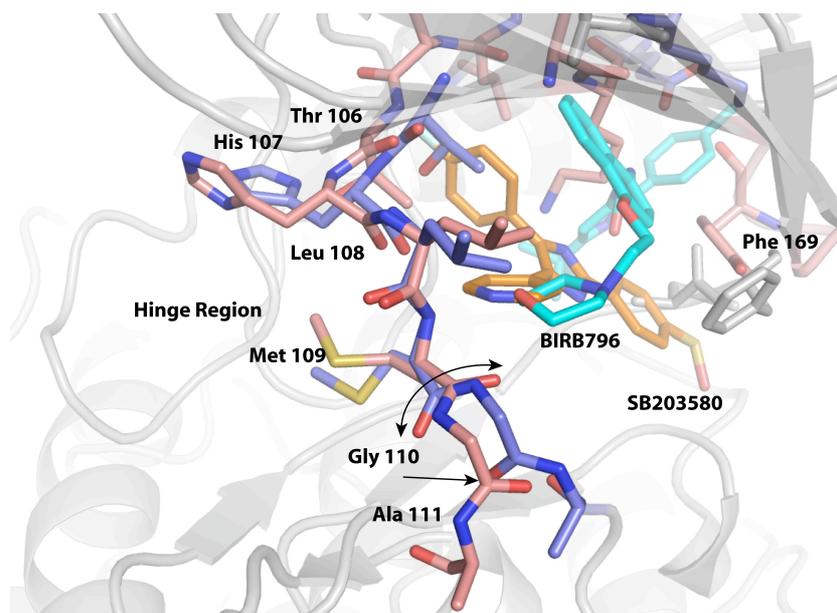


Abbildung 1.16: Überlagerung der Komplexstrukturen von p38 α /SB203480 (1A9U.pdb) und p38 α /BIRB796 (1KV2.pdb). Die *Hinge Region* von SB203580 gebundenem p38 α ist in rosa der Inhibitor in gold dargestellt. Die Carbonylgruppe von Met 109 zeigt in die Bindetasche, während bei BIRB796 gebundenem p38 α die Amidcarbonylgruppe von Met 109 (*Hinge region* in violett, BIRB796 in blau) um 180° nach außen gedreht ist. Die Unterschiede in der Konformation der *Hinge Region* sind durch Pfeile dargestellt.

BIRB796 unterbricht die Signalkaskade durch Bindung an p38 α und somit die TNF α - Produktion und wurde bereits in klinischen Phase II - Studien bei der Behandlung von Morbus Crohn und Schuppenflechte getestet. Allerdings wird das Medikament nicht weiter verwendet, da erhöhte Konzentrationen von Leberenzymen bei den Patienten festgestellt wurden (Peifer et al., 2006).

1.3.2.4 Die Gruppe der Dibenzo[a,d]cycloheptenone und Dibenzo[b,e]oxepinone

Lauer und Mitarbeiter entwickelten eine Gruppe von Inhibitoren für p38 α , die im Gegensatz zu anderen Inhibitoren eine bestimmte Eigenschaft haben sollten. Sie besitzen ein rigides, weitgehend starres, trizyklisches Gerüst. Da Kinasen beim Übergang in ihre aktive Konformation große strukturelle Veränderungen vollziehen, könnten Inhibitoren, die eine starke intrinsische Flexibilität aufweisen, einen Großteil ihrer Selektivität dadurch

einbüßen, dass sie sich durch eine Art *induced fit* den strukturellen Formen der Bindetasche anpassen (Laufer et al., 2006). Rigiden Inhibitoren sollte dies verwehrt sein, wodurch die Spezifität erhöht werden könnte. Dibenzo[a,d]cycloheptenone und Dibenzo[b,e]oxepinone weisen eine sehr rigide Struktur auf, so dass dadurch eine erhöhte Selektivität erzeugt werden soll, denn die Wirksamkeit eines Inhibitors hängt mit der verringerten Möglichkeit der Rotation aufgrund sterischer Hinderung zusammen.

Zwei Inhibitoren dieser Klasse sind in Abb. 1.17 dargestellt. NR243 ist ein Dibenzo[a,d]cycloheptenon und JH256 gehört zur Gruppe der Dibenzo[b,e]oxepinone.

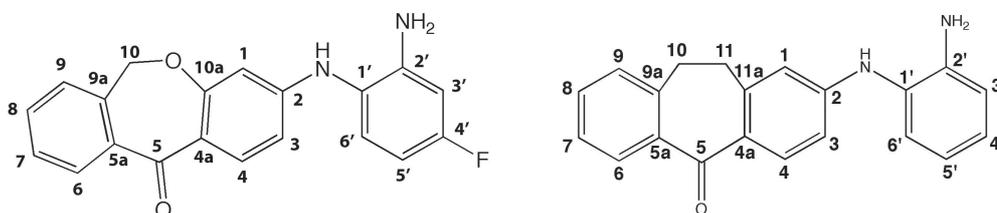


Abbildung 1.17: Darstellung der beiden Inhibitoren NR243 (2-(2-Amino-phenylamino)-10,11-dihydro-dibenzo[a,d]cyclohepten-5-on) und JH256 (3-(2-Amino-4-fluorphenylamino)-6,11-dihydro-dibenzo[b,e]oxepin-11-on).

Die IC_{50} -Werte sind 104 nM für NR243 und 38 nM für JH256 bei inaktivem p38 α . Komplexstrukturen der Inhibitoren mit p38 α liegen bisher noch nicht vor, so dass der Inhibierungsmechanismus nicht bekannt ist.

1.3.3 NMR und Docking

Die Bestimmung von atomar aufgelösten Strukturen biologischer Makromoleküle ist eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis ihrer Funktionsmechanismen. Aufgrund der 3D-Struktur von Molekülen lassen sich häufig bekannte Funktionen wie Bindungs- oder Wechselwirkungseigenschaften erklären und neu identifizierten Molekülen potentielle Funktionen zuordnen. Zur Aufklärung von Raumstrukturen existieren vor allem zwei Methoden:

1. Die Röntgenkristallographie und
2. die kernmagnetische Resonanzspektroskopie.

Die Röntgenkristallographie nutzt die Beugung von Röntgenstrahlen, um die Struktur

von kristallisierten Molekülen bzw. Proteinen zu bestimmen. Das Phänomen der kernmagnetischen Resonanz wurde 1946 von Bloch und Purcell entdeckt (Bloch et al., 1946, Purcell et al., 1946). Mit NMR lassen sich nicht nur Bestimmungen von Raumstrukturen durchführen, sondern auch dynamische Eigenschaften der Moleküle auf verschiedenen Zeitskalen charakterisieren (Palmer, 1997; Kay, 1998; Gardner & Kay, 1998), Proteinfaltungsprozesse untersuchen und Ligandeninteraktionen identifizieren (Dyson & Wright, 1998, Shuker et al., 1996).

Heutzutage sind Protein-Ligand-, Protein-Nucleinsäure- oder Protein-Protein-Interaktionen für die Strukturbiologie und die Arzneistoffentwicklung von großer Bedeutung. Dabei wird das Rezeptorprotein mit den Isotopen ^{13}C und ^{15}N markiert und erste Messungen von 2D-Spektren, die eine (^1H - ^{15}N)-Proteinrückgratkorrelation zeigen, durchgeführt, um optimale Messbedingungen herauszufinden. Die Bindung eines Liganden verändert die chemische Umgebung der Kerne im Bereich der Bindestelle, so dass in den Spektren Resonanzverschiebungen der entsprechenden Kerne zu beobachten sind.

Im Falle von Makromolekülen im Komplex mit niedermolekularen Liganden wird bevorzugt die Methode der selektiven Markierung angewendet, in der ein oder mehrere Sorten von Aminosäuren des Makromoleküls markiert werden, um die Komplexität der Spektren zu reduzieren und eine Zuordnung der Resonanzen zu den Aminosäuren zu erleichtern (Pellecchia et al., 2002). Eine Variante der selektiven Aminosäure-Markierung ist die segmentelle Markierung, bei der bestimmte Abschnitte von Polypeptidketten markiert werden (Xu et al., 1999). Einen großen Einfluss auf die biomolekulare NMR hat die Anwendung der Kernspinrelaxation im so genannten Kern-Overhauser-Effekt (*Nuclear Overhauser effect*, NOE; Neuhaus & Williamson, 2000). Die Größe der NOE-Korrelation hängt stark von dem Abstand ($\sim 1/r^6$) der beiden sich über die dipolare Kopplung wechselseitig relaxierenden Spins ab, weshalb NOE-Korrelationen sehr empfindliche Sonden zur Bestimmung räumlich naher intra- und intermolekulare Wechselwirkungen sind. In der makromolekularen NMR werden zweidimensionale (^1H , ^1H)-NOESY-Spektren aufgenommen, mit denen die Bindestellen zwischen einem Protein und einem kleinen Molekül bestimmt werden können.

Eine weitere Methode Strukturinformationen aus einem Protein-Ligandkomplex oder anderen komplexartigen Verbindungen zu gewinnen ist die Messung residualer dipolarer Kopplungen (*residual dipolar couplings*, RDC; Prestegard et al., 2005). RDCs sind Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, die durch das partielle (*residual*) Ausrichten des Moleküls

im Magnetfeld gemessen werden können. Diese partielle Ausrichtung wird mit speziellen Medien erreicht, wie z.B. Phagen (Hansen et al., 1998) oder dem Otting-Medium (Ruckert & Otting, 2000). Die Größe der RDCs ist abhängig von der Orientierung des NH-Vektors, der die dipolar koppelnden Protonen- und Stickstoffkerne verbindet. Diese Werte enthalten Informationen über die Orientierung der einzelnen Vektoren zum äußeren Magnetfeld sowie relativ zueinander. Mit Hilfe einer zuvor bestimmten Kristallstruktur können dann theoretische RDC-Werte ermittelt und mit den gemessenen Werten verglichen werden. Aus Abweichungen zwischen experimentellen und theoretischen RDCs können Rückschlüsse auf konformelle Änderungen des Proteins in Lösung im Vergleich zur Kristallstruktur gezogen werden.

So sind die beiden Methoden der Messung von RDCs und NOEs ein wichtiges Werkzeug, um Strukturinformationen aus Protein-Inhibitor-Komplexen zu gewinnen. Diese Strukturinformationen lassen sich zusammen mit einer bereits vorliegenden Kristallstruktur des Proteins mit Hilfe eines Docking-Programmes zu einer Komplexstruktur zusammenfügen. Ein Programm für diese Berechnungen ist HADDOCK (*High Ambiguity Driven Biomolecular Docking*). HADDOCK ist verwendbar für die Berechnung von Protein-Protein-, Protein-DNA-, Protein-RNA- sowie Protein-Ligand-Komplexen und wurde von Dominguez et al. (2003) entwickelt. Es verwendet Daten wie chemische Verschiebungen aus NMR-Titrationsexperimenten, Mutagenesedaten oder bioinformatische Vorhersagen, um diese in *ambiguous interaction restraints* (AIRs) für Strukturberechnungen umzuwandeln. Ein AIR ist definiert als Abstand zwischen allen Resten, die eventuell in eine Wechselwirkung involviert sein könnten und dem Molekül, mit dem das Protein interagiert. Durch Kombination der beiden Techniken NMR und Docking lassen sich Strukturmodelle von Komplexen oder Makromolekülen erstellen, ohne auf eine vollständige Resonanzzuordnung des Proteinrückgrats oder der Seitenketten angewiesen zu sein.

1.3.4 Zielsetzung der Arbeit

Um potentielle Arzneistoffe zu entwickeln, ist eine genaue Kenntnis des Bindungsverhaltens eines niedermolekularen Liganden im Zielprotein unerlässlich. Die Kristallographie ermöglicht die strukturelle Aufklärung der Inhibitorbindung und liefert somit wichtige Informationen für die Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen dem Liganden und seinem Zielprotein. Eine Kristallstruktur ist über den gesamten Kristallverbund gemittelte Auf-

nahme des Komplexes und gibt nur indirekte Hinweise über das dynamische Verhalten eines Proteins. Um die Dynamik eines Moleküls oder Proteins zu betrachten, eignet sich die Methode der kernmagnetischen Resonanz (NMR). p38 α gehört zu den MAP-Kinasen und spielt eine wichtige Rolle in den Stoffwechselwegen, die für die Stressantwort der Zelle zuständig sind. p38 α ist ein wichtiges Zielprotein in der Entwicklung von Inhibitoren, die bei der Behandlung von Krebs, Entzündungen und Autoimmunkrankheiten eingesetzt werden sollen. Deshalb ist es nicht nur interessant die Positionen solcher potentieller Arzneistoffe in der Bindetasche von p38 α mittels Kristallographie zu erforschen, sondern auch das dynamische Verhalten der Kinase bei Bindung eines Inhibitors zu beobachten. Aus diesem Grund sollten NMR-Messungen an dem p38 α /SB203580-Komplex durchgeführt werden, da SB203580 zu den Prototypen der p38 α -Inhibitoren gehört und eine Komplexkristallstruktur zuvor bestimmt worden war. Die Ergebnisse der NMR-Messungen sollten mit der Kristallstruktur verglichen werden, um eventuell auftretende dynamische Entwicklungen zu verfolgen.

Um schließlich festzustellen, ob das dynamische Verhalten von p38 α auch auf die Bindung anderer Kleinmoleküle übertragbar ist, sollte ein Inhibitor gewählt werden, der hoch selektiv an p38 α bindet. Da von der Gruppe der Dibenzo[a,d]cycloheptenone und Dibenzo[b,e]oxepinone bisher keine Komplexkristallstrukturen mit p38 α existieren, wurde durch eine Kooperation mit Prof. Laufer von der Universität Tübingen als Ziel nicht nur die Erforschung des dynamischen Verhaltens von p38 α , sondern auch die Aufklärung der Struktur mit einem dieser Inhibitoren festgelegt. Die Strukturaufklärung des Komplexes sollte mit der Methode der selektiven Markierung und Bestimmung intermolekularer *Nuclear Overhauser Effect*-Wechselwirkungen erfolgen, um als letzten Schritt eine Docking-Studie durchzuführen. Damit sollte gezeigt werden, dass es nicht nur möglich ist, das dynamische Verhalten eines Proteins im Komplex mit einem niedermolekularen Liganden zu erforschen, sondern auch eine Strukturaufklärung des Komplexes zu erzielen. Diese Methode würde eine Alternative zur Kristallographie darstellen, da die Kristallisation bei vielen Proteinen zwar möglich ist, aber oftmals auch eine Herausforderung darstellt.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

Tabelle 2.1: Name, Genotyp und Referenz der verwendeten *E.coli* Stämme

| Bakterienstamm | Genotyp | Referenz |
|----------------|---|---------------------------|
| BL21 (DE3) | F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> , (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> | Grodberg & Dunn, 1988 |
| DL31 (DE3) | MG1655, F ⁻ , LAM ⁻ , <i>aspC13</i> , <i>fnr-25</i> , <i>rph-1</i> , <i>ilvE12</i> , <i>tyrB507</i> , λDE3 | LeMaster & Richards, 1988 |
| XL2-Blue | <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>garA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> [<i>FproABlac^aZΔM15Tn10(Tet^r)AmyCam^r</i>] | Stratagene |

Plasmide, die das gewünschte Gen enthielten, wurden in die *Escherichia coli* (*E.coli*) Expressionsstämme BL21(DE3) und DL31(DE3) transformiert.

Tabelle 2.2: Name, Eigenschaften und Referenz der verwendeten Plasmide

| Plasmid | Resistenz | Eigenschaften | Referenz |
|-------------------------|-----------|--|---|
| pET15-p38 α | Amp | p38 α enthaltender pET15-Vektor | T. Stehle, Eberhard-Karls-Universität Tübingen |
| pET16b-TEV | Amp | modifizierter pET16b-Vektor mit einer zusätzlichen TEV-Protease Schnittstelle für die Entfernung des N-terminalen His ₇ -Tags | K. Saxena, Goethe Universität Frankfurt |
| pET16b-TEV-p38 α | Amp | p38 α -DNA enthaltender pEt16b-TEV-Vektor | in dieser Arbeit, Kapitel 2.1.2 |

Die für p38 α kodierende DNA wurde von pET15b in einen modifizierten pET16b-Vektor umkloniert. Dieser Vektor wird im Folgenden als pET16b-TEV-Vektor bezeichnet, da er einen His₇-Tag mit TEV-Schnittstelle in 5'-Richtung vor der für das Protein kodierende DNA kodiert. In Abb. 2.1 ist der pET16b TEV-Vektor mit der für p38 α kodierenden DNA dargestellt.

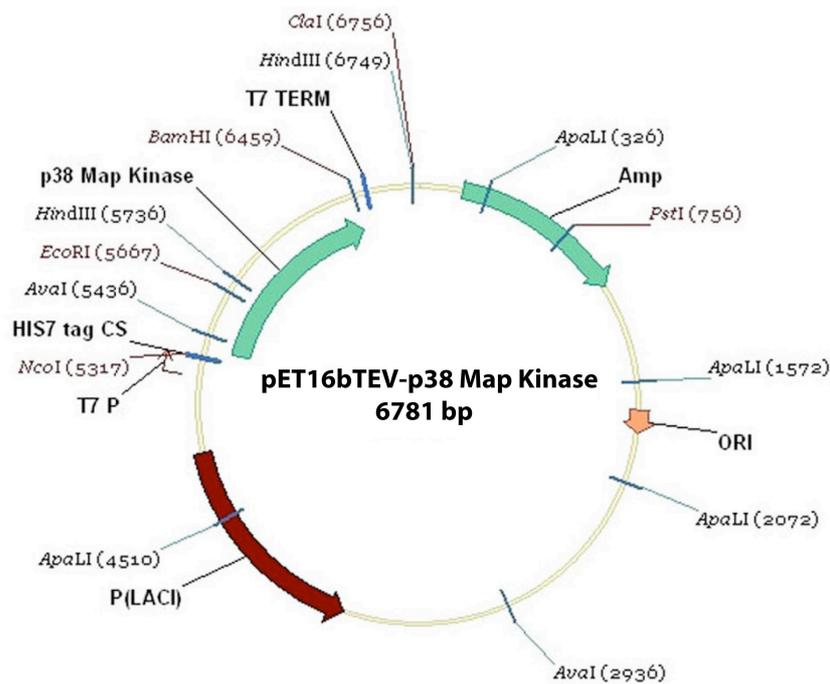


Abbildung 2.1: Vektorbild der p38 α kodierenden DNA inseriert in den Vektor pET16b-TEV.

2.1.2 Oligonukleotide für die Mutagenese und Klonierung

Im Folgenden sind die Primer für die Klonierung der p38 α -DNA aus dem pET15- in den pET16b-TEV-Vektor aufgeführt (MK3 und MK4). Da sich in der für p38 α kodierenden DNA eine *NdeI*-Schnittstelle befand, wurde diese mit den Mutageneseprimern MK1 und MK2 entfernt.

Tabelle 2.3: Mutageneseprimer

| Name | Sequenz | Eigenschaften |
|------|--|---|
| MK1 | CAGAGA AACTGCGGTTACTTAAACA CATGAAACATGAAAATGTGATTGG | <i>NdeI</i> -forward Deletionsprimer |
| MK2 | CCAATCACATTTTTCATGTTTCAT GTGTTTAAAGTAACCGCAGTTCTCTG | <i>NdeI</i> -reverse Deletionsprimer |
| MK3 | GACACCGGTCATATGTCTCAGGAG AGGCCAC | 5'-Primer für pET16b-TEV inklusive <i>NdeI</i> -Schnittstelle |
| MK4 | GTCTCTAGAGGATCCTCAGGACTCC ATCTCTTCTTGGTC | 3'-terminaler Primer für pET16b-TEV inklusive <i>BamHI</i> -Schnittstelle |

2.1.3 Medien und Antibiotika

Die Herstellung der Medien erfolgte wie in Tabelle 2.4 beschrieben. Alle verwendeten Medien wurden vor Gebrauch sowohl autoklaviert oder sterilfiltriert als auch mit 100 $\mu\text{g/L}$ Ampicillin bzw. 70 $\mu\text{g/L}$ Kanamycin versetzt. Für die Herstellung von Agarplatten wurden 15 g Agar zu 1 L LB-Medium gegeben und anschließend autoklaviert.

Tabelle 2.4: Verwendete Medien und Antibiotika

| Name | Menge | Chemikalie | Notiz |
|------------------------|----------------------|--|-------------------------------------|
| 2 x YT-Medium | 16 g | Trypton | |
| | 10 g | Hefeextrakt | |
| | 5 g | NaCl | |
| | auf 1 L auffüllen | ddH ₂ O | |
| LB - Medium | 10 g | Trypton | |
| | 5 g | Hefeextrakt | |
| | 10 g | NaCl | |
| | auf 1 L auffüllen | ddH ₂ O | |
| M9-Minimalmedium | 6.8 g | Na ₂ HPO ₄ | |
| | 3 g | KH ₂ PO ₄ | |
| | 0.5 g | NaCl | |
| | 1 g | NH ₄ Cl bzw. [¹⁵ N]H ₄ Cl | |
| | 4 g | Glucose bzw. [¹³ C ₆]-Glucose oder [D ₈]-Glycerin | |
| | 2 mL, 1 M | MgSO ₄ | |
| | 50 µL, 2 M | CaCl ₂ | |
| | 0.03 g | Thiaminhydrochlorid | |
| | 10 mL | Spurenelemente | |
| | auf 1 L auffüllen | ddH ₂ O bzw. 99.9 % D ₂ O | |
| Spurenelemente | 80 mL vorlegen | ddH ₂ O bzw. D ₂ O | nur in dieser Reihenfolge zugeben |
| | 0.6 g | FeSO ₄ × 7 H ₂ O | 10 min rühren |
| | 0.094 g | MnCl ₂ × 2 H ₂ O | 10 min rühren |
| | 0.08 g | CoCl ₂ × 6 H ₂ O | 10 min rühren |
| | 0.07 g | ZnSO ₄ × 7 H ₂ O | 10 min rühren |
| | 0.03 g | CuCl ₂ × 2 H ₂ O | 10 min rühren |
| | 0.002 g | H ₃ BO ₃ | 10 min rühren |
| | 0.025 g | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4 H ₂ O | 10 min rühren |
| | auf 100 mL auffüllen | ddH ₂ O bzw. D ₂ O | über Nacht rühren |
| Ampicillin-Stammlösung | 25 mg/mL | Ampicillin (Natriumsalz) | steril filtriert, haltbar bei -20 C |
| Kanamycin-Stammlösung | 70 mg/mL | Kanamycin | steril filtriert, haltbar bei -20 C |
| IPTG-Stammlösung | 1 M | IPTG | steril filtriert, haltbar bei -20 C |

2.1.4 Puffer und Lösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 2.1.4 beschrieben.

Tabelle 2.5: Verwendete Puffer und Lösungen

| Method | Name | Menge | Chemikalie |
|---------------------------------|----------------------|--------------------|-------------------|
| Affinitätschromatographie | Elutionspuffer 1 | 50 mM | Tris/HCl pH 7.8 |
| | | 500 mM | NaCl |
| | | 70 mM | Imidazol |
| | | 0.8 mM | PMSF |
| | Elutionspuffer 2 | 50 mM | Tris/HCl pH 7.8 |
| | | 500 mM | NaCl |
| | | 250 mM | Imidazol |
| | | 0.8 mM | PMSF |
| Agarose-Gelelektrophorese | 5 x DNA-Probenpuffer | 12.5 g | Ficoll 400 |
| | | 2.5 mL, 0.5 M | EDTA pH 8.0 |
| | | 0.5 g | SDS |
| | | 25 mg | Bromphenolblau |
| | | 25 mg | Xylencyanol FF |
| | auf 50 mL auffüllen | ddH ₂ O | |
| | 10 x TBE-Puffer | 108 g | Tris-HCl |
| | | 55 g | Borsäure |
| 40 mL, 0.5 M | | EDTA pH 8.0 | |
| auf 1 L auffüllen | ddH ₂ O | | |
| Größenausschlusschromatographie | Puffer | 25 mM | Tris/HCl pH 7.8 |
| | | 150 mM | NaCl |
| | | 10 mM | MgCl ₂ |
| | | 5 vol% | Glycerin |
| | | 1 mM | DTT |
| | | | |
| Ionenaustauschchromatographie | Dialysepuffer 1 | 25 mM | Tris/HCl pH 7.8 |
| | | 50 mM | NaCl |
| | Dialysepuffer 2 | 25 mM | Tris/HCl pH 7.8 |
| | | 50 mM | NaCl |
| | | 10 mM | MgCl ₂ |
| | | 5 vol% | Glycerin |
| | | 1 mM | DTT |
| | Puffer A | 50 mM | Tris/HCl pH 7.8 |
| | | 50 mM | NaCl |
| | | 10 mM | MgCl ₂ |
| | | 5 vol% | Glycerin |
| | | 1 mM | DTT |
| | Puffer B | 50 mM | Tris/HCl pH 7.8 |
| | | 1000 mM | NaCl |
| | | 10 mM | MgCl ₂ |
| | | 5 vol% | Glycerin |
| 1 mM | | DTT | |
| | | | |
| Ligation | T4-DNA Ligase Puffer | 40 mM | Tris/HCl pH 7.8 |
| | | 10 mM | MgCl ₂ |

Tabelle 2.5: Verwendete Puffer und Lösungen

| Method | Name | Menge | Chemikalie |
|-------------------|--------------------------|----------------------|---|
| NMR-Messpuffer | | 1 mM | DTT |
| | | 0.5 mM | ATP |
| | NMR-Dialysepuffer 1 | 50 mM | Hepes pH 7.4 |
| | | 150 mM | NaCl |
| | NMR-Dialysepuffer 2 | 5 mM | DTT |
| | | 50 mM | Hepes pH 6.8 |
| 150 mM | | NaCl | |
| PCR | <i>Cloned Pfu</i> Puffer | 5 mM | DTT |
| | | 20 mM | Tris/HCl pH 8.8 |
| | | 2 mM | MgSO ₄ |
| | | 10 mM | KCl |
| | | 10 mM | (NH ₄) ₂ SO ₄ |
| | | 0.1 % | Triton X-100 |
| Kompetente Zellen | PIPES-Puffer | 0.1 mg/mL | BSA |
| | | 10 mM | PIPES pH 7.0 |
| | | 15 % | Glycerin |
| | | 75 mM | CaCl ₂ |
| | | 5 mM | MgCl ₂ |
| SDS-PAGE | APS | 10 % | (w/v) in H ₂ O |
| | 4 x Probenpuffer | 1.7 g | SDS |
| | | 7.5 mL, 1.0 M | Tris/HCl pH 6.8 |
| | | 23 mL | Glycerin |
| | | 50 mg | Bromphenolblau |
| | | 0.5 mL | β -Mercaptoethanol |
| | Laufpuffer | auf 50 mL auffüllen | ddH ₂ O |
| | | 1 g | SDS |
| | | 3.03 g | Tris/HCl |
| | | 14.4 g | Glycin |
| | Färbelösung | auf 1 L auffüllen | dd H ₂ O |
| | | 2.2 g | Coomassie Brilliant Blau G250 |
| | | 100 mL | Essigsäure |
| | | 250 mL | Isopropanol |
| | Entfärbelösung | 650 mL | ddH ₂ O |
| 100 mL | | Essigsäure | |
| 900 mL | | dd H ₂ O | |
| TEV-Spaltung | Dialysepuffer | 50 mM | Tris/HCl pH 7.8 |
| | | 150 mM | NaCl |
| | | 15 mM | Imidazol |
| | | 0.5 mM | EDTA |
| | | 1 mM | DTT |
| Zelllysis | Lysispuffer | 50 mM | Tris/HCl pH 7.8 |
| | | 500 mM | NaCl |
| | | 10 mM | Imidazol |
| | | 0.8 mM | PMSF |
| | | 1 Tablette pro 70 mL | Complete EDTA free |

2.1.5 Enzyme und Chemikalien

In dieser Arbeit verwendete Enzyme und Chemikalien sind in Tabelle 2.6 zusammengefasst. Hier nicht aufgeführte Standardchemikalien wurden von der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) sowie Fluka (Neu-Ulm, Deutschland) bezogen.

Tabelle 2.6: Verwendete Enzyme und Chemikalien

| Chemikalie/Enzym | Hersteller |
|---|---|
| Acetonitril, Ampicillin, APS, Dinatriumphosphat, Ethidiumbromid, EDTA, Hepes, Imidazol, Magnesiumchloridhexahydrat, Kaliumdihydrogenphosphat, Rotiphorese Gel 30, TEMED, Trypton, Hefeextrakt, β -Mercaptoethanol | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Adenin, Guanosin, Thymin, Uracil, Cytosin, Biotin, NAD | Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland |
| Agar, Aminosäuren unmarkiert, DNase I, IPTG | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Agarose, Kanamycin | GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland |
| Aminosäuren [^{15}N]- oder [$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$]-markiert | Isotec, Miamisburg, USA |
| Ammoniumchlorid (>98 % [^{15}N]) | Cambridge Isotope Lab., Andover, USA |
| Bench Mark protein ladder | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| Complete TM -Protease-Inhibitor-Tabletten ohne EDTA, | Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland |
| Elastase, Protease K, Trypsin | |
| [$^{13}\text{C}_6$]-D-Glucose (> 98 % [^{13}C]), [D_8]-Glycerin (98 % [^{13}C]) | Spectra Stabel Isotops, Columbia, USA |
| Dithiothreitol (DTT) | Gerbu, Gaiberg, Deutschland |
| 99.9 % D_2O | Eurisotop, Gif-sur-Yvette, Frankreich |
| <i>Bam</i> HI, <i>Nde</i> I, CIAP | Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland |
| Hot Star Taq, Ni-NTA Agarose | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| Nucleobond AX PC 100, NucleoSpin Plasmid, NucleoSpin, Extract II | Macherey-Nagel, Düren, Deutschland |
| Pfl NMR co-solvent | ASLA ^{biotech} , Riga, Letland |
| SDS | Serva, Heidelberg, Deutschland |
| Turbo <i>Pfu</i> DNA Polymerase, dNTP | Stratagene, La Jolla, USA |
| Mono Q 10/10 | Amersham Biosciences AB, Uppsala Schweden |

2.1.6 Materialien

Im Folgenden sind Laborinstrumente und Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Tabelle 2.7: Instrumente und Verbrauchsmaterialien

| Methoden | Name | Hersteller |
|------------------------------|--|--|
| Dialyseschläuche | Spectra Por Membra MWCO 30 kDa | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Elektrophorese | Kodak Elektrophorese Dokumentations- und Analysesystem 120 | Eastman Kodak Co., New York, USA |
| | Power Pac 300, PAGE: Mini-PROTEAN 3 Cell | BioRad, München, Deutschland |
| | Agarosegelelektrophorese: Mini-Sub Cell GT | |
| FPLC | Äkta Purifier, Äkta Basic, Frac-100 Fraktionssammler, HiLoad Superdex 200 prep grade 16/60 | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland |
| French Press | <i>French Pressure Cell Press</i> | Thermo Electron Corporation, Deutschland |
| Gefrierschränke | -80 °C, MDF-U71V Ultratieftemperatur | SANYO Electric Co., Ltd, Osaka, Japan |
| | -20 °C Gefrierschrank | Liebherr, Deutschland |
| Inkubatoren | Infors Multitron HT | Infors Multitron, Einsbach, Deutschland |
| | Certomat R | B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland |
| Konzentratoren | Vivaspin 20 30 kDa | Sartorius, Göttingen, Deutschland |
| Lyophilisation | Christ Alpha 2-4 | B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland |
| NMR | AVANCE 400, AVANCE 600, AVANCE 700, AVANCE 800, AVANCE 900, | Bruker, Karlsruhe, Deutschland |
| | Shigemi NMR Probenröhrchen, 5 mm | Tokyo, Japan |
| pH-Meter | PB11 PY-P10 | Sartorius, Göttingen, Deutschland |
| Spektroskopie | UV /VIS-Spektrophotometer | Hewlett-Packard 8453, Böblingen, Deutschland |
| Temperaturzyklus-Steuergerät | HYBAID PCR sprint | Perkin Elmer, Wellesley, USA |
| Waagen | Sartorius B 3100 S und AC 210 S | Sartorius, Göttingen, Deutschland |
| Zentrifugen | Beckmann-Coulter Avanti J-20 und J-301, Rotoren: JLA 9.100, JA 25.50 | Beckmann, Krefeld, Deutschland |
| | Eppendorf Zentrifuge 5415D und 5804 | Eppendorf Wesseling-Brenzdorf, Deutschland |
| | Heraeus Biofuge primo | Kendro, Hanau, Deutschland |

2.1.7 Software

Folgende Software wurde zur Aufnahme, Bearbeitung und Auswertung der NMR-Spektren verwendet.

Tabelle 2.8: Software

| Programm | Referenz |
|-----------------|--|
| CARA | Keller, 2004 |
| NMRPipe/NMRDraw | Delaglio et al., 1996 |
| PALES | Zweckstetter & Bax, 2000 |
| Pymol | DeLano, 2002 |
| Sparky 3 | T. D. Goddard und D. G. Kneller, University of California, San Francisco, 2006 |
| Topspin 2.0 | Bruker, Karlsruhe, Deutschland, 2007 |
| X-WINNMR 3.5 | Bruker, Karlsruhe, Deutschland, 2004 |

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Verfahren

In diesem Kapitel werden alle Methoden, die in dieser Arbeit zur Anwendung gelangten, im Allgemeinen dargestellt. Die detaillierten Klonierungs- und Reinigungsstrategien für das Protein werden in den Kapiteln 3 und 4 behandelt.

2.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zu Quantifizierung von DNA sowie zur Kontrolle eines Restriktionsverdau. DNA-Fragmente wurden auf einem horizontalen Agarosegel getrennt. Zur Herstellung eines Gels wurde 1 % (w/v) Agarose in 40 mL 1 x TBE-Puffer geschmolzen. Nach kurzer Abkühlphase wurde 1 μ L Ethidiumbromid zu der Pufferlösung gegeben und diese in die Elektrophoresekammer gegossen. Jede DNA-Probe wurde vor dem Auftrag mit 1/5 ihres Volumens mit 5 x DNA-Probenpuffer gemischt. Mit einer angelegten konstanten Spannung von 90 V dauerte die Elektrophorese ca. 70 min. Das Gel wurde unter einer UV-Lampe fotografiert und das Bild zur Dokumentation verwendet.

2.2.1.2 Isolierung und Reinigung von DNA

Aus 10 mL XL2-blue *E.coli*-Übernachtskultur wurden 20 μ g Plasmid-DNA gewonnen. Für die DNA-Aufreinigung wurde der NucleoSpin Plasmid Kit verwendet. Aus 100 mL XL2-blue *E.coli*-Übernachtskultur wurden 180 μ g Plasmid-DNA mit dem Nucleobond AX PC 100 Extraktionskit gewonnen. Um die DNA von Enzymen, Salzresten und anderen Pufferbestandteilen zu befreien, wurde eine Silicagel-Membran-Säule (Nucleobond) entsprechend der Vorschrift benutzt. DNA Fragmente wurden nach der PCR (Kapitel 2.2.1.3) aus dem 1 %igen Agarosegel mit einem NucleoSpin Extract II Gelextraktionskit aufgereinigt.

2.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*; Mullis et al., 1986) ermöglicht die Amplifizierung von DNA-Abschnitten, die von zwei definierten DNA-Sequenzen begrenzt werden. Die PCR beruht auf der zyklischen Wiederholung von drei Schritten:

I) der Denaturierung von doppelsträngiger DNA in einzelsträngige,

II) der Anlagerung (*annealing*) von synthetischen Oligonukleotiden (*primer*) an die flankierenden Enden des zu amplifizierenden Genbereichs und

III) der Polymerisierung der doppelsträngigen DNA, ausgehend von den *Primern*, mit Hilfe der DNA-Polymerase sowie der vier Desoxynukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP).

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Temperaturzyklus-Steuergerät mit Heizdeckel durchgeführt. Es wurde folgender Reaktionsansatz verwendet: 20-30 ng der Matrix-DNA wurden mit 10 pmol jedes Primers, 100 nmol Desoxyribonukleotide (dNTPs) und 2.5 U *Pfu* Polymerase in 25 μ L Gesamtvolumen gemischt. Nach einem anfänglichen Denaturierungsschritt von 2 min bei 95 °C wurde die PCR mit 30 Zyklen wie folgt durchgeführt:

- 1.) Denaturierung für 30 sec bei 95 °C,
- 2.) Anlagerung der beiden Primer (*forward* und *reverse*) für 30 sec bei 55 °C und
- 3.) Polymerisierung für 1 min pro kb bei 72 °C.

Der abschließende Polymerisationsschritt fand bei 72 °C für 10 min statt.

Für die Suche nach positiven Klonen bei der Kolonie-PCR wurden die *E.coli*-Zellen direkt in die PCR eingesetzt. Dazu wurden die Zellen von Einzelkolonien der Agarplatten mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in das PCR-Reaktionsgefäß überführt. Diese Pipettenspitzen wurden anschließend verwendet, um eine 1 mL Kultur (2x YT-Medium mit Antibiotikum) anzuimpfen. Diese Kultur wurde über Nacht bei 120 rpm geschüttelt und bei 37 °C inkubiert. Da es sich bei der PCR um *E.coli*-Zellen als Ausgangsprodukt handelte, wurde der erste Denaturierungsschritt von 2 min auf 15 min verlängert. Dadurch werden die Zellen aufgeschlossen und die DNA für die Oligonukleotide leicht zugänglich gemacht. Jede 25 μ L Kolonie-PCR-Reaktion enthielt 10 pmol jedes Primers (*forward* sowie *reverse*), 50 nmol dNTPs und 0.3 U HotStar Taq Polymerase.

Die Kolonie-PCR bestand aus 25 Zyklen mit

- 1.) der Denaturierung für 30 sec bei 95 °C,
- 2.) der Anlagerung der Primer für 1 min bei 55 °C und
- 3.) der Polymerisierung für 2 min pro kb bei 72 °C.

Der abschließende Polymerisationsschritt fand bei 72 °C für 10 min statt.

Die PCR-Produkte wurden zur Analyse und Reinigung auf ein Agarosegel (Kapitel 2.2.1.1) aufgetragen. Die aus LB-Kulturen isolierte Plasmid-DNA (Kapitel 2.2.1.2) mit einem positiven PCR-Ergebnis wurde zur Überprüfung ihrer Richtigkeit sequenziert (Kapitel 2.2.1.6).

2.2.1.4 Klonierung von DNA-Fragmenten

Sowohl die Plasmid-DNA des Vektors als auch die für das Protein kodierende DNA wurden mit geeigneten Restriktionsendonukleasen verdaut. Die DNA wurde mit 2-10 units Restriktionsendonukleasen pro μg DNA in den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen verdaut. Der Verdau wurde bei Verwendung des Enzyms *Bam*HI 1 - 2 h und bei Verwendung anderer Enzyme über Nacht bei 37 °C durchgeführt. Für eine erfolgreiche Ligation des Vektors mit dem Insert wurde der Vektor nach Verdau mit 1 U Calf-Intestin-Alkalischer Phosphatase (CIAP) behandelt, um Phosphatgruppen am 5'-Ende zu entfernen und einen Ringschluss des Vektors (Religation) zu verhindern. Dazu wurde 1 μL CIAP zu der letzten Verdaureaktion ohne vorherige Aufreinigung der DNA gegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Für die Ligrationsreaktion mit überhängenden Enden (*sticky ends*) wurden 50 - 100 ng der Vektor-DNA mit der Insert-DNA in einem Verhältnis von 1 : 3 in T4-DNA-Ligasepuffer gemischt und mit 4 U T4-DNA Ligase über Nacht in einem Wasserbad bei 14 °C inkubiert.

2.2.1.5 Mutagenese

Zur Entfernung einer Enzymschnittstelle in der für das Protein kodierenden DNA wurde ein einzelner Basenaustausch mit dem QuikChange site-directed Mutagenese-Kit durchgeführt. Primer für die Mutagenese wurden entsprechend des *site directed-QuickChangeTM*-Mutagenese-Kit-Handbuchs hergestellt (Tabelle 2.3). 50 μL der PCR-Reaktionslösung enthielten 125 ng jedes Primers, 10 ng des Matrix-DNA-Plasmids, 6.25 μmol dNTPs und 2.5 U Turbo *Pfu* Polymerase in Cloned *Pfu* Puffer. Der PCR-Zyklus bestand aus einem anfänglichen Temperaturschritt von 30 sec bei 95 °C und wurde wie folgt weitergeführt:

- 1.) Denaturierung für 30 sec bei 95 °C,
- 2.) Anlagerung der beiden Primer für 1 min bei 55 °C und
- 3.) Polymerisierung für 1 min pro kb bei 68 °C.

Die Anzahl der PCR-Zyklen liegt bei einem einzelnen Basenaustausch bei 12.

Im Anschluss an die PCR wurde 1 U des Restriktionsenzym *Dpn*I zu der Reaktionsmischung gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert, um die *Template*-DNA zu verdauen. Anschließend wurde 1 μL der Reaktionsmischung in 50 μL *E.coli*-XL2-blue-Zellen transformiert (Kapitel 2.2.1.9), die Plasmid-DNA nach Kultivierung über Nacht bei 37 °C aufgereinigt (Kapitel 2.2.1.2) und durch Sequenzierung das Ergebnis der Mutagenese über-

prüft (Kapitel 2.2.1.6).

2.2.1.6 Sequenzierung

Sequenzierungen von gereinigter Plasmid-DNA wurden vom DNA-Sequenzierservice Seq-Lab (Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Im sogenannten *HotShot*-Verfahren werden die Primer und die zu sequenzierende DNA vorgemischt und mit Hilfe eines speziellen *Cycle Sequencing*-Protokolls wird die Sequenzierung nach der Methode von Maxam und Gilbert (Maxam & Gilbert, 1977) durchgeführt. Dazu wurde ein DNA-Gemisch mit einem Gesamtvolumen von 7 μL bestehend aus jeweils 20 pmol der *forward* und *reverse* Sequenzierprimer und 0.6 - 0.7 μg der Plasmid-DNA (in ddH₂O) in ein 200 μL PCR-Gefäß mit einem flachen Deckel gegeben.

2.2.1.7 Konzentration und Reinheit von DNA

Die Konzentration einer verdünnten DNA-Lösung kann bestimmt werden, indem man die optische Dichte (OD) bei 260 nm (A_{260}) misst (Kapitel 2.2.2.7). Eine optische Dichte von 1 bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, bei einzelsträngiger DNA einer Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989).

2.2.1.8 Herstellung kompetenter DL31(DE3)-Zellen

Kompetenz ist die Fähigkeit von Zellen aus dem umgebenen Medium vorhandene DNA aufzunehmen und damit Voraussetzung für die Transformierbarkeit von Bakterien. *E. coli*-Zellen sind von Natur aus nicht kompetent, so dass sie mit Hilfe einer Calciumchlorid-Behandlung und anschließendem Hitzeschock in den Zustand einer künstlichen Kompetenz überführt werden müssen. Der gewünschte *E. coli*-Expressionsstamm wurde auf einer Agarplatte ausgestrichen und nach Anziehen über Nacht bei 37 °C wurden Kolonien von der Platte gepickt, in eine 1 mL LB-Medium-Kultur versetzt mit Antibiotikum gegeben und für eine weitere Nacht bei 37 °C und 120 rpm angezogen. 50 mL LB-Medium-Kultur mit Antibiotikum wurden mit 500 μL dieser Vorkultur versetzt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.375 bei 37 °C und 120 rpm angezogen. Die Kultur wurde 5 - 10 min auf Eis gestellt und anschließend bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert. Um die Zellen nicht zu gefährden wurde die Zentrifuge auf niedrigster Stufe abgebremst. Der Überstand wurde abgenommen und das

Pellet in 10 mL kaltem PIPES-Puffer aufgenommen. Dann wurde die Zellsuspension wieder abzentrifugiert (1480 g, 7 min, 4 °C) und die überstehende Lösung verworfen. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal durchgeführt. Danach wurde auf das Zellpellet 2 mL PIPES-Puffer gegeben und die Suspension über Nacht auf Eis aufbewahrt. Am darauffolgenden Tag, wurden die Zellen in 50 μ L Aliquots aufgeteilt, in einer Mischung aus Ethanol/Trockeneis schockgefroren und bei - 80 °C aufbewahrt.

2.2.1.9 Transformation in E.coli

Ein 50 μ L Aliquot der bei -80 °C gelagerten kompetenten *E.coli*-Zellen wurde langsam auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1 μ L Plasmid-DNA versetzt. Die Mischung wurde 30 min auf Eis inkubiert bevor sie 45 sec bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen wurde. Danach wurden die Zellen 2 min auf Eis gekühlt, mit 950 μ L auf RT temperiertem 2x YT-Medium versetzt und bei 37 °C 1 h inkubiert. Nach Zentrifugation der Zellen bei 3000 g für 5 min wurde das Pellet in ca. 120 μ L Medium resuspendiert und auf Agarplatten mit Ampicillin- bzw. Kanamycinresistenz ausgestrichen.

2.2.2 Proteinexpression und Reinigung

2.2.2.1 Zellkultivierung

Die bakterielle Expression erfolgte in BL21(DE3) bzw. in DL31(DE3)-Zellen. Agarplatten und alle flüssigen Medien enthielten das Antibiotikum Ampicillin bei der Verwendung von BL21(DE3)-Zellen bzw. Ampicillin und Kanamycin bei DL31(DE3)-Zellen. Eine 1 mL LB-Tageskultur wurde mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft. Eine 40 mL M9-Minimalmedium-Vorkultur wurde mit 80 μ L der Tageskultur inokuliert und über Nacht bei 37 °C angezogen. Die 40 mL Übernachtkultur wurde zum Animpfen einer 1 L M9-Minimalmedium-Kultur verwendet. Zur Herstellung von markiertem Protein wurden die für M9-Minimalmedium erforderlichen [¹³C]- und [¹⁵N]-Quellen bzw. die [¹³C/¹⁵N]-markierten Aminosäuren verwendet. Bei der Produktion von Protein mit einer oder mehreren markierten Aminosäuren wurden 100 mg der [¹³C/¹⁵N]-markierten Aminosäure 1 h vor Induktion zur Expressionskultur gegeben.

Im Falle der Expression von deuteriertem Protein wurden Vorkulturen mit steigendem D₂O-Gehalt (33 %, 55 % und 99%) und Volumen (2 - 40 mL) in M9-Minimalmedium bei 37 °C angezogen. Vor jedem Wechsel der Zellen in ein Medium mit höherem D₂O-Gehalt

wurden zwischen 500 μL und 2 mL der Zellsuspension 5 min bei 3000 g abzentrifugiert und das Pellet in frischem Medium resuspendiert. Zur vollen Deuterierung des Proteins wurden anstatt 4 g/L Glucose 4 g/L $[\text{D}_8]$ -Glycerin verwendet.

Bei Verwendung der DL31(DE3)-Zellen wurden dem M9-Minimalmedium alle erforderlichen zwanzig Aminosäuren einzeln zugesetzt, da diesen Zellen die Transaminaseaktivität fehlt und somit der katalytische Schritt der Aminogruppenübertragung verhindert wird. Bei Zugabe aller Aminosäuren wird der Stoffwechsel dieser Zellen übergangen, da die Zellen auf die bereits vollständig synthetisierten Aminosäuren zurückgreifen können. Bei selektiver Markierung einer Aminosäure wurden 100 mg der $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markierten Aminosäure zur letzten Vorkultur vor der Expression gegeben. Die entsprechende unmarkierte Aminosäure wurde nicht mehr verwendet (Medium in Tab. 2.9).

Das Zellwachstum der Expressionskultur wurde durch Messung der OD_{600} verfolgt. Bei einer OD_{600} von 0.4 wurde die Temperatur von 37 °C auf 25 °C reduziert. Bei Erreichen der Zieltemperatur wurde die Bakterienkultur mit 1.0 mM IPTG versetzt, um die Synthese des Proteins zu induzieren. Bakterienkulturen wurden bei Verwendung von LB-Medium 4 h bzw. M9-Minimalmedium 9 - 12 h bis zu einer OD_{600} von ca. 1.1 angezogen und schließlich bei 7460 g für 20 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Die Kontrolle der Überexpression des Proteins erfolgte durch Probennahme vor Induktion und zu verschiedenen Zeiten während der Expression und Analyse dieser mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.8). Für die Langzeitaufbewahrung eines *E.coli*-Expressionsstammes wurden 350 μL einer LB-Tageskultur mit 150 μL 50 %igem Glycerin gemischt und bei -80 °C gelagert.

Tabelle 2.9: Modifiziertes M9-Minimalmedium für DL31(DE3) Zellen

| Name | Menge | Chemikalie |
|------------------|------------------------|--|
| M9-Minimalmedium | 6.8 g | Na_2HPO_4 |
| | 3 g | KH_2PO_4 |
| | 0.5 g | NaCl |
| | 1 g | NH_4Cl bzw. $^{15}\text{N}[\text{H}_4\text{Cl}]$ |
| | 4 g | Glucose bzw. $^{13}\text{C}_6$ -Glucose |
| | 2 mL, 1 M | MgSO_4 |
| | 50 μL , 2 M | CaCl_2 |
| | 0.03 g | Thiaminhydrochlorid |
| | 10 mL | Spurenelemente (Tabelle 2.4) |
| | auf 1 L auffüllen | ddH_2O bzw. 99.9 % D_2O |

Tabelle 2.9: Modifiziertes M9-Minimalmedium für DL31(DE3) Zellen

| Name | Menge | Chemikalie |
|-----------------------------|------------|----------------|
| Aminosäuren | 0.5 g | Alanin |
| | 0.4 g | Arginin |
| | 0.4 g | Asparagin |
| | 0.4 g | Asparaginsäure |
| | 0.05 g | Cystein |
| | 0.4 g | Glutamin |
| | 0.65 g | Glutaminsäure |
| | 0.55 g | Glycin |
| | 0.1 g | Histidin |
| | 0.23 g | Isoleucin |
| | 0.23 g | Leucin |
| | 0.42 g | Lysin |
| | 0.25 g | Methionin |
| | 0.13 g | Phenylalanin |
| | 0.1 g | Prolin |
| | 2.1 g | Serin |
| 0.23 g | Threonin | |
| 0.17 g | Tyrosin | |
| 0.1 g | Tryptophan | |
| 0.23 g | Valin | |
| Pyridin- und Pyrimidinbasen | 0.5 g | Adenosin |
| | 0.24 g | Cytosin |
| | 0.65 g | Guanosin |
| | 0.2 g | Thymin |
| | 0.5 g | Uracil |
| weitere Zusätze | 100 mg | NAD |
| | 10 mg | Biotin |

2.2.2.2 Zelllysis

Jedes Zellpellet wurde nach dem Auftauen auf Eis in 70 mL Lysispuffer aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Hochdruckhomogenisator (*French Press*) aufgeschlossen. Hochdruckhomogenisatoren gehören zu der Gruppe der Strömungsdispergiermaschinen, die nach dem Druckentspannungsprinzip arbeiten. Eine Hochdruckkolbenpumpe sorgt für einen druckunabhängigen Volumenstrom und erzeugt Drücke bis zu 2000 bar. Mit dem Homogenisierventil wird der gewünschte Druckverlust eingestellt, so dass die Zellen aufgeschlossen werden. Diese Prozedur wurde mit der 70 mL Zellsuspension

insgesamt dreimal wiederholt. Durch Zentrifugation bei 15 000 g für 50 min bei 4 °C wurden nicht aufgeschlossene Zellen und Zellwandbestandteile vom zellfreien Rohextrakt abgetrennt und dieser für die weitere Reinigung verwendet. Die Kontrolle des Zellaufschlusses erfolgte durch Probennahme nach Zellaufschluss und Analyse dieser mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.8).

2.2.2.3 Nickel-Nitriltriessigsäure-Affinitätschromatographie

Die für diesen Aufreinigungsschritt erforderlichen Puffer sind in Tabelle 2.1.4 aufgeführt. Die hohe Selektivität dieser Affinitätschromatographie beruht auf der Interaktion von Proteinen, die ein His-Tag besitzen, mit Nickelionen. Ni²⁺ verfügt über 2 freie Koordinationsstellen, die mit den Imidazolringen von jeweils 2 Histidinen des His-Tags des zu reinigenden Proteins besetzt werden. Der zellfreie Rohextrakt (Kapitel 2.2.2.2) wurde mit 3 mL einer 50 %igen Nickel-Nitriltriessigsäure-Agarose-Lösung (Ni-NTA), die mit Lysispuffer voräquilibriert wurden, für 1 h bei 4 °C auf einem Schwenktisch inkubiert. Anschließend wurde der Durchfluss der Säule gesammelt und das Harz mit 5 Säulenvolumina (CV, *column volumes*) Lysispuffer gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit einem stufenweisen Imidazolgradienten (70 - 250 mM) von der Agarose gewaschen, da das stärker komplexierende Imidazol zu einer Verdrängung des Proteins von der Agarose führt. Es wurden 2 - 3 mL Fraktionen gesammelt. Alle verwendeten Puffer wurden vor Gebrauch auf 4 °C gekühlt.

Die Kontrolle der Reinigung erfolgte durch Probennahmen von Überstand, Durchfluss, Waschdurchfluss und den Elutionsfraktionen durch eine SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.8).

2.2.2.4 TEV-Protease-Spaltung

Der amino-terminale His₇-Tag, der durch die TEV-Protease-Erkennungssequenz Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly im pET16b-TEV-Vektor mit dem Protein verbunden ist, wird durch Verwendung von TEV-Protease abgespalten (TEV, *Tobacco Etch virus protease*). Die Spaltung erfolgt jeweils zwischen den Aminosäuren Gln und Gly, so dass ein Glycin am amino-terminalen Ende des Proteins dem Methionin, das den Anfang des Proteins darstellt, vorangestellt ist. Zuerst wird das Protein mit dem His-Tag nach der Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Kapitel 2.2.2.3) bei 4°C über Nacht gegen 2 L TEV-Puffer dialysiert (Tab. 2.1.4). Danach wird die Konzentration des Proteins bestimmt (Kapitel 2.2.2.7)

und 0.2 μg TEV-Protease pro 100 μg Protein zugesetzt. Die Spaltreaktion wurde 12 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde die Proteinlösung über Nacht bei 4 °C gegen Lysispuffer (Tab. 2.1.4) dialysiert, um durch einen weiteren Ni-NTA-Agarose-Reinigungsschritt die TEV-Protease abzutrennen. Dazu wurde die dialysierte Proteinlösung wieder mit Ni-NTA-Agarose inkubiert (Kapitel 2.2.2.3). Der Säulendurchfluss und 20 mL des darauf folgenden Waschschriffs mit Lysispuffer wurden für die weitere Reinigung vereinigt.

2.2.2.5 Anionenaustauschchromatographie

Die Anionenaustauschchromatographie wurde an einer FPLC-Anlage (ÄKTA Purifier) durchgeführt. Für die Anionenaustauschchromatographie wurde das Säulenmaterial Mono Q verwendet. Als Säule diente eine HR 10/10, welche mit 2 - 4 CV des Mono Q Puffers A und 2 - 4 CV des Mono Q Puffers B voräquilibriert wurde (Tab. 2.1.4).

Die Proteinlösung wurde zuerst gegen 2 L Dialysepuffer 1 sowie 2 L Dialysepuffer 2 dialysiert (Tab. 2.1.4), um die Salzkonzentration zu erniedrigen, bevor diese über einen Superloop mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min auf die Säule aufgetragen wurde. Anschließend wurde das auf der Säule gebundene Protein mit 2 CV Puffer A gewaschen. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten von 0 - 100 % Puffer B (entspricht 50 mM - 1 M NaCl) bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min. Das Eluat wurde in 1.0 ml Fraktionen gesammelt und die Proteinkonzentration der Messung der Absorption bei 280 nm (A_{280}) bestimmt (Kapitel 2.2.2.7).

2.2.2.6 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie wurde an einer FPLC-Anlage (ÄKTA Basic) durchgeführt. Für diese Chromatographiemethode wurde das Säulenmaterial Superdex 200 verwendet. Als Säule diente eine Highload 16/60, die mit 2 CV des Puffers voräquilibriert wurde (Tab. 2.1.4). Die Proteinlösung wurde gegen 2 L Superdexdialysepuffer über Nacht dialysiert. Danach wurde die Proteinlösung auf ca. 1 - 1.5 mL aufkonzentriert (Kapitel 2.2.2.7) und über einen 2 mL Loop auf die Säule aufgetragen. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 mL/min und die Fraktionsgröße 1 mL. Die Protein-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und die Proteinkonzentration durch Messung der Absorption bei 280 nm (A_{280}) bestimmt (Kapitel 2.2.2.7).

2.2.2.7 Aufkonzentrierung und Konzentrationsbestimmung des Proteins

Die Aufkonzentrierung des Proteins wurde in 2 - 50 mL Konzentratoren mit einem MWCO (*molecular weight cutoff*) von 30 kDa bei 1500 g und 4 °C durchgeführt. Die Konzentration wurde durch Messung der Absorption bei A_{280} nm in UV-Halbmikro-Küvetten (Plastibrand, Fisher, Schwerte) mit einer Schichtdicke von 20 mm gemessen. Es gilt das Lambert-Beer'sche Gesetz:

$$A = c \cdot d \cdot \epsilon$$

mit A als die im Photometer gemessene Absorption, c der molaren Konzentration (mol/L), d der Schichtdicke (cm) und ϵ des molaren Absorptionskoeffizienten ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$), der zuvor auf der Basis der Aminosäuresequenz berechnet wurde (Gill & von Hippel, 1989). Der verwendete Messbereich lag zwischen 0.05 und 1.0 Absorptionseinheiten. Lösungen mit höheren Werten wurden mit dem Referenzmedium 1 : 10 oder 1 : 20 verdünnt. Das Protein wurde zur Lagerung auf Eis bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.2.8 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in Polyacrylamidgelen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen im diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli (1970). Das 12 %ige Trenngel und das 3 %ige Sammelgel wurden nach Sambrook, Fritsch, & Maniatis (1989) angefertigt (Tabelle 2.10). Die Proteinproben wurden 3 : 1 mit 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 100 °C 4 min denaturiert. Die Proben wurden über das Gel bei einer Stromstärke von 25 mA aufgetrennt.

Tabelle 2.10: Zusammensetzung eines 12 %igen SDS-Gels

| Substanz | Trenngel | Sammelgel |
|---------------------|--------------|-------------|
| Rotiphorese Gel 30 | 2.6 mL | 250 μ L |
| 1 M Tris/HCl pH 8.8 | 1.88 μ L | - |
| 1 M Tris/HCl pH 6.8 | - | 313 μ L |
| ddH ₂ O | 940 μ L | 1.88 mL |
| 10 % SDS | 50 μ L | 25 μ L |
| TEMED | 2.5 μ L | 2 μ L |
| 10 % APS | 50 μ L | 25 μ L |

Die Gele wurden nach der Gelelektrophorese mit Coomassie Blau R-250 für 2 min in der

Mikrowelle angefärbt und in mehreren Schritten mit Entfärberlösung für jeweils 2 min in der Mikrowelle entfärbt. Die Gele wurden unter einer UV-Lampe fotografiert und das Bild für die Dokumentation verwendet.

2.2.3 Kernresonanzspektroskopie

Die NMR-Experimente wurden an AVANCE 400, 600, 800 und 900 Bruker Spektrometern durchgeführt, die mit Z-Gradient-Cryoprobenköpfen ausgestattet waren. Alle Spektren wurden mit NMRPipe/NMRDraw (Delaglio et al., 1995), XWINNMR und TOPSPIN 2.0 (beides Bruker) prozessiert und mit Sparky 3 (T. D. Goddard und D. G. Kneller, 2006) und CARA (Keller, 2004) analysiert (Tab. 2.8).

2.2.3.1 Probenvorbereitung

Das Protein wurde in zwei Stufen gegen NMR-Messpuffer dialysiert (Kapitel 2.1.4), bevor es auf eine Endkonzentration von 1-2 mM gebracht wurde (Kapitel 2.2.2.7). 250 μ L der Proteinlösung wurden in ein Shigemi-Probenröhrchen gefüllt.

Für NOESY-Experimente wurde das Protein nach der Dialyse gegen NMR-Messpuffer lyophilisiert und in einer äquivalenten Menge D₂O wieder aufgenommen. Bei der Messung von Protein-Inhibitor-Komplexen wurde das Protein mit einfacher bis doppelter Inhibitor-Konzentration versetzt, welcher in 100 % DMSO als 50 mM Ausgangslösung vorlag. Für die Charakterisierung der Inhibitoren wurde NMR-Messpuffer lyophilisiert, in D₂O aufgenommen und 5 mM Inhibitorlösung bestehend aus 50 % D₂O-NMR-Messpuffer und 50 % DMSO hergestellt.

Zur Messung residueller dipolarer Kopplungen wurde [¹⁵N]-markiertes Protein in NMR-Messpuffer dialysiert und mit 20 mg/mL Bacteriophage *pseudomonas aeruginosa* Pf1 (Profos AG, Regensburg) versetzt (Hansen et al., 1998).

2.2.3.2 NMR-Experimente

Die Quadraturdetektion in den indirekten Dimensionen wurde mittels der States-TPPI-Methode erreicht (Marion et al., 1989). Für die Breitband-¹³C/¹⁵N-Entkopplung wurden in der Regel GARP-Sequenzen verwendet (Shaka & Keeler, 1987). Die ¹H-Breitbandentkopplung wurde durch die WALTZ-16-Sequenz erreicht (Shaka et al., 1983).

Die ^1H -chemischen Verschiebungen wurden auf externes DSS referenziert ($\delta_{DSS}=0.0$ ppm). Als Ausgangsspektren für die Zuordnung von freiem ebenso wie Inhibitor-gebundenem Protein wurde ein heteronukleares 2D-Einbindungs-Korrelationsexperiment (HSQC) für die (^1H , ^{15}N)-Korrelationen (Bodenhausen & Ruben, 1980; Grzesiek & Bax, 1993) aufgenommen. Die Parameter aller verwendeten NMR-Experimente sind in Tabelle 2.11 aufgelistet.

Tabelle 2.11: Akquisitions- und Prozessierungsparameter der verwendeten NMR-Experimente. sw1 bis sw3: aufgenommene spektrale Weite in der jeweiligen Dimension (Reihenfolge ^1H , ^{15}N , ^{13}C , bzw. ^1H , ^1H), t1 bis t3: aufgenommene komplexe Punkte in der jeweiligen Dimension (Reihenfolge ^1H , ^{15}N , ^{13}C , bzw. ^1H , ^1H), nt: Anzahl der Wiederholung der Experimente, mix: Mischzeit in NOESY-Experimenten in ms, $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$: Trägerfrequenz für den jeweiligen Kern.

| Experiment | sw1 [ppm] | t1 [Pkt] | sw2 [ppm] | t2 [Pkt] | sw3 [ppm] | t3 [Pkt] | nt | mix [ms] | ^{15}N [ppm] | ^{13}C [ppm] |
|---|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|------|-------------|--------------------------|--------------------------|
| Protein | | | | | | | | | | |
| 2D (^{15}N - ^1H)-TROSY-HSQC | 13.9 | 1024 | 33 | 256 | - | - | 56 | - | 117 | - |
| 2D (^{15}N - ^1H)-HSQC | 13.9 | 1024 | 33 | 220 | - | - | 240 | - | 117 | - |
| 2D (^{13}C - ^1H)-HSQC (aliphatisch) | 12.9 | 1024 | - | - | 60 | 256 | 320 | - | - | 40 |
| 2D (^{15}N - ^1H)-HN(CO) | 13.9 | 1024 | 31 | 58 | 24 | 1 | 1152 | - | 117 | 174 |
| 2D (^1H - ^1H)-NOESY (^{15}N gefiltert) | 11 | 1024 | 11 | 200 | - | - | 912 | 600 | 117 | 30 |
| 3D HNCA | 13.9 | 1024 | 32 | 60 | 28 | 96 | 32 | - | 116.5 | 53 |
| Kleinstmolekül | | | | | | | | | | |
| 2D (^{13}C - ^1H)-HSQC | 13 | 2048 | - | - | 70 | 128 | 288 | - | - | 145 |
| 2D (^{13}C - ^1H)-HMBC | 12 | 2048 | - | - | 70 | 128 | 288 | - | - | 150 |
| 2D (^1H - ^1H)-COSY | 12 | 2048 | 12 | 128 | - | - | 288 | - | - | - |

Bei Zugabe eines Inhibitors zu der Proteinlösung tritt das Phänomen des mittelschnellen chemischen Austauschs (*intermediate exchange*) in verschiedenen Bereichen der Proteinbindetasche auf, der auf der μs - bis ms -Zeitskala stattfindet.

Beim chemischen Austausch werden zwei Kerne mit unterschiedlicher Resonanzfrequenz, bei Proteinen das Amidwasserstoffatom der Peptidbindung des Proteinrückgrats und ein Wasserstoffatom des Lösungsmittels, gegeneinander ausgetauscht (Bindungsbruch) oder ineinander überführt (Konformationsänderung). Von chemischem Austausch spricht man aber auch, wenn zwei Moleküle miteinander in Wechselwirkung treten, wie z.B. ein Protein mit seinem Liganden. Die Änderung der chemischen Umgebung eines Kerns besteht dann im Übergang der freien Form in die Ligand-gebundene Form des Proteins. In Abhängigkeit der Frequenz bewirkt der chemische Austausch die Veränderung des Erscheinungsbildes (Aufspaltung und Lage) von Resonanzen im Spektrum. Selbst die Auslöschung eines Signals ist möglich.

Beim langsamen Austausch (*slow exchange*) relativ zur NMR-Zeitskala sind zwei getrennte Signale für die beiden Zustände eines Kerns (frei und gebunden) detektierbar. Das ist der Fall, wenn ein Ligand eine hohe Bindungsaffinität zu einem Protein besitzt. Diese hohe Bindungsaffinität resultiert in einer langsamen Austauschrate zwischen freiem und Ligand gebundenem Zustand des Proteins relativ zur Änderung der chemischen Verschiebung zwischen den beobachteten Resonanzfrequenzen der beiden Zustände. Die Austauschrate k ist also wesentlich kleiner als die Differenz der Resonanzfrequenzen ($\delta\Omega$), so dass folgende Gleichung gilt:

$$k \ll \frac{\delta\Omega}{\sqrt{8}} \quad (2.1)$$

Kommt es während der Zeit, die zum Erreichen der Phasendifferenz zweier Resonanzfrequenzen benötigt wird, zu häufigem chemischem Austausch, so mitteln sich die beiden Frequenzen zu einer Durchschnittsfrequenz. Die Austauschrate ist hier wesentlich größer als die Differenz der Resonanzfrequenzen und man spricht von schnellem Austausch (*fast exchange*). Im Spektrum erscheint nur ein Signal, denn die Austauschrate k ist viel größer als die Differenz der Resonanzfrequenzen ($\delta\Omega$), was durch folgende Gleichung ausgedrückt wird:

$$k \gg \frac{\delta\Omega}{\sqrt{8}} \quad (2.2)$$

Dazwischen liegt der mittelschnelle Austausch (*intermediate exchange*), bei dem die Austauschrate ungefähr der Differenz der Resonanzfrequenzen entspricht, so dass es zu einem Übergang zweier getrennter Signale des langsamen zu einem Signal des schnellen Austauschs kommt und das daraus resultierende Signal breit, undefiniert und in den meisten Fällen nicht mehr detektierbar ist (Cavanagh et al., 2007). Die Austauschrate k ist also in diesem Fall genauso groß wie die Differenz der Resonanzfrequenzen ($\delta\Omega$):

$$k = \frac{\delta\Omega}{\sqrt{8}} \quad (2.3)$$

2.2.3.3 Residuale Dipolare Kopplungen (RDCs)

Dipolare Kopplungskonstanten enthalten wichtige Strukturinformationen, die sich jedoch normalerweise in Lösung als Resultat der isotropen Rotationsdiffusion zu Null mitteln (Tjandra & Bax, 1997). Die beobachtete Kopplung zwischen zwei Kernen P und Q wird durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$D_{AB}(\theta, \phi) = \frac{S \frac{\mu_0}{4\pi} \gamma_A \gamma_B h [A_a(3\cos^2\theta - 1) + \frac{3}{2}A_r \sin^2\theta \cos 2\phi]}{4\pi^2 r_{AB}^3} \quad (2.4)$$

mit A als *alignment tensor*, A_a als axiale symmetrische Komponente sowie A_r als rhombische Komponente. D_{PQ} ist die residuale dipolare Kopplung zwischen den Kernen P und Q, S der generalisierte Ordnungsparameter für die interne Bewegung des PQ-Vektors, μ_0 die magnetische Permeabilität gegeben durch $\mu_0/4\pi = B_0^2/15kT$, k die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur, γ_{PQ} das gyromagnetische Verhältnis von P und Q, h die Plancksche Konstante, r_{PQ} der Abstand zwischen P und Q und ϕ und θ sind zylindrische Koordinaten, die die PQ-Vektororientierung in Hauptachsensystem von A beschreiben.

Man versetzt die Proteinprobe mit Phage Pf1, die zu einer geringfügigen Vorzugsorientierung der Proteine relativ zum homogenen Magnetfeld führt, wodurch RDCs gemessen werden können. Diese liefern orientierungseinschränkende Parameter, die Informationen über die räumliche Orientierung weit auseinander liegender Bereiche des Moleküls zueinander beinhalten. Residuale dipolare $D_{N^H N}$ -Kopplungen wurden bei 800 MHz

Protonenfrequenz durch Subtraktion der skalaren ^1J -Kopplungen aus J-modulierten ($^{15}\text{N}, ^1\text{H}$)-HSQC-Experimenten in Gegenwart von Pf1-Phagen und der jeweiligen skalaren ^1J -Kopplungen aus Referenzexperimenten ohne Pf1-Phagen ermittelt (Tjandra et al., 1997). Die Methode der IPAP-Messungen (*in phase-anti phase*) konnte nicht angewendet werden, da ($^{15}\text{N}, ^1\text{H}$)-HSQC-Spektren nur mit mäßiger Qualität aufgenommen werden konnten. Stattdessen wurden ($^{15}\text{N}, ^1\text{H}$)-TROSY-HSQC- und ($^{15}\text{N}, ^1\text{H}$)-HSQC-Experimente direkt nacheinander aufgenommen, wobei die Dauer der Aufnahme des ($^{15}\text{N}, ^1\text{H}$)-TROSY-HSQC-Spektrums nur ein viertel der des ($^{15}\text{N}, ^1\text{H}$)-HSQC-Spektrums betrug. Die Größe der D_{NHN} -Kopplungen ist abhängig von der Orientierung des entsprechenden NH-Vektors relativ zum äußeren Magnetfeld. Somit enthalten die relativen Größen der Kopplungen Informationen über die relative Orientierung der Vektoren zueinander. Mit Hilfe von Kristallstrukturen können theoretische RDC-Werte unter Verwendung der SVD-Näherung (*singular value decomposition*) im Programm PALES zurückgerechnet und durch entsprechende Optimierung des *Alignment-Tensors* an die experimentellen RDC-Werte angepasst werden (Zweckstetter & Bax, 2000). Der Pearson-Korrelationskoeffizient (R) und der Qualitätsfaktor oder Q-Faktor (Q) sind Angaben der Übereinstimmung zwischen den theoretischen und beobachteten (gemessenen) RDCs (Cornilescu et al., 1998). Der Q-Faktor wird bestimmt als:

$$Q = \frac{\text{rms}(^1D_{\text{HN}}^{\text{gemessen}} - ^1D_{\text{HN}}^{\text{berechnet}})}{\text{rms}(^1D_{\text{HN}}^{\text{gemessen}})} \quad (2.5)$$

2.2.3.4 NOE-Spektroskopie

Zur Bestimmung der NOE (*Nuclear Overhauser Effect*)-Interaktionen zwischen ^1H -Spins, aus denen die Distanzeinschränkungen für ein anschließendes *Docking* gewonnen wurden, wurde ein 2D (^{15}N)-gefiltertes- ($^1\text{H}, ^1\text{H}$)-NOESY-Spektrum aufgenommen (Ikura & Bax, 1992). Dieses Experiment besitzt eine Pulssequenz-Periode, in der die Magnetisierung der Protonen, die kovalent an ein [^{15}N]-markiertes Stickstoffatom gebunden sind, unterdrückt werden. Für die Proteinproben ebenso wie für die Komplexproben wurden zunächst eindimensionale Protonenspektren aufgenommen, die Unterdrückung des Wassersignals erfolgte durch die WATERGATE-Technik (Piotto et al., 1992).

Um auf NOE-Korrelationen basierte Dockingstudien durchführen zu können, müssen diese in den NOE-Spektren identifiziert und zugeordnet werden. Nach der Zuordnung erfolgt

die Kalibrierung der (^1H - ^1H)-NOE-Korrelationen mittels einer Peak-Integrationsroutine zu distanzeinschränkenden Strukturparametern, die einen maximalen räumlichen Abstand zwischen den NOE-korrelierten Protonen beschreiben (obere Distanzeinschränkung; Güntert et al., 1991). Mit diesem Verfahren wurden die Distanzeinschränkungen aus dem 2D (^{15}N)-gefilterten-(^1H , ^1H)-NOESY-Spektrum erhalten. Für die chemische Verschiebung in den Protonendimensionen wurde eine Toleranz von 0.03 ppm für chemische Verschiebungen in der Heterokerndimension eine Toleranz von 0.4 ppm zugesprochen. Die Resonanzen im Spektrum wurden manuell zugeordnet. Dazu wurden die NOEs nach ihrer Intensität in drei Klassen unterteilt und die oberen Distanzeinschränkungen dementsprechend für die Dockingstudien zugeordnet (Ohlenschläger et al., 1998):

| NOE-Stärke | Obere Distanzeinschränkung | Obere Distanzeinschränkung |
|------------|------------------------------------|----------------------------|
| | Methin- & Methylengruppen-Protonen | Methylgruppen-Protonen |
| stark | 2.7 Å | 3.2 Å |
| mittel | 3.8 Å | 4.3 Å |
| schwach | 5.5 Å | 6.0 Å |

Die Intensitätsreferenzierung der intermolekularen NOE-Korrelationen erfolgte über die intramolekularen NOE-Signale der Inhibitoren im Komplex mit dem Protein. Bei NOE-Korrelationen, die von Methylgruppen ausgehen, wurden um jeweils 0.5 Å größere Werte für die oberen Distanzeinschränkungen verwendet (Clare et al., 1987).

Die Berechnung der oberen Distanzeinschränkungen wurde mit folgender Gleichung bestimmt:

$$r = \left(\frac{V}{C}\right)^{\frac{1}{6}} + 0.5\text{Å} \quad (2.6)$$

mit V als Volumen und C der Kalibrationskonstante erhalten aus dem Vergleich mit den festen Abständen im Inhibitor.

2.2.4 Docking Experimente

Das Programm HADDOCK (*High Ambiguity Driven Biomolecular Docking*; Dominguez et al., 2003) macht Gebrauch von biochemischen oder biophysikalischen Daten, wie z.B. Änderungen chemischer Verschiebungen aus NMR-Experimenten. Bindet ein Inhibitor an

ein Protein ändern sich die chemischen Verschiebungen der Aminosäuren, die von der Bindung beeinflusst werden. Diese interagierenden Reste des Proteins werden als *ambiguous interaction restraints*, (AIRs) für die Docking-Berechnungen eingeführt. Es werden *aktive* und *passive* Reste definiert, wobei die aktiven Reste von der Bindung des Inhibitors am meisten beeinflusst werden und die passiven Reste den aktiven benachbart liegen und nur wenig Änderungen der chemischen Verschiebung zeigen. Ein AIR ist definiert als nicht eindeutiger intermolekularer Abstand (d_{iAB}) mit einem maximalen Wert von 3 \AA zwischen einem Atom m eines aktiven Restes i des Proteins A (m_{iA}) und einem Atom n eines aktiven oder passiven Restes k (N_{res} gesamt) im Inhibitor B (n_{kB}) und umgekehrt. Der effektive Abstand d_{iAB}^{eff} wird dann berechnet durch:

$$d_{iAB}^{eff} = \left(\sum_{m_{iA}=1}^{N_{atoms}} \sum_{k=1}^{N_{res}B} \sum_{n_{kB}=1}^{N_{atoms}} \frac{1}{d_{m_{iA}n_{kB}}^6} \right)^{(-1/6)} \quad (2.7)$$

wobei N_{atoms} alle Atome eines Restes sind und N_{res} die Summe der aktiven und passiven Reste des Proteins. Auf diese Art haben die passiven Reste keine direkten AIRs zum Liganden, genügen aber den aktiven Resten als Einschränkungen. Mit $1/r^6$ wird das Lennard-Jones Potential in die Rechnung involviert, so dass sichergestellt wird, dass die AIRs ausreichend sind und die Beschränkungen für den Kontakt zweier Atome nicht verletzt werden. Das Docking-Protokoll für die Strukturberechnung wird in CNS (*crystallography and NMR systems*, Brunger et al., 1998) durchgeführt und verwendet die Python-Skripte aus ARIA (*ambiguous restraints for iterative assignment*; Linge et al., 2001) zur Automatisierung. Das Docking-Protokoll, das eine pdb-Datei des freien Proteins und die Definition der AIRs verlangt, setzt sich aus drei Schritten zusammen:

1. Zufallsordnung der Orientierungen und die *Rigid Body*-Energieminimierung,
2. Halb-rigides simuliertes *annealing* im Torsionswinkelkoordinatensystem,
3. Letzte Verfeinerung im kartesischen Koordinatensystem mit zusätzlichem Lösungsmittel.

Auch wenn sich im letzten Schritt keine sichtbaren Strukturänderungen vollziehen, so ist er doch unerlässlich für die Energieminimierung der intermolekularen Kontakte. Die Endstrukturen werden als *Cluster* eines paarweisen Rückgrat-rmsd (*root mean square deviation*) an den Protein-Inhibitor-Kontaktstellen ausgegeben und anhand ihrer durchschnittlichen Interaktionsenergien und vergrabener Oberfläche analysiert.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Herstellung des Proteins p38 α MAP-Kinase

3.1.1 Klonierung und Transformation von p38 α

Um für die Strukturbestimmung eines Proteins oder eines Protein-Inhibitor-Komplexes mittels NMR-Spektroskopie ausreichende Mengen eines rekombinanten Proteins zu erhalten, ist ein gutes Expressionssystem von Vorteil. Die für p38 α kodierende DNA befand sich anfangs in einem pET15b-Vektor. Am 5'-Ende der DNA befindet sich die für einen His₆-Tag mit Thrombin-Schnittstelle kodierende DNA. Die von Prof. T. Stehle zur Verfügung gestellte Plasmid-DNA pET15b-p38 α wurde für eine Klonierung der für p38 α kodierenden DNA in den Vektor pET16b-TEV verwendet, um eine TEV-Protease-Schnittstelle mit His₇-Tag zu erhalten und somit die Effizienz der Reinigung zu erhöhen und Kosten zu sparen.

Um den Restriktionsverdau für die Klonierung mit den Verdauungsenzymen *Bam*HI und *Nde*I durchführen zu können, musste eine zusätzlich vorhandene *Nde*I-Schnittstelle, die innerhalb der für p38 α kodierenden DNA lag, durch eine Mutagenese entfernt werden (Kapitel 2.1.2). Die stille Mutation erfolgte bei der für die Aminosäure His 77 kodierenden DNA, in dem die Base T des Basentriplets CAT durch die Base C ersetzt wurde.

Die Primer für die Mutagenese sind in 2.3 aufgeführt. Das neue Plasmid wurde in XL2-Blue-Zellen transformiert (Kapitel 2.2.1.9) und die DNA aus einer Übernachtkultur extrahiert, aufgereinigt (Kapitel 2.2.1.2) und sequenziert (Kapitel 2.2.1.6), um die Richtigkeit der Mutagenese zu kontrollieren.

Zur Klonierung der für $p38\alpha$ kodierenden DNA aus dem pET15b-Vektor in den pET16b-TEV-Vektor wurde die DNA durch PCR amplifiziert. Die Primer für die PCR sind in Tabelle 2.3 aufgeführt. Das Amplifikat enthielt eine Schnittstelle für *NdeI* in 3'-Richtung und für *BamHI* in 5'-Richtung von der für $p38\alpha$ kodierenden Sequenz aus gesehen und wurde über Agarosegelelektrophorese von der Plasmid-DNA getrennt (Kapitel 2.2.1.1). In Abb. 3.1 ist das Agarosegel nach Auftrennung des Amplifikats vom Plasmid dargestellt. Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (Kapitel 2.2.1.2).

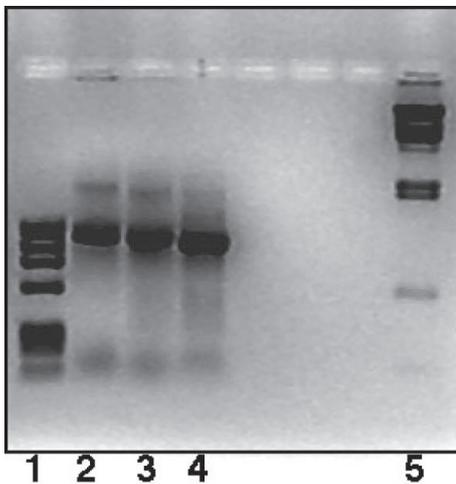


Abbildung 3.1: Agarosegel nach der PCR. Drei PCR-Ansätze lieferten drei positive Ergebnisse (Probe 2 - 4, 1 und 5 sind Marker). Die gewünschten Amplifikate wurden aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt.

Nach der Reinigung der DNA wurde das Amplifikat ebenso wie der Vektor pET16b-TEV mit den Enzymen *BamHI* und *NdeI* nacheinander verdaut (Kapitel 2.2.1.4). Nach der Dephosphorylierung des Vektors mit alkalischer Phosphatase (CIAP; Kapitel 2.2.1.4) erfolgte die Ligation der DNA-Fragmente mit dem Vektor sowie die Transformation in kompetente XL2-Blue-Zellen (Kapitel 2.2.1.9). Die Richtigkeit der Ligation wurde überprüft, indem mehrere Transformanden mittels Kolonie-PCR untersucht wurden. Bei positivem Ergebnis der PCR wurde die Plasmid-DNA aus einer 100 mL LB-Medium-Übernachtskultur aufgereinigt (Kapitel 2.2.1.2) und sequenziert (Kapitel 2.2.1.6). Anschließend wurde eine Transformation in den gewünschten *E.coli*-Expressionsstamm durchgeführt (Kapitel 2.2.1.9).

3.1.2 Expression und Reinigung von p38 α aus *E. coli*

3.1.2.1 Expression von p38 α

Eine erste Expression des Proteins nach Transformation in den Expressionsstamm BL21(DE3) in LB-Medium mit [^{15}N]- NH_4Cl sowie eine erste Aufreinigung nach Bukhtiyarova et al. (2004) lieferte eine gute Ausbeute von 23 mg [^{15}N]-markiertem Protein pro Liter Expressionskultur. Bei dieser Aufreinigung folgt die Anionenaustauschersäule MonoQ 10/10 direkt auf die Ni-NTA-Affinitätssäule ohne Abspaltung des His $_7$ -Tags. Anschließend wurde das Protein gegen NMR-Messpuffer dialysiert, auf 0.5 mM konzentriert und ein erstes (^{15}N - ^1H)-TROSY-HSQC-Übersichtsspektrum aufgenommen (Vogtherr et al., 2006).

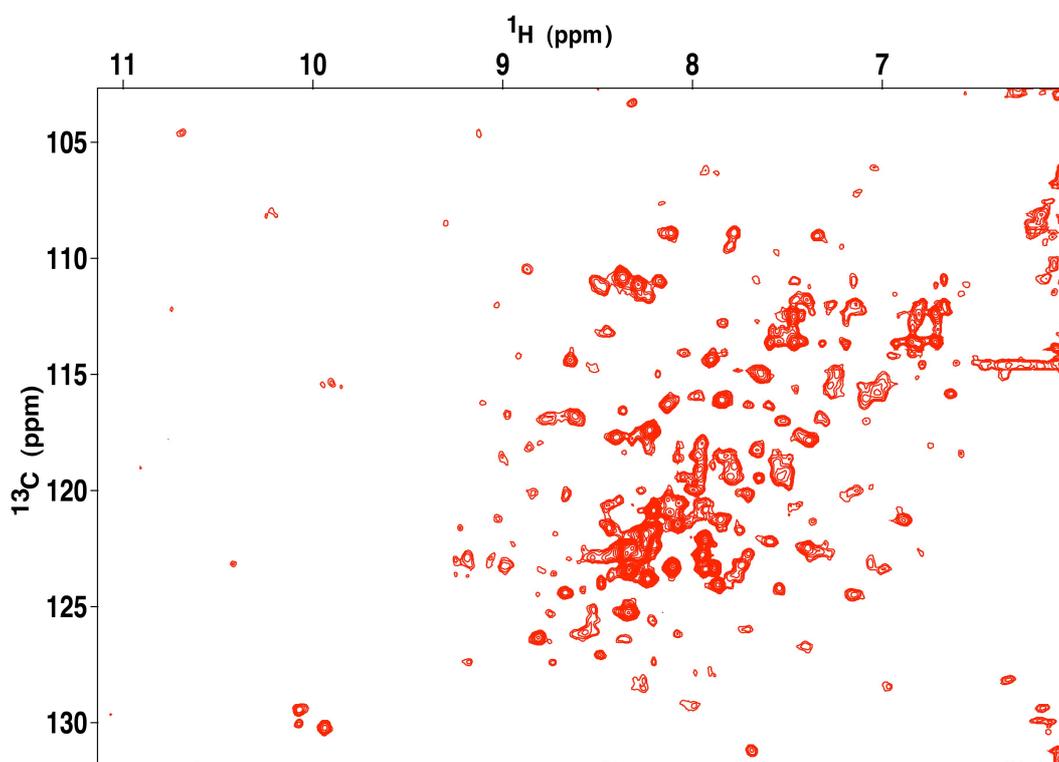


Abbildung 3.2: (^{15}N - ^1H)-TROSY-HSQC-Spektrum von protoniertem, [^{15}N]-markiertem p38 α mit His $_7$ -Tag, aufgenommen an einem 700 MHz-Spektrometer (Konzentration der Probe 0.9 mM).

Dieses Spektrum (Abb. 3.2) zeigte weniger als die Hälfte der zu erwartenden Resonanzen, da das Protein in wässrigem LB-Medium exprimiert wurde und somit vollständig protoniert vorlag. Zudem kann auch ein His-Tag die Qualität eines Spektrums beeinflussen, da diese

Region bestehend aus bis zu zwanzig Aminosäuren durch ihre Unstrukturiertheit und freie Beweglichkeit angrenzende Regionen im Protein ebenfalls zu veränderter Mobilität anregen kann, was zu Linienverbreiterung und somit zu schlechtem Signal-zu-Rauschen-Verhältnis im Spektrum führen kann.

Die Qualität von Proteinspektren kann durch Deuterierung entscheidend verbessert werden (Gardner & Kay, 1998). Durch das signifikant kleinere gyromagnetische Verhältnis von ^2H zu ^1H ($\gamma[^2\text{H}]/\gamma[^1\text{H}] = 0.15$) wird beim Austausch der Protonen gegen Deuteronen der Beitrag zur Linienverbreiterung aufgrund von ^1H - ^1H -dipolarer Relaxation und skalaren Kopplungen der C_α - und Seitenkettenprotonen entfernt (Arrowsmith & Wu, 1998). Bei der Aufnahme von (^1H - ^1H)-NOESY-Spektren resultiert eine Deuterierung des Proteins ebenfalls in erhöhter Sensitivität aufgrund der geringeren Linienbreite (Kapitel 3.5). Zusätzlich erfolgt eine Verminderung der Spin-Diffusionsrate mit gleichzeitigem Anstieg selektiver T_1 -Werte der diagonalen Resonanzen. Dadurch lassen sich längere Mischzeiten verwenden und durch die reduzierten Spin-Diffusionsraten können internukleare Distanzen wesentlich genauer aus NOE-Signalintensitäten bestimmt werden.

Die Expression aller folgenden p38 α -Proteinproben für NMR-Messungen erfolgte deshalb in vollständig perdeutertem M9-Minimalmedium. Um eine selektive Markierung einer Aminosäure zu erhalten, wurden 100 mg einer [$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$]-markierten, protonierten Aminosäure zur letzten Vorkultur vor der Expressionskultur gegeben (Kapitel 2.2.2.1). Da die Gefahr der Verstoffwechslung einer zum Medium zugesetzten Aminosäure allerdings groß ist, wurde der Stamm DL31(DE3) verwendet, da dieser eine Transaminasedefizienz aufweist und garantiert, dass Aminosäuren wie Leucin, Isoleucin, Valin, Aspartat, Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan selektiv markiert werden können ohne verstoffwechselt zu werden (Kapitel 2.2.2.1; LeMaster & Richards, 1988). Zur Herstellung selektiv markierter NMR-Proben mit anderen Aminosäuren konnte der Expressionsstamm BL21(DE3) verwendet werden (Kapitel 2.2.1.9). Für NOESY-Experimente sollte bei vollständiger Deuterierung des Proteins mit D_8 -Glycerin nur die selektiv markierte Aminosäure Seitenkettenprotoniert auftreten. Für dieses Markierungsschema wurde ebenfalls der Expressionsstamm BL21(DE3) verwendet und 100 mg der markierten Aminosäure eine Stunde vor Induktion direkt zur Expressionskultur gegeben (Kapitel 2.2.2.1; Hajduk et al., 2004).

Die Expression der p38 α MAP-Kinase erfolgte in M9-Minimalmedium, dem je nach Markierungsschema [^{13}C]-Glucose bzw. [D_8]-Glycerin, [^{15}N]-Ammoniumchlorid oder einzelne markierte Aminosäuren zugesetzt wurden (Kapitel 2.2.2.1). Die *E.coli*-Zellen

wurden in drei Schritten auf D₂O adaptiert, um einen höchstmöglichen Deuterierungslevel und eine gute Ausbeute des Proteins zu erreichen (Kapitel 2.2.2.1). Dazu wurde eine erste 2 mL Übernachtskultur in M9 Minimalmedium mit 33% D₂O angesetzt. Diese wurde am nächsten Tag abzentrifugiert und die Zellen in einer 5 mL Tageskultur mit 55% D₂O resuspendiert. Die Zellen wurden schließlich nach Zentrifugation in eine letzte vollständig perdeuterierte 40 mL Übernachtskultur überführt, bevor diese in 1 L perdeutertes M9-Minimalmedium gegeben wurde.

Die Expressionskultur wurde bei 37°C auf eine OD₆₀₀ von 0.4 angezogen, was bei Verwendung des Expressionsvektors BL21(DE3) ungefähr 4 h und bei Verwendung des auxotrophen Stammes DL31(DE3) circa 1.5 h dauerte, da bei diesem Stamm selektiv markierte und unmarkierte Aminosäuren einzeln zugesetzt wurden, was zu einem gesteigerten Zellwachstum führte. Anschließend wurde die Inkubatortemperatur auf 25°C gesenkt und erst nach Erreichen der Zieltemperatur (ca. 30 min) wurden die Expressionskulturen mit 1 mM IPTG induziert (OD₆₀₀ ≈ 0.48). Nach 9 - 13 h wurde die Expression mit einer OD₆₀₀ von etwa 1.1 beendet. Die Kulturen wurden abzentrifugiert (Kapitel 2.2.2.1) und die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.1.2.2 Optimierte Reinigung von p38 α

Zur Reinigung des Proteins wurde ein nach Bukhtiyarova et al. (2004) optimiertes Protokoll verwendet. Die Zellpellets wurden in Lysispuffer resuspendiert, mittels *French Press*-Verfahren aufgeschlossen und der zellfreie Rohextrakt anschließend durch Zentrifugation von Zellresten und unlöslichen Bestandteilen getrennt (Kapitel 2.2.2.2).

Der Überstand der Zentrifugation wurde 1 h mit Ni-NTA-Agarose inkubiert, so dass der größtmögliche Anteil des sich in Lösung befindlichen p38 α durch den His₇-Tag an der Agarose gebunden wurde. Nach Auftrag des Harzes auf die Säule und Waschen mit 5 Säulenvolumina Waschpuffer, wurde das Protein mit einem stufenweisen Imidazolgradienten eluiert (Kapitel 2.2.2.3).

Ein SDS-PAGE-Gel der Elution des Proteins von der Ni-NTA-Agarose ist in Abb. 3.3 dargestellt. Von den Elutionsfraktionen 4 -15 wurden die Fraktionen 5 - 15 vereinigt und gegen TEV-Spaltpuffer dialysiert, um ideale Pufferbedingungen für die Abspaltung des His₇-Tags zu erreichen.

Nach der Abspaltung des His₇-Tags (Kapitel 2.2.2.4) mittels TEV-Protease wurde dieser ebenso wie die TEV-Protease durch eine weitere Reinigung über eine Ni-NTA-

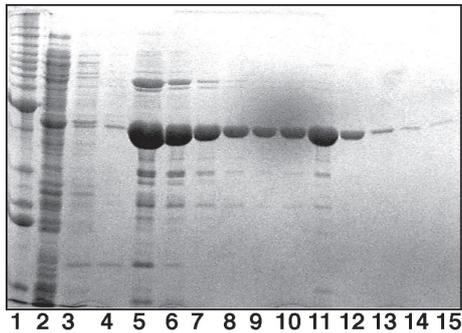


Abbildung 3.3: SDS-PAGE-Gel der Elution von p38 α von der Ni-NTA-Affinitätssäule. Nach dem Marker (1) folgt eine Probe des Durchflusses (2), des Waschschrittes (3) und schließlich die Elutionsfraktionen 4 - 15. Diese wurden vereinigt und gegen den TEV-Spaltpuffer dialysiert.

Agarose-Säule vom Protein abtrennt, bevor die Proteinlösung für die Anionenaustauschchromatographie über Nacht dialysiert wurde (Kapitel 2.2.2.5). Durch die Vergrößerung des Volumens aufgrund der Dialysen wurde ein 50 mL Superloop zum Auftragen der Proteinlösung auf die MonoQ-(10/10)-Säule verwendet. p38 α bindet aufgrund seines leicht im sauren Bereich liegenden isoelektrischen Punktes ($pI = 5.48$) an einen Anionenaustauscher und wurde mit einem Salzgradienten von 50 mM bis 1 M NaCl bei ca. 350 mM eluiert (Kapitel 2.2.2.5).

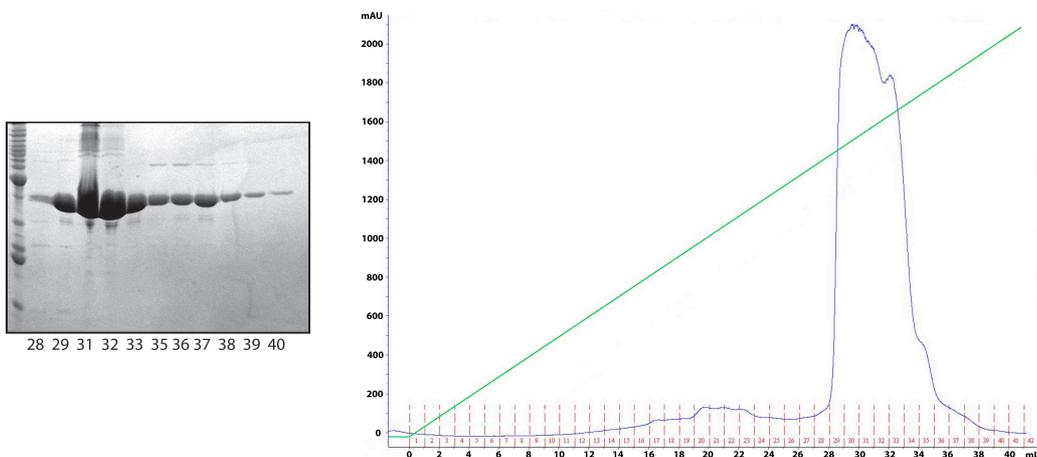


Abbildung 3.4: SDS-PAGE-Gel und Chromatogramm eines Anionenaustauschsäulenlaufes. Links sind auf dem SDS-PAGE-Gel nach dem Marker zuerst die Fraktionen 28, 29, dann 31 - 33 sowie anschließend die Fraktionen 35 - 40 aufgetragen. Rechts zeigt das Chromatogramm die Elution von p38 α von der Anionenaustauschersäule. Die Fraktionen 28 - 32 wurden vereinigt und weiter aufgereinigt.

Im Chromatogramm des Anionenaustauscher-Säulenlaufs (Abb. 3.4) erkennt man, dass unter dem Hauptsignal weitere Banden liegen, was auf unterschiedliche Phosphorylierungszustände des Proteins hindeutet. Der unphosphorylierte Zustand des Proteins ist dabei der dominante, so dass die Fraktionen 28 - 32 vereinigt wurden. Die Phosphorylierung wird bei einer Expression bei 25°C zwar reduziert aber nicht vollständig unterdrückt (Diskin et al., 2007). Um den Phosphorylierungslevel weiter zu senken wurde das p38 α -pET16b-TEV-Konstrukt mit einem für eine Phosphatase kodierenden Plasmid-Konstrukt, yeYOPH-pCDF-Duet, in den BL21(DE3)-Expressionsstamm kotransformiert, bevor die beiden Proteine in *E. coli* koexprimiert wurden. Das Aufreinigungsprotokoll wurde dadurch nicht verändert, da die Phosphatase einen im Basischen liegenden isoelektrischen Punkt aufweist und somit nicht an eine Anionenaustauschersäule bindet (Neumayer et al., 2004).

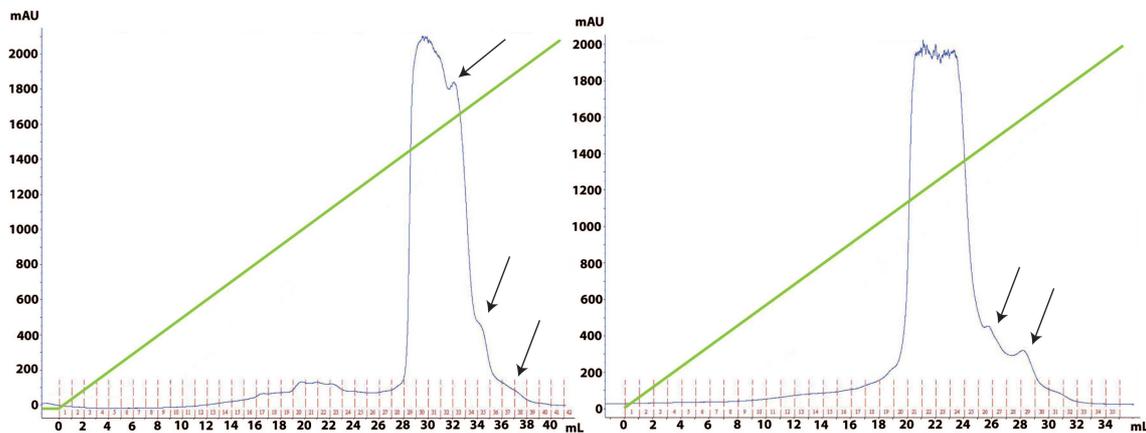


Abbildung 3.5: Links zeigt das Chromatogramm der Aufreinigung der selektiv [^{13}C , ^{15}N]-Leucin markierten, deuterierten [^{15}N]-p38 α Probe über die Anionenaustauschersäule Mono Q 10/10, rechts das Chromatogramm der Aufreinigung einer [^{13}C , ^{15}N]-Tyrosin markierten, deuterierten [^{15}N]-p38 α Probe nach der Koexpression des Proteins mit der Phosphatase YopH. Die Pfeile markieren Unterschiede in der Phosphorylierung des Proteins.

In Abbildung 3.5 sind Chromatogramme der Proteinreinigung über die Anionenaustauschersäule MonoQ 10/10 dargestellt. Links ist das Chromatogramm einer p38 α -Reinigung ohne die Koexpression der Phosphatase YopH gezeigt (auch Abb. 3.4). Es sind im Hauptelutionspeak drei Schultern zu sehen (markiert durch Pfeile), die auf unterschiedliche Phosphorylierungszustände des Proteins hindeuten. Rechts ist das Chromatogramm einer p38 α -Reinigung nach Koexpression mit der Phosphatase YopH gezeigt, auf dem der Elutionspeak nur noch zwei Schultern am Ende der Elution aufweist.

Die Homogenität des unphosphorylierten Proteins wird also erhöht, wenn die Phosphatase während der Expression anwesend ist.

Auf die Anionenaustauschersäule folgte als letzter Reinigungsschritt eine Größenausschlusschromatographie-Säule (Kapitel 2.2.2.6). Dazu wurde die Proteinlösung nach der Dialyse auf 1 - 2 mL aufkonzentriert, um ein möglichst geringes Volumen auf die Größenausschlusschromatographie-Säule aufzutragen.

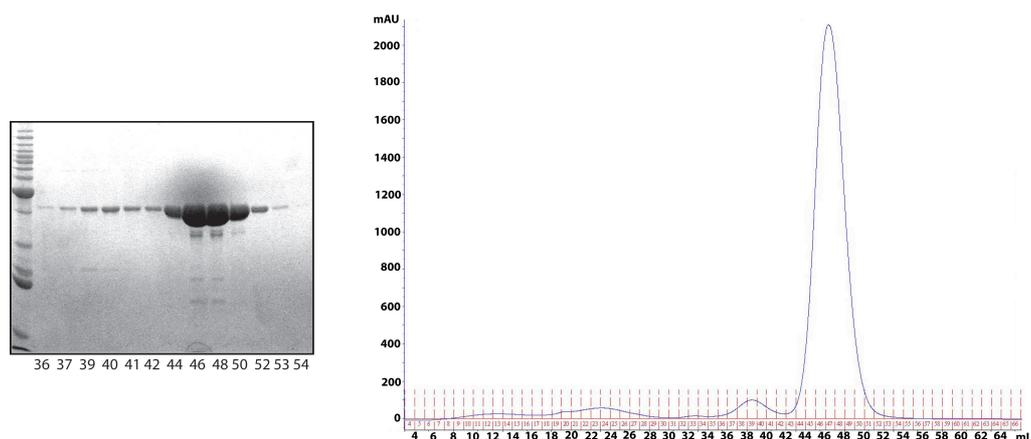


Abbildung 3.6: Das Chromatogramm zeigt den letzten Aufreinigungsschritt von p38 α über eine Superdex200-(16/60)-Größenausschlusschromatographie-Säule. Links ist das SDS-PAGE-Gel mit den Fraktionen des Säulenlaufes, rechts das Chromatogramm zu sehen. Auf dem Gel sind die Fraktionen 36, 37, 39 - 42 und 44, 46, 48, 50, 52 - 54 aufgetragen. Der Fraktionssammler wurde nach einem Pufferdurchlauf von 30 mL nach Auftrag des Proteins gestartet.

Das Chromatogramm mit dem zugehörigen SDS-PAGE-Gel des letzten Schrittes der Aufreinigung durch eine Superdex200-(16/60)-Größenausschlusschromatographie-Säule ist in Abb. 3.6 gezeigt. Die Fraktionen des Hauptpeaks wurden vereinigt und gegen NMR-Messpuffer dialysiert (Kapitel 2.1.4). Die Proteinprobe wurde auf 0.4 - 1.5 mM aufkonzentriert und bei 4°C aufbewahrt.

Mit diesem Reinigungsverfahren konnte eine Reinheit ≥ 98 % sowie eine Endproteinmenge von 25 mg/L Expressionskultur erreicht werden (Kapitel 2.2.2.6).

Nach Expression des Proteins in perdeutertem M9-Minimalmedium und Aufreinigung sowie Spaltung des His₇-Tags mit TEV-Protease wurde ein weiteres (¹⁵N-¹H)-TROSY-HSQC-Spektrum aufgenommen (Abb. 3.7).

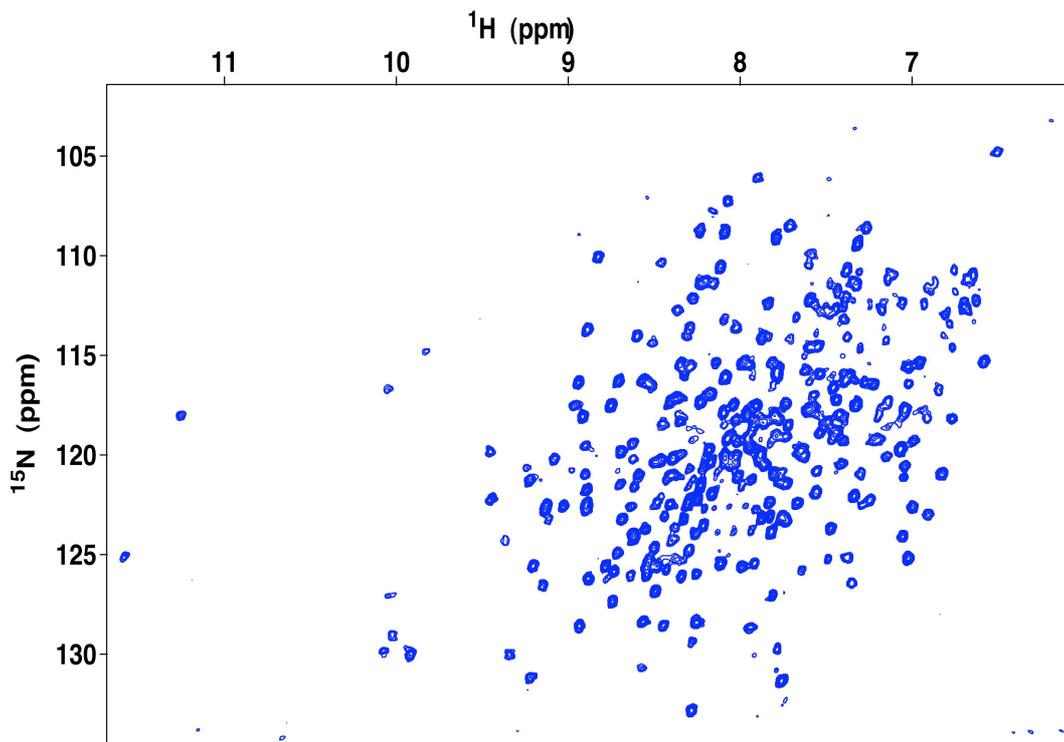


Abbildung 3.7: (^{15}N - ^1H)-TROSY-HSQC-Spektrum von perdeutertem, [^{15}N]-markiertem p38 α ohne His₇-Tag, aufgenommen an einem 800 MHz-Spektrometer (Konzentration der Probe 1.2 mM).

In Abb. 3.7 ist eine größere Zahl an Signalen mit stärkeren Intensitäten im Spektrum zu sehen. Eine zusätzliche Verbesserung der Spektrenqualität durch z.B. Temperaturänderung oder Änderung der Salzkonzentration konnte nicht erreicht werden.

3.2 Sequenzspezifische Resonanzzuordnung

Die sequenzspezifische Resonanzzuordnung ist der erste Schritt in der Strukturaufklärung eines Proteins mittels NMR. Für die NMR-Experimente wurden Proben mit einer Konzentration von 0.4 - 1.5 mM p38 α verwendet (Kapitel 2.2.2.7) und für die Untersuchung der p38 α -Inhibitor-Komplexe wurden Inhibitor und Protein im Verhältnis 2 : 1 eingesetzt, wobei zuvor eine 50 mM Inhibitor-Stammlösung in DMSO bereitet wurde. Die 2D- und 3D-NMR-Experimente wurden an 800 und 900 MHz Spektrometern durchgeführt, nur die Aufnahme der HN(CO)-Spektren erfolgte an einem 600 MHz-Spektrometer. Alle Spektrometer enthielten einen Cryo-Probenkopf.

Zur Prozessierung der NMR-Spektren wurden die Programme TOPSPIN2.0 (Bruker, 2007) oder NMRPipe (Version 2.3; Delaglio et al., 1995) verwendet, die Programme CARA (Version 1.3.1; Keller, 2004) und Sparky (T. D. Goddard und D. G. Kneller, University of California, San Francisco, 2006) wurden für die Visualisierung und Analyse der NMR-Spektren genutzt.

3.2.1 Experimente zur Zuordnung der Proteinrückgrat-Resonanzen der unkomplexierten und Inhibitor-gebundenen p38 α MAP-Kinase

Die (^{15}N - ^1H)-Einbindungskorrelations-(HSQC)-Spektren von p38 α in unkomplexiertem und Inhibitor-gebundenem Zustand zeigen sowohl für Amidprotonen als auch für den Heterokern ^{15}N eine ausreichende Dispersion für die Zuordnung eines Großteils der Resonanzen mittels zwei- und dreidimensionaler NMR-Spektroskopie. Die große Dispersion ist außerdem ein Indiz dafür, dass p38 α im gefalteten Zustand vorliegt, also eine Tertiärstruktur aufweist (Vogtherr et al., 2006). Die Proben waren über ein bis zwei Monate stabil und zeigten keine Veränderungen (Signalverschiebungen aufgrund von Proteolyse) in regelmäßig aufgenommenen HSQC-Spektren. Kleinere Proteinmengen präzipitierten zwar im Laufe der Zeit, was jedoch keinen negativen Einfluss auf die NMR-Experimente hatte. Ausgehend von der Aminosäuresequenz von p38 α (Abb. 1.11) sind 342 Korrelationssignale im (^{15}N - ^1H)-HSQC-Spektrum zu erwarten (ohne Prolinreste, die kein Amidproton besitzen und ohne die aminoterminalen Aminosäure, von der aufgrund des schnellen Austauschs mit

dem Lösungsmittel kein Signal detektiert werden kann). Weiterhin sind zusätzlich je zwei Resonanzen für die Seitenketten-Amidgruppen der Asparaginreste (14 Asp bei p38 α) und der Glutaminreste (15 Gln bei p38 α) und je eine Resonanz der Seitenketten-Amidgruppen der Argininreste (19 Arg bei p38 α) zu erwarten. Da jedoch aufgrund der Größe des Proteins statt normalen HSQC-Spektren TROSY-HSQC-Spektren (*transverse relaxation optimized spectroscopy*) aufgenommen wurden, wurden die Resonanzen der Seitenketten-Amidgruppen unterdrückt und sind im Spektrum nicht zu sehen.

Die Zuordnung der Proteinrückgrat-Amidgruppen sowie der meisten C $^{\alpha}$ -Resonanzen sollte für unkomplexiertes sowie Inhibitor-gebundenes p38 α durch das 3D Tripelresonanz-Experiment TROSY-HNCA erfolgen. In diesem 3D-Experiment werden die Amidresonanzen H N und N mit den C $^{\alpha}$ -Resonanzen derselben Aminosäure ($H_i^N/N_i \leftrightarrow C_i^{\alpha}$) und gleichzeitig mit den C $^{\alpha}$ -Resonanzen der vorhergehenden Aminosäure ($H_i^N/N_i \leftrightarrow C_{i-1}^{\alpha}$) korreliert, wobei letztere Korrelation zu schwächeren Signalintensitäten führt. Die sequenzielle Zuordnung wird allerdings bei Prolinresten aufgrund ihres fehlenden Amidprotons unterbrochen, ebenso bei den Aminosäuren, deren Amidgruppen-Resonanzen im (^{15}N - ^1H)-TROSY-HSQC-Spektrum nicht detektiert werden konnten.

Da eine Auswertung der (^{15}N - ^1H)-TROSY-HSQC- sowie TROSY-HNCA-Spektren keine vollständige oder bei manchen Resonanzen eindeutige Zuordnung ergab, wurde ein weiteres Experiment herangezogen. Mit selektiv markierten Aminosäuren wurden 2D HN(CO)-Experimente an p38 α durchgeführt, wobei die Carbonylkohlenstoff-Resonanz an Position i mit der Proteinrückgrat-Amidgruppe der folgenden Aminosäure (Position $i+1$) korreliert wird und somit eine Kreuzresonanz zwischen zwei benachbarten Aminosäuren detektiert wird. Die sequentiell vorhergehende Aminosäure muss dazu [^{13}C]- und die darauffolgende [^{15}N]-markiert sein. Betrachtet man im 2D HN(CO)-Spektrum die H N /N-Ebene erscheint die Amidresonanzkorrelation bei derselben chemischen Verschiebung wie die der $i+1$ Aminosäure im TROSY-HSQC-Spektrum. Da bei den selektiv markierten Proteinproben nur die Kreuzsignale bestimmter Aminosäurepaare im Spektrum detektierbar sind, ist die Aufnahme einer vollständigen dritten Dimension nicht nötig und das Experiment wurde als zweidimensionales HN(CO)-Spektrum gemessen.

3.2.1.1 Vollständigkeit der Resonanzzuordnung für die unkomplexierte Form von p38 α

Ein (^{15}N - ^1H)-TROSY-HSQC-Spektrum von unkomplexiertem, unphosphoryliertem p38 α zeigt 265 von 342 möglichen Amidresonanzen. Vogtherr et al. (2005) veröffentlichten bereits eine zu 64 % vollständige Zuordnung der Amidgruppen- und C^α -Resonanzen von unkomplexiertem p38 α . Neben dem TROSY-HSQC-Spektrum wurde ein TROSY-HNCA-Spektrum einer uniform [^{13}C , ^{15}N]-markierten, perdeuterierten Proteinprobe aufgenommen. Die ^{15}N -, C^α - sowie ^1H -chemischen Verschiebungen wurden mit der Zuordnung von Vogtherr et al. verglichen (Biologische Magnetresonanzdatenbank-(BMRB)-Eintrag: 6468). Die Zuordnung der Resonanzen erfolgte in CARA (Version 1.3.1; Keller, 2004).

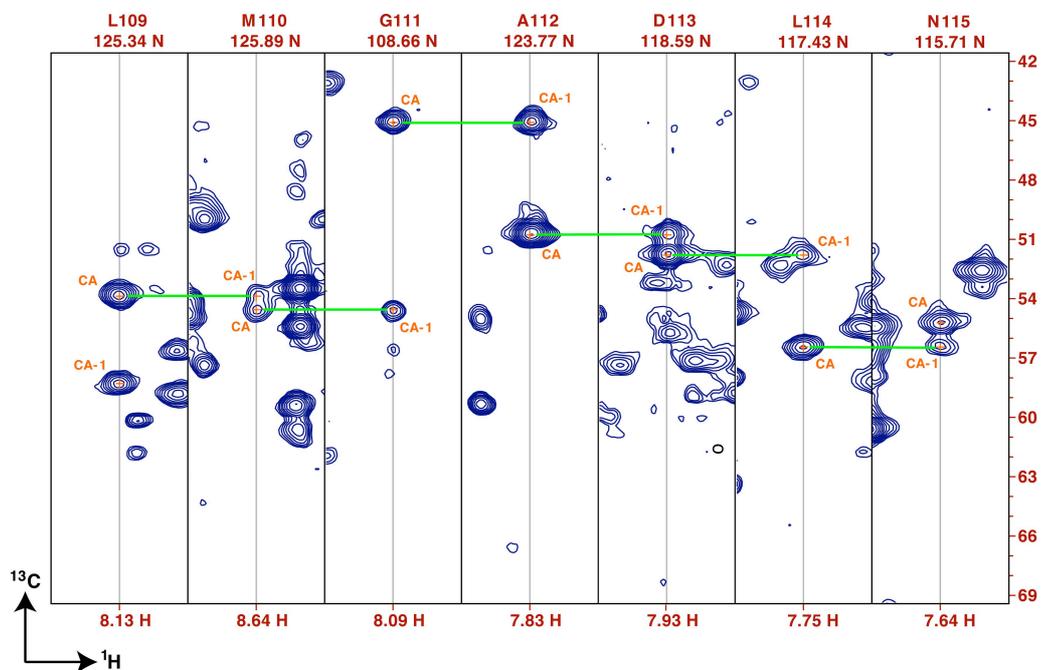


Abbildung 3.8: Streifenanordnung des TROSY-HNCA von unkomplexiertem p38 α . Es sind die Ausschnitte aus der C^α - H^{N} -Ebene dargestellt, die ein sequentielles Fortschreiten von Leu 109 in der *Hinge Region* bis Asn 115 von den jeweiligen C_i^α zu den C_{i-1}^α Resonanzen zeigen. Die N-chemische Verschiebung der jeweiligen Aminosäure ist oberhalb des Streifens angegeben und die H^{N} -chemische Verschiebung wird von der zentralen Linie in jedem Streifen angezeigt und ist unterhalb des Streifens angegeben. Die Konnektivitäten durch die C^α -chemischen Verschiebungen sind durch waagerechte Linien gekennzeichnet (grün).

Eine vollständige sequentielle Zuordnung war durch das Fehlen vieler Resonanzen im TROSY-HNCA-Spektrum jedoch nicht möglich und wurde durch die starke Überlage-

rung der Signale aufgrund der überwiegend α -helikalen Struktur der carboxy-terminalen Domäne von p38 α , die eine eindeutige Peakseparierung in den meisten Fällen nicht gestattete, zusätzlich erschwert.

Als Beispiel der sequentiellen Zuordnung ist in Abb. 3.8 das Fortschreiten entlang der Aminosäuresequenz anhand von Ausschnitten der C $^{\alpha}$ -H N -Ebene im TROSY-HNCA-Spektrum von unkomplexiertem p38 α dargestellt. Die chemischen Verschiebungen in der ^{15}N -Dimension sind jeweils oberhalb jedes Streifens angegeben. Für jede Aminosäure zeigen sich also in einem TROSY-HNCA-Experiment in einer dritten Dimension die beiden C $^{\alpha}$ -Resonanzen der jeweiligen Aminosäure selbst sowie der sequentiell früheren, so dass man mit Hilfe der Streifendarstellung problemlos solange der Sequenz entlang wandern kann, bis die nächste Aminosäure in der Sequenz ein Prolin ist, eine Resonanz nicht detektierbar ist oder eine zu starke Überlagerung eine Zuordnung verhindert.

In Tab. 3.1 sind die Aminosäuren mit den zugehörigen Sekundärstrukturelementen im Protein aufgeführt, die von Vogtherr et al. nicht zugeordnet werden konnten.

Tabelle 3.1: Nicht zugeordnete Aminosäuren der Lösungsstruktur 6468 von p38 α

| Aminosäure | Sekundärstrukturmerkmal in p38 α |
|-------------------|---|
| Met 1 - Arg 5 | - |
| Ile 62 | - |
| Thr 68 - His 77 | α_c -Helix |
| Lys 121- Thr 123 | α_d -Helix |
| Tyr 132- Leu 135 | α_e -Helix |
| His 148 - Pro 153 | HRD-Motiv |
| Asp 168 - Asp 177 | DFG-Motiv und Aktivierungsloop |
| Ala 184- Asp 205 | Aktivierungsloop |
| Asp 227- Ser 254 | α_g -Helix und α_{L14} -Helix |
| Arg 256 - Asn 257 | α_{L14} -Helix |
| Asp 283 - Asp 292 | α_h -Helix |
| Pro 322 - Ser 326 | - |
| Glu 328 | - |
| Thr 341 | α_{L16} -Helix |

Die Zuordnung von Vogtherr et al. konnte größtenteils auf die TROSY-HSQC- und TROSY-HNCA-Spektren übertragen werden, jedoch war eine eindeutige Zuordnung aller wichtigen Aminosäurereste im Bindetaschenbereich nötig. Deshalb wurde eine Methode angewendet, die bei starker Überlagerung der Resonanzen im TROSY-HSQC-Spektrum einer uniform markierten Proteinprobe normalerweise eingesetzt wird; die Methode der selektiven Markierung (Tugarinov et al., 2006). Bei dieser Methode erscheinen weni-

ger Resonanzen im TROSY-HSQC-Spektrum (lediglich die Amidgruppenresonanzen der markierten Aminosäuren), was zu einer geringeren Überlagerung führt und somit eine bessere Zuordnung ermöglicht.

Es wurden drei verschieden selektiv markierte Proteinproben hergestellt, die $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Histidin/ $[^{15}\text{N}]$ -Leucin, $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Leucin/ $[^{15}\text{N}]$ -Methionin und $[^{15}\text{N}]$ -Methionin/ $[^{15}\text{N}]$ -Glycin markiert waren. Diese Aminosäurekombinationen wurden deshalb gewählt, da diese Reste in der *Hinge Region* sequentiell benachbart zu finden sind (Abb. 3.10) und das dynamische Verhalten dieser Region eine zentrale Rolle in dieser Arbeit spielt. Mit jeder dieser Proben wurde jeweils ein TROSY-HSQC-Spektrum aufgenommen und mit den beiden $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Histidin/ $[^{15}\text{N}]$ -Leucin- und $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Leucin/ $[^{15}\text{N}]$ -Methionin-markierten Proben zusätzlich ein HN(CO)-Spektrum.

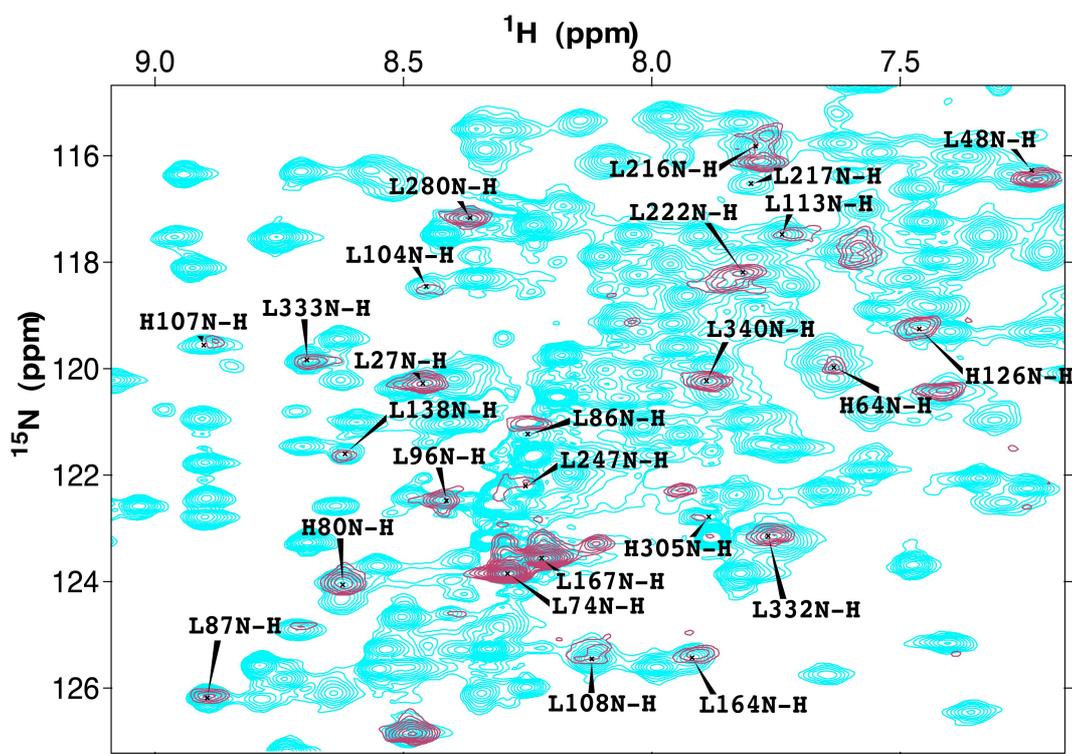


Abbildung 3.9: Ausschnitt aus der Überlagerung der $(^{15}\text{N}-^1\text{H})$ -TROSY-HSQC-Spektren von uniform markiertem p38 α (blau, Konzentration der NMR-Probe: 1.4 mM) und selektiv $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Histidin/ $[^{15}\text{N}]$ -Leucin-markiertem p38 α (violett, Konzentration: 0.4 mM).

Die TROSY-HSQC-Spektren zeigten daher nur noch die Amidresonanzen der beiden markierten Aminosäuretypen, während in den HN(CO)-Spektren lediglich die Kreuzresonanzen der in der Proteinsequenz auftretenden Aminosäurepaare erscheinen. Überlagert man das TROSY-HSQC-Spektrum der selektiv ^{13}C , ^{15}N -Histidin/ ^{15}N -Leucin-markierten mit dem der uniform-markierten p38 α -Probe (Abb. 3.9), heben sich die Histidin- und Leucin-Resonanzen aus den stark überlagerten Regionen der uniform-markierten Probe hervor und eine Zuordnung der Resonanzen unter Einbeziehung der C^α -chemischen Verschiebungen des TROSY-HNCA-Spektrums wird erleichtert. Trotzdem kann es aufgrund von ähnlichen C^α -chemischen Verschiebungen zu Mehrdeutigkeiten bei der Zuordnung kommen, so dass ein 2D HN(CO)-Spektrum der selektiv markierten Proben zusätzliche Informationen liefern kann.

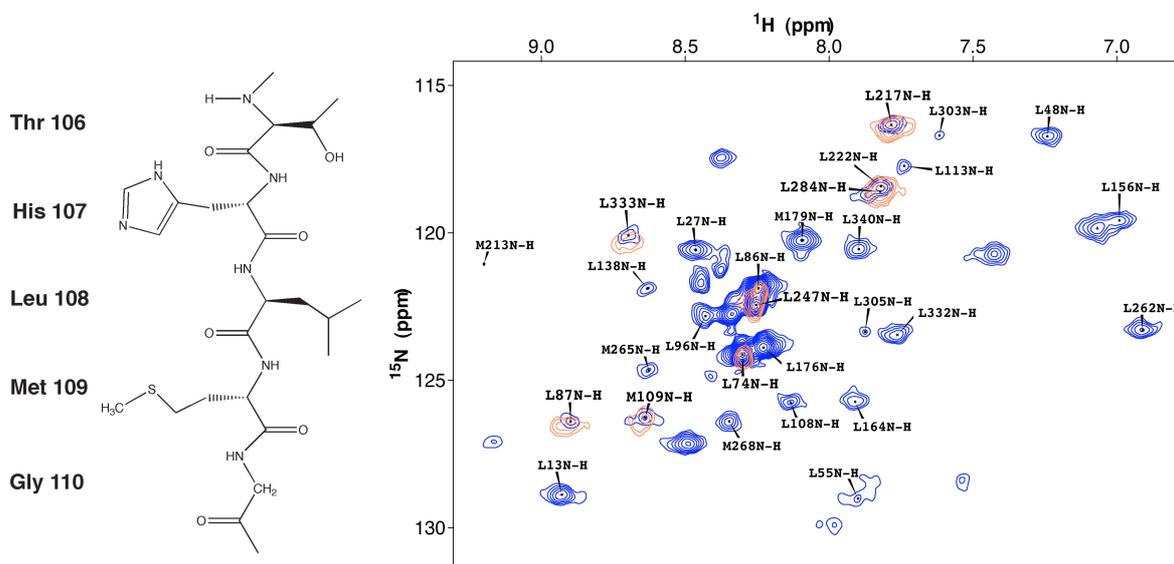


Abbildung 3.10: Die sequentielle Markierung von zwei Aminosäuretypen der *Hinge Region* für die eindeutige Zuordnung der Resonanzen ergibt am Beispiel der ^{13}C , ^{15}N -Leucin/ ^{15}N -Methionin-markierten Probe (Konzentration 0.4 mM) ein 2D HN(CO)-Spektrum mit sieben Kreuzsignalen für sieben sequentiell benachbarte, markierte Leu-Met- bzw. Leu-Leu-Paare. Rechts sind das HN(CO)-Spektrum (orange) und das TROSY-HSQC-Spektrum (blau) der Leu-Met-markierten Probe überlagert dargestellt und links die schematische Darstellung der *Hinge Region*-Sequenz von p38 α .

In Abb. 3.10 ist eine Überlagerung eines TROSY-HSQC-Spektrums (blau) und eines 2D HN(CO)-Spektrums (orange) der ^{13}C , ^{15}N -Leucin/ ^{15}N -Methionin-markierten p38 α -Probe gezeigt. Das HN(CO)-Spektrum zeigt sieben Resonanzen. In der Zuordnung von

Vogtherr et al. sind sieben der insgesamt neun in der Proteinsequenz vorhandenen Leu-Leu- und Leu-Met-Paare zugeordnet. Die beiden nicht zugeordneten Paare sind Met 195 - Leu 196 im Aktivierungsloop und Met 288 - Leu 289 in der α_h -Helix. Bei Überlagerung der beiden Spektren lassen sich die Kreuzsignale den Amidresonanzen der Paare Leu 73 - Leu 74, Leu 86 - Leu 87, Leu 108 - Met 109, Leu 216 - Leu 217, Leu 246 - Leu 247, Leu 283 - Leu 284 und Leu 332 - Leu 333 eindeutig zuordnen.

Von der [^{13}C , ^{15}N]-Histidin/[^{15}N]-Leucin markierten, deuterierten p38 α -Probe war lediglich eine Resonanz im HN(CO)-Spektrum zu erwarten (His 107 - Leu 108), da sich in der Sequenz nur ein His-Leu-Paar und keinerlei His-His-Paare befinden. Neben der erwarteten Resonanz zeigten sich allerdings noch zwei weitere im HN(CO)-Spektrum, die nicht zugeordnet werden konnten. Diese könnten mit der Metabolisierung der markierten Aminosäuren und somit dem Auftreten der markierten Atome in anderen Aminosäuren entstanden sein (Waugh, 1996).

Von der [^{15}N]-Methionin/[^{15}N]-Glycin-markierten p38 α -Probe wurde nur ein TROSY-HSQC-Spektrum aufgenommen und mit dem TROSY-HSQC-Spektrum der uniform-markierten p38 α -Probe überlagert, so dass unter Verwendung der C $^\alpha$ -chemischen Verschiebungen des TROSY-HNCA-Spektrums eine Zuordnung der Resonanzen vorgenommen werden konnte.

Tabelle 3.2: Nicht zugeordnete Aminosäuren

| Aminosäure | Sekundärstrukturmerkmal in p38 α |
|---------------------------|---|
| Tyr 24 | - |
| Arg 49 - Ala 51, Lys 53 | β_3 -Strang |
| Val 102, Val 105 | β_5 -Strang |
| Cys 119 | α_d -Helix |
| Ile 131, Ile 147 | α_e -Helix |
| Ile 166 | β_8 -Strang |
| Ile 206 | Aktivierungsloop |
| Thr 263, Gln 264, Lys 267 | - |

Auf diese Weise konnte die Zuordnung von Vogtherr et al. reproduziert und ergänzt werden. In Tab. 3.2 sind die Aminosäuren aufgeführt, deren Resonanzen von Vogtherr et al. zugeordnet werden konnten, aber in dieser Arbeit fehlen. Zusätzlich konnten die Resonanzen der Aminosäuren Leu 217 und Leu 247 zugeordnet werden. In Abb. 3.11 ist die Zuordnung von p38 α im TROSY-HSQC-Spektrum dargestellt. Nach Auswertung aller

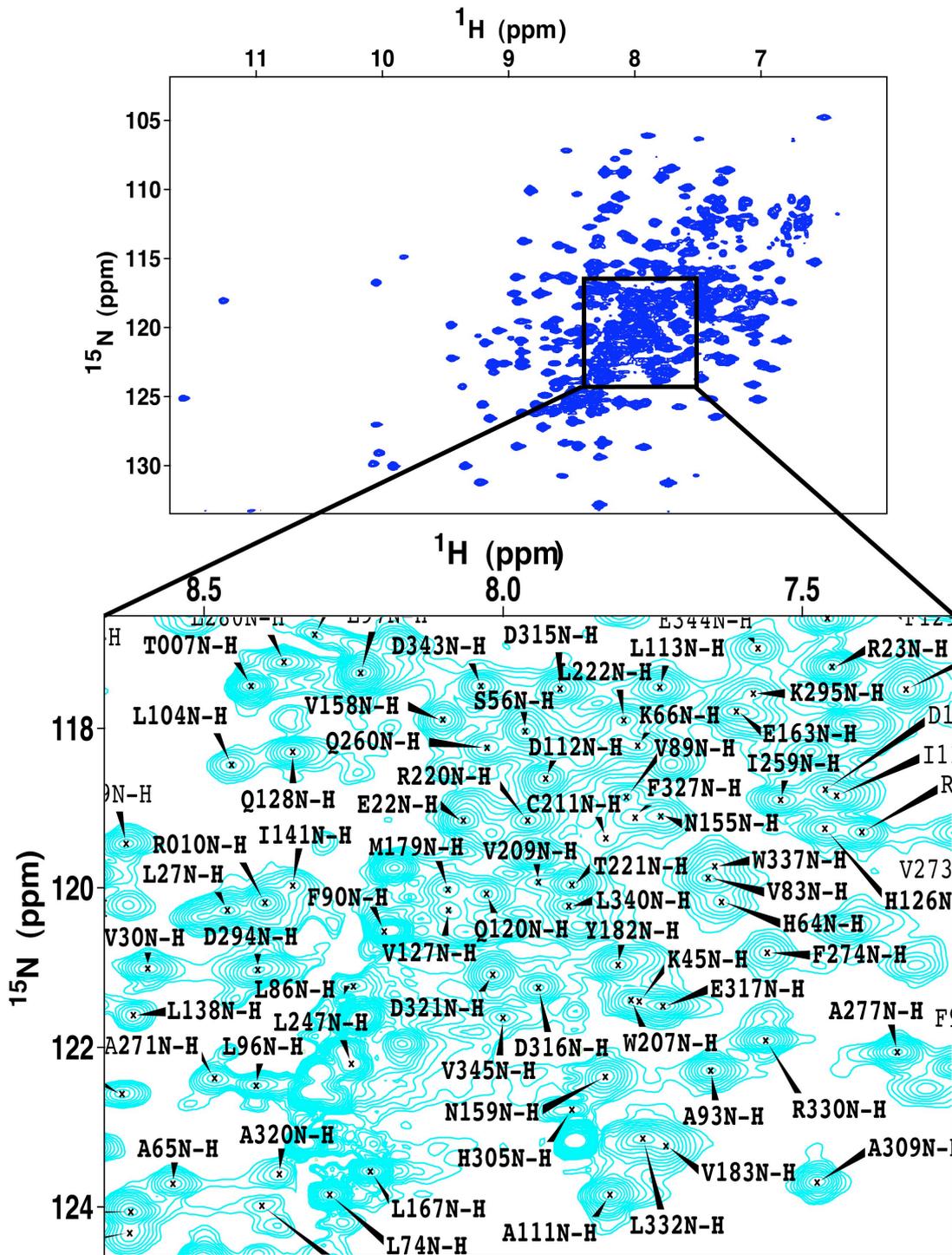


Abbildung 3.12: $(^{15}\text{N}-^1\text{H})$ -TROSY-HSQC-Spektrum von unkomplexiertem, $[^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}]$ -markiertem, perdeutertem p38 α und zugeordneter Ausschnitt der stark überlagerten Region von 7.5 ppm bis 8.5 ppm in der direkten (^1H -Dimension) und von 118 ppm bis 124 ppm in der indirekten Dimension (^{15}N -Dimension).

3.2.1.2 Vollständigkeit der Resonanzzuordnung für die SB203580-gebundene Form von p38 α

Für die Untersuchung des p38 α /SB203580-Komplexes wurde der Inhibitor im Verhältnis 2.5 : 1 zum Protein gegeben. Der Inhibitor SB203580 bindet an freies, unphosphoryliertes p38 α mit einem $IC_{50,inaktiv}$ -Wert von 100 ± 37 nM (Kapitel 1.3.2.1). Für die Resonanzzuordnung wurden (^{15}N - 1H)-TROSY-HSQC- und TROSY-HNCA-Spektren von [^{13}C , ^{15}N]-uniform markiertem, perdeutertem p38 α im Komplex mit SB203580 aufgenommen. Die Resonanzzuordnung für den p38 α /SB203580-Komplex wurde auf dieselbe Weise durchgeführt wie bereits für die unkomplexierte Form von p38 α beschrieben.

Im TROSY-HSQC-Spektrum sind 254 Resonanzen zu sehen, von denen 155 (61 %) den entsprechenden Aminosäuren zugeordnet werden konnten. Das Spektrum zeigt Verschiebungen von Resonanzen, die zu verschiedenen Aminosäuren in der Bindetasche ebenso wie zu amino- bzw. carboxyterminalen α -Helices gehören. Einige Resonanzen, die im TROSY-HSQC-Spektrum eine Änderung der chemischen Verschiebung aufgrund der Inhibitorbindung aufwiesen, konnten anhand eines Vergleichs der C_i^α - und C_{i-1}^α -chemischen Verschiebungen im TROSY-HNCA-Spektrum mit denjenigen von unkomplexiertem p38 α identifiziert werden, da die C^α -Resonanzen kaum von der Inhibitorbindung beeinflusst werden.

Im TROSY-HSQC-Komplexspektrum ließen sich 9.5 % weniger Resonanzen als im Spektrum des unkomplexierten p38 α zuordnen, was einerseits bedeutet, dass sich aufgrund von Änderungen der chemischen Verschiebungen und manchen zu schwachen C^α -Resonanzen nicht mehr alle zuvor zugeordneten Resonanzen eindeutig zuordnen ließen, und andererseits, dass Resonanzen der Bindetascheregionen, die direkt mit dem Inhibitor wechselwirken wie in der Kristallstruktur 1A9U.pdb zu sehen ist, nicht mehr detektierbar waren (Abb. 1.12; Wang et al., 1996). Dazu gehören die Aminosäuren des Glycin-reichen Loops (Gly 33 bis Val 38), der hydrophoben Tasche I (Ile 84 - Leu 86) und der *Hinge Region* (Thr 106 bis Ala 111). Grund dafür ist ein chemischer Austausch auf der μ s- bis ms-Zeitskala (*intermediate exchange*; Kapitel 2.2.3.2).

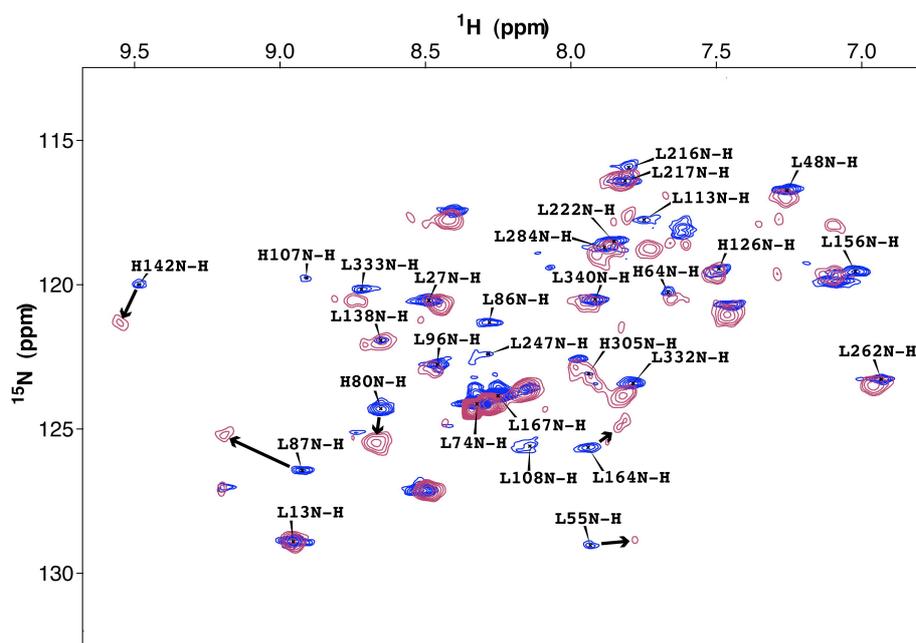


Abbildung 3.13: Überlagerung der (^{15}N - ^1H)-TROSY-HSQC-Spektren von unkomplexiertem, [^{13}C , ^{15}N]-Histidin/[^{15}N]-Leucin-markiertem p38 α (blau, Konzentration der Probe 0.4 mM) und [^{13}C , ^{15}N]-Histidin/[^{15}N]-Leucin-markiertem p38 α /SB203480-Komplex (braun, Konzentration von p38 α 0.4 mM und von SB203580 1.0 mM). Signifikante Änderungen der chemischen Verschiebungen nach der Komplexbildung in den Bindetaschenbereichen des Proteins sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Auch bei dem p38 α /SB203580-Komplex wurde das Protein selektiv markiert. Es wurden Komplexproben unter Verwendung desselben Markierungsschemas wie bei unkomplexiertem p38 α hergestellt, die vollständig deuteriert waren bis auf die Markierung der Aminosäurepaare [^{13}C , ^{15}N]-Histidin/[^{15}N]-Leucin, [^{13}C , ^{15}N]-Leucin/[^{15}N]-Methionin und [^{15}N]-Methionin/[^{15}N]-Glycin. Damit wurden (^{15}N - ^1H)-TROSY-HSQC- und HN(CO)-Spektren aufgenommen.

In Abb. 3.13 ist eine Überlagerung der TROSY-HSQC-Spektren des [^{13}C , ^{15}N]-Histidin/[^{15}N]-Leucin-markierten p38 α /SB203480-Komplexes (in braun) und des [^{13}C , ^{15}N]-Histidin/[^{15}N]-Leucin-markierten, unkomplexierten p38 α (in blau) gezeigt. Die Resonanzen His 107 und Leu 108 der *Hinge Region* und Leu 86 aus der hydrophoben Tasche I sind nach Bindung des Inhibitors aufgrund von mittelschnellem Austausch nicht mehr detektierbar, während die chemischen Verschiebungen anderer Aminosäuren, wie Leu 55, Leu 87, Leu 164, His 80 und His 142, signifikante Änderungen aufweisen. Die Aminosäure Leu 55 liegt im β_3 -Strang benachbart zum Glycin-reichen Loop, während

Leu 87 zur hydrophoben Tasche I gehört. Die Aminosäuren His 80, His 142 und Leu 164 liegen am Eingang der Bindetasche in der C-terminalen Domäne, wobei His 142 in der α_e -Helix und Leu 164 im β_8 -Strang liegen.

Von den $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Histidin/ $[^{15}\text{N}]$ -Leucin und $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Leucin/ $[^{15}\text{N}]$ -Methionin markierten, deuterierten Proben wurden HN(CO)-Spektren gemessen. Das $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Histidin/ $[^{15}\text{N}]$ -Leucin-Komplexspektrum zeigte dasselbe Phänomen zusätzlicher Resonanzen wie das HN(CO)-Spektrum der freien Form von p38 α , was auf eine Metabolisierung der markierten Aminosäuren zurückzuführen ist (Waugh, 1996). Jedoch lieferte das $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Leucin/ $[^{15}\text{N}]$ -Methionin-markierte p38 α /SB203580-Komplex-Spektrum wichtige Informationen.

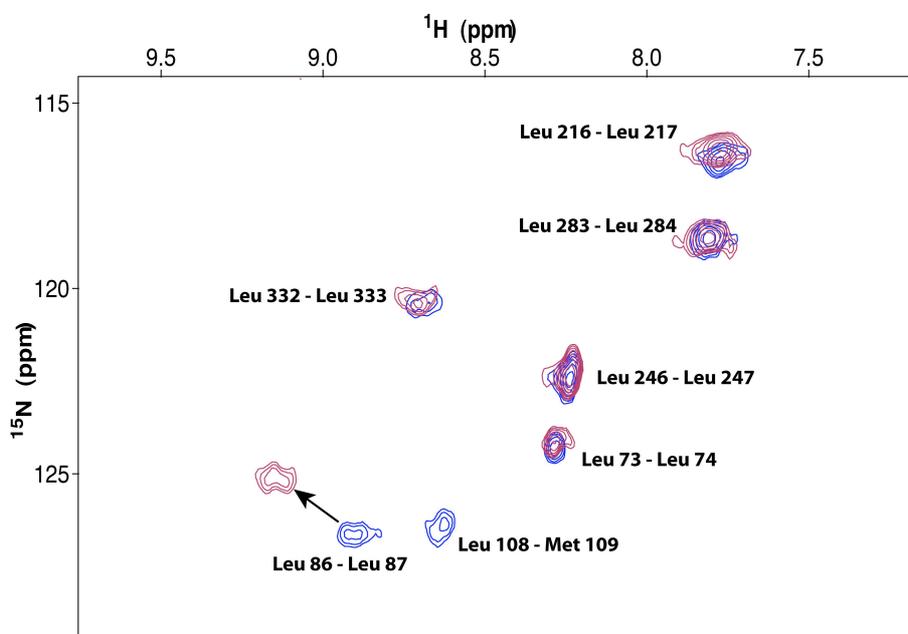


Abbildung 3.14: Überlagerung der HN(CO)-Spektren von unkomplexiertem, $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Leucin/ $[^{15}\text{N}]$ -Methionin-markiertem p38 α (blau, Konzentration 0.4 mM) und $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Leucin/ $[^{15}\text{N}]$ -Methionin-markiertem p38 α /SB203480-Komplex (braun, Konzentration von p38 α 0.4 mM und von SB203580 1.0 mM). Eine signifikante Änderung der chemischen Verschiebungen nach Komplexbildung zeigt das Kreuzsignal von Leu 86 - Leu 87, während das von Leu 108 - Met 109 nicht mehr detektierbar ist.

In Abb. 3.14 ist eine Überlagerung der HN(CO)-Spektren der $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Leucin/ $[^{15}\text{N}]$ -Methionin-markierten Probe gezeigt. Das p38 α /SB203480-Spektrum (braun) zeigt im Gegensatz zu unkomplexiertem p38 α nur sechs (statt sieben) Kreuzsignale. Das Kreuzsignal des Aminosäurepaares Leu 108 - Met 109 aus der *Hinge Region* ist im

Komplexspektrum nicht mehr sichtbar, während die Resonanz des Aminosäurepaares Leu 86 - Leu 87 eine signifikante Änderung in der chemischen Verschiebung aufweist. Das bedeutet, dass auch dieses Spektrum einen mittelschnellen Austausch des Aminosäurerückgrats in der *Hinge Region* zeigt.

3.2.1.3 Vollständigkeit der Resonanzzuordnung für die NR243-gebundene Form von p38 α

Durch Zugabe von NR243 aus einer 50 mM DMSO-Stammlösung zu unkomplexiertem, unphosphoryliertem p38 α färbte sich die Lösung gelb und es erfolgte eine Ausfällung von geringen Mengen des Proteins. Ungebundener Überschuss an NR243 präzipitierte ebenfalls. Uniform [$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$]-markiertes, perdeutiertes p38 α wurde mit NR243 versetzt und ein (^{15}N - ^1H)-TROSY-HSQC- sowie ein TROSY-HNCA-Spektrum aufgenommen. Das TROSY-HSQC-Spektrum zeigte 258 Resonanzen, wovon 159 (61.6 %) nach derselben Methode wie für die unkomplexierte Form von p38 α beschrieben zugeordnet werden konnten. Die Zuordnung der Resonanzen erfolgte auch hier unter Einbeziehung von Proteinproben mit selektiv markierten Aminosäuren.

Es wurden die drei selektiv markierten Proteinproben [^{13}C , ^{15}N]-Histidin/[^{15}N]-Leucin, [^{13}C , ^{15}N]-Leucin/[^{15}N]-Methionin und [^{15}N]-Methionin/[^{15}N]-Glycin im Komplex mit NR243 gemessen. Der Inhibitor wurde in 2.5 fachem Überschuss eingesetzt. Es wurden TROSY-HSQC-Spektren aller drei Proben ebenso wie HN(CO)-Spektren der [^{13}C , ^{15}N]-Histidin/[^{15}N]-Leucin- und [^{13}C , ^{15}N]-Leucin/[^{15}N]-Methionin-markierten Proben im Komplex mit dem Inhibitor aufgenommen.

In Abb. 3.15 sind die TROSY-HSQC-Spektren der [^{13}C , ^{15}N]-Histidin/[^{15}N]-Leucin-markierten Proteinprobe im unkomplexierten (blau) und im NR243 gebundenen Zustand (rot) überlagert dargestellt. Der Vergleich der Spektren zeigt ebenfalls signifikante Verschiebungen der Resonanzen im Bereich der Bindetasche. Dazu gehören, ähnlich wie nach Bindung von SB203580, His 80 auf der carboxy-terminalen Seite der Bindetasche, His 142 in der α_e -Helix und Leu 164 im β_8 -Strang. Außerdem lässt sich zusätzlich ein mittelschneller Austausch der Resonanzen der Aminosäuren Leu 86 und Leu 87 der hydrophoben Tasche I sowie His 107 und Leu108 der *Hinge Region* beobachten.

Desweiteren zeigt das HN(CO)-Spektrum des [^{13}C , ^{15}N]-Leucin/[^{15}N]-Methionin-markierten p38 α im Komplex mit N243 nur fünf Kreuzsignale im Gegensatz zu den

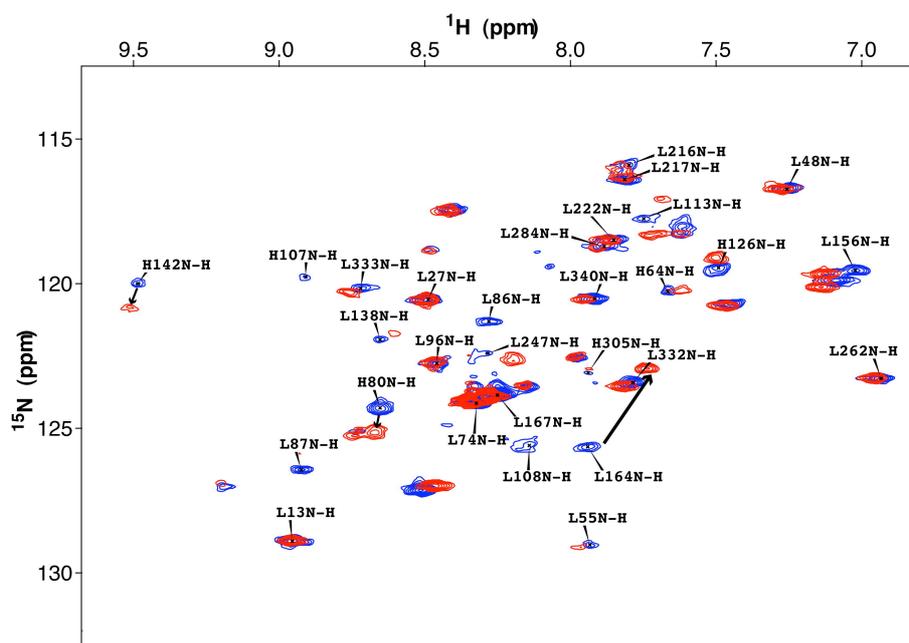


Abbildung 3.15: Überlagerung der (^{15}N - ^1H)-TROSY-HSQC-Spektren von unkomplexiertem, [^{13}C , ^{15}N]-Histidin/ ^{15}N -Leucin-markiertem p38 α (blau, Konzentration 0.4 mM) und [^{13}C , ^{15}N]-Histidin/ ^{15}N -Leucin-markiertem p38 α /NR243-Komplex (rot, Konzentration von p38 α 0.4 mM und von NR243 1.0 mM). Signifikante Änderungen der chemischen Verschiebungen nach der Komplexbildung in den Bindetaschebereichen des Proteins sind durch Pfeile gekennzeichnet.

sieben des unkomplexierten, [^{13}C , ^{15}N]-Leucin/ ^{15}N -Methionin-markierten p38 α .

In Abb. 3.16 ist die Überlagerung der HN(CO)-Spektren der [^{13}C , ^{15}N]-Leucin/ ^{15}N -Methionin-markierten p38 α -Proben ohne (blau) und mit (rot) NR243 gezeigt. Die beiden Kreuzresonanzen der Aminosäurepaare, die aufgrund von mittelschnellem Austausch nicht detektierbar sind, sind Leu 86 - Leu 87 und Leu 108 - Met 109.

Ähnlich wie bei dem Komplex p38 α /SB203580 kommt es auch bei p38 α /NR243 zu mittelschnellem Austausch bei Resonanzen in der Bindetasche. Im Gegensatz zu p38 α /SB203580 sind zusätzlich die Resonanzen Val 90 in der hydrophoben Tasche I und Asp 112 in der *Hinge Region* nicht detektierbar.

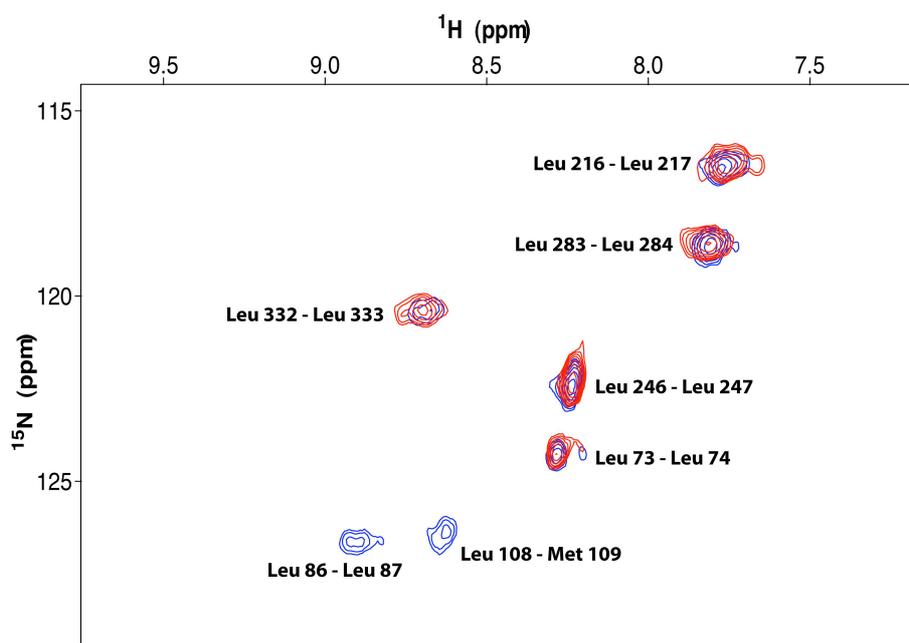


Abbildung 3.16: Überlagerung der HN(CO)-Spektren von unkomplexiertem, $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Leucin/ $[^{15}\text{N}]$ -Methionin-markiertem p38 α (blau, Konzentration 0.4 mM) und $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Leucin/ $[^{15}\text{N}]$ -Methionin-markiertem p38 α /NR243-Komplex (rot, Konzentration von p38 α 0.4 mM und von NR243 1.0 mM).

3.3 Charakterisierung der Inhibitoren

Um ein Modell der Komplexstruktur von p38 α mit den Inhibitoren SB203580 und NR243 mittels NOE-basierten Distanzeinschränkungen zu bestimmen, war eine vollständige Zuordnung der Inhibitorresonanzen nötig. SB203580 ist der Prototyp der Pyridinylimidazolinhibitoren und die Synthese sowie eine Protonenresonanzzuordnung wurde von Gallagher et al. (1997) veröffentlicht. NR243 gehört zu einer neuen Klasse bisher nicht im Komplex mit p38 α strukturell untersuchter Inhibitoren, dessen Synthese und Protonenresonanzzuordnung von Laufer et al. (2006) veröffentlicht wurden. Zur vollständigen Charakterisierung der Liganden wurden diese in einer Konzentration von 5 mM in einem 1:1 Verhältnis von perdeuteriertem NMR-Messpuffer zu d₆-DMSO angesetzt. Ein Zusatz von DMSO in dieser Höhe war nötig um ein Präzipitieren des Inhibitors zu verhindern. Alle Spektren wurden bei 298 K an einem 400 MHz-Spektrometer aufgenommen.

3.3.1 Charakterisierung von SB203580

Zuerst wurde ein 1D ^1H -Spektrum des Pyridinylimidazolinhibitors SB203580 aufgenommen. Dieses zeigt fünf Protonenresonanzen im aromatischen Bereich zwischen 8.6 und 7.3 ppm und eine bei 2.71 ppm (Abb. 3.17). Da jeder aromatische Ring symmetrisch ist, erfahren die beiden sich im Ring gegenüberliegenden H-Atome jeweils dieselbe chemische Verschiebung aufgrund derselben chemischen Umgebung. Also sind für jeden Phenytring nur zwei Signale in den Spektren sichtbar. Dazu kommt, dass die H-Atome 2' und 6' des Fluorophenylrings (A-Ring) und die H-Atome 2' und 6' des Pyridinrings (C-Ring) eines sehr ähnliche chemische Verschiebung erfahren und deshalb im 1D ^1H -Spektrum als zwei dicht nebeneinander liegende Dubletts, die die Form eines Triplets darstellen, erscheinen (7.6 ppm; auch Abb. 3.18).

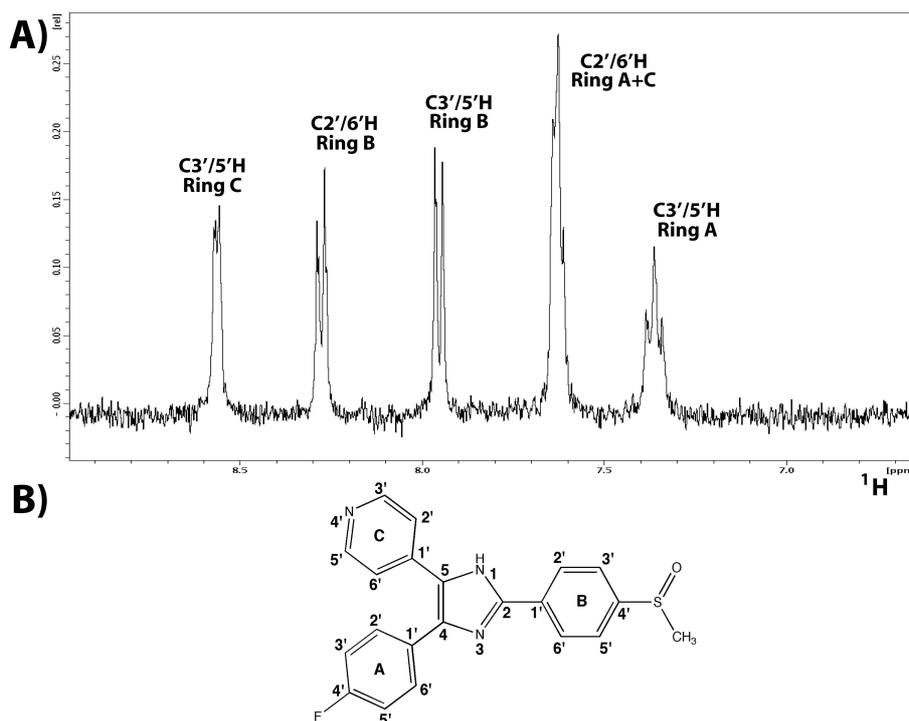


Abbildung 3.17: A) 1D ^1H -Spektrum von SB203580 und B) nummerierte Darstellung des Moleküls SB203580. Die Resonanz der Methylgruppe liegt unter den Resonanzen des HEPES-Puffers (Konzentration der Inhibitorprobe 5 mM).

Die Mitte des Dubletts der H^{2'}- und H^{6'}-Atome im Ring C liegt bei 7.63 ppm (³J=5.30 Hz) und der H^{2'}- und H^{6'}-Atome im Ring A bei 7.61 ppm (³J=6.0 Hz). Die Resonanz der H^{3'}-, H^{5'}-Atome des A-Rings liegt bei 7.36 ppm und ist als Triplett aufgespalten. Da ein Fluoratom am Phenylring in vicinaler Stellung zu den beiden Protonen liegt, kommt es zu einer Triplett-Aufspaltung, in der man die ³J_{HF}-Kopplung von 8.7 Hz findet (9.0 Hz bei Fluorbenzol; Hesse et al., 2002).

Um die chemischen Verschiebungen der Protonen im 1D ¹H-Spektrum von SB203580 zweifellos zu den Kohlenstoffatomen ordnen zu können, wurde mit derselben Probe ein (¹³C-¹H)-HSQC-, ein (¹³C-¹H)-HMBC- und ein (¹H-¹H)-NOESY-Spektrum aufgenommen.

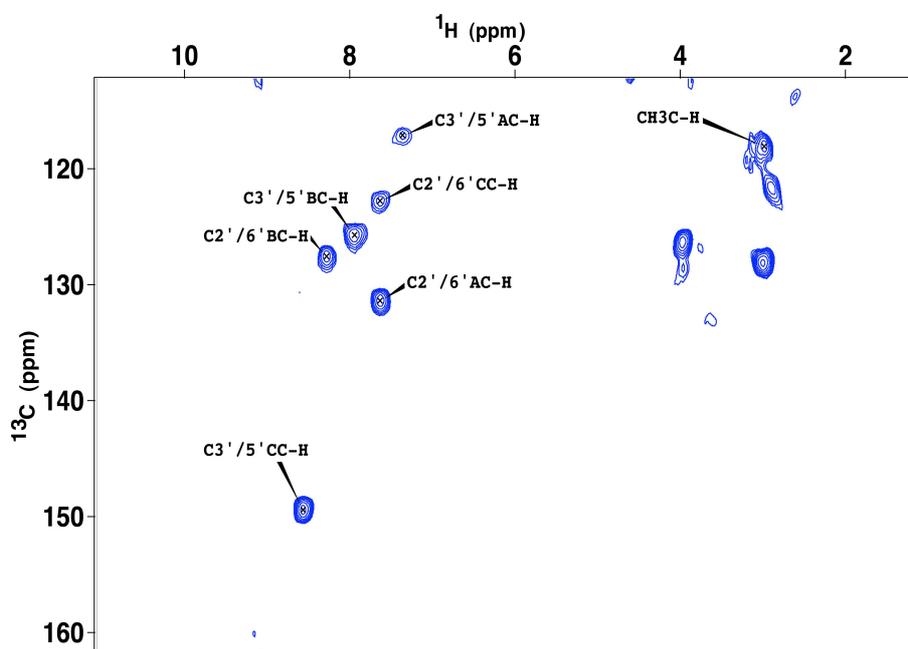


Abbildung 3.18: (¹³C-¹H)-HSQC-Spektrum von SB203580. An der Position, an der im 1D ¹H-Spektrum die chemische Verschiebung für die vier H-Atome 2' und 6' in Ring A und C liegt, sind durch die ¹³C-Editierung zwei Resonanzen erkennbar. Die nicht zugeordneten Resonanzen im Bereich der ¹H-chemischen Verschiebung von 3-4 ppm sind Signale des HEPES-Puffersystems.

In Abb. 3.18 ist das (¹³C-¹H)-HSQC-Spektrum von SB203580 dargestellt. Es zeigt alle Resonanzkorrelationen der vorhandenen CH-Gruppen. Da die vier Protonen 2' und 6' der Ringe A und C gleiche Resonanzfrequenzen besitzen, erscheinen sie im 1D ¹H-Spektrum bei gleicher chemischer Verschiebung. Da aber die 2' und 6' C-Atome der Ringe A und C durch den unterschiedlichen Einfluss eines Fluor- bzw. Stickstoffatoms im Ring ver-

schiedene chemische Verschiebungen aufweisen, sind im (^{13}C - ^1H)-HSQC-Spektrum zwei unterschiedliche Resonanzen sichtbar und die H- bzw. C-Atome der beiden Ringe somit unterscheidbar. Die Resonanzen der 2' und 6' C-Atome des A-Rings liegen bei 131.34 ppm und die der 2' und 6' C-Atome des C-Rings bei 122.61 ppm.

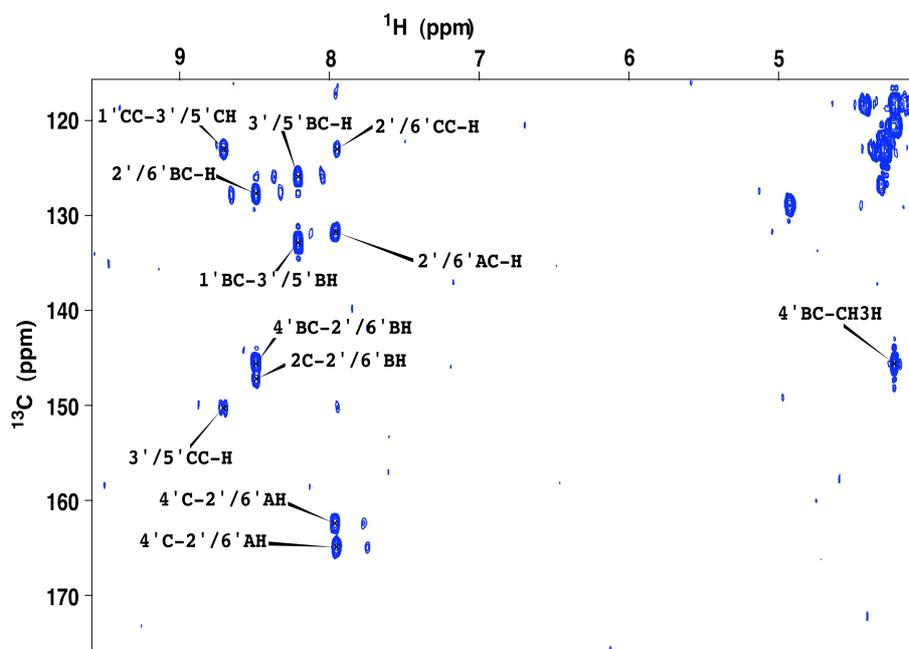


Abbildung 3.19: (^{13}C - ^1H)-HMBC-Spektrum von SB203580. In diesem Spektrum sind die ^1H -chemischen Verschiebungen mit den ^{13}C -chemischen Verschiebungen über eine $^3J_{\text{HC}}$ -Kopplung korreliert. Die nicht zugeordneten Resonanzen im Bereich der ^1H -chemischen Verschiebungen von 3-4 ppm sind Signale des HEPES-Puffersystems.

In Abb. 3.19 ist das (^{13}C - ^1H)-HMBC-Spektrum von SB203580 gezeigt. In einem HMBC-Spektrum sind die H-Atome mit den C-Atomen der jeweils übernächsten Bindung korreliert ($^3J_{\text{HC}}$ -Kopplung). Im Spektrum sind für verschiedene H-chemischen Verschiebungen die jeweiligen C-Korrelationen zu finden, allerdings fehlen die chemischen Verschiebungen der 3', 5'-H-Atome des A-Rings zu den C-Atomen desselben Rings über eine $^3J_{\text{HC}}$ -Kopplung gänzlich. Die 3', 5'-H-Verschiebungen des Ringes A liegen bei 7.36 ppm benachbart zu einem Fluoratom und sollten ein Kreuzsignal zum jeweiligen 3'- bzw. 5'-C-Atom und ein weiteres zum $\text{C}^{1'}$ -Atom des A-Rings zeigen. Diese Korrelationen sind allerdings nicht im Spektrum vorhanden, jedoch sind zwei schwache Resonanzen bei 163.9 und 161.4 ppm erkennbar, was bedeutet, dass die $^2J_{\text{HC}}$ -Kopplung zum $\text{C}^{4'}$ -Atom des A-Rings zu sehen ist,

wobei die Kohlenstoffresonanz durch die Anwesenheit des Fluoratoms aufgespalten wird. Das Kreuzsignal der $^3J_{HC}$ -Kopplung zwischen dem $C^{4'}$ -Atomen und den $H^{2',6'}$ -Atomen ist ebenfalls aufgespalten und zeigt zwei Signale bei 163.9 und 161.4 ppm. Somit ist die $^1J_{CF}$ -Kopplung sichtbar, die 249 Hz beträgt (245 Hz bei Fluorbenzol; Hesse et al., 2002). Eine weitere allerdings wesentlich kleinere Aufspaltung ist bei der Resonanz der $C^{3'}$ - $H^{5'}$ -Atome bzw. $C^{5'}$ - $H^{3'}$ -Atome im C-Ring zu erkennen. Das Protonensignal wird durch die Anwesenheit des Stickstoffatoms durch eine $^2J_{HN}$ -Kopplung von 10.5 Hz aufgespalten. Zusätzlich sind für sämtliche Resonanzen schwache $^2J_{HC}$ -Kopplungen zu erkennen. Das könnte daran liegen, dass der Inhibitor sich nicht in Wasser, sondern in einem D_2O/d_6 -DMSO-Puffergemisch (v/v 50 %) befindet und somit keine zusätzlichen, störenden Protonenresonanzen vorhanden sind. Die Korrelationen zu den Imidazolkohlenstoffatomen C^4 und C^5 von $H^{2',6'}$ des C- als auch des A-Rings sind im HMBC-Spektrum nicht detektierbar und können somit nicht zugeordnet werden.

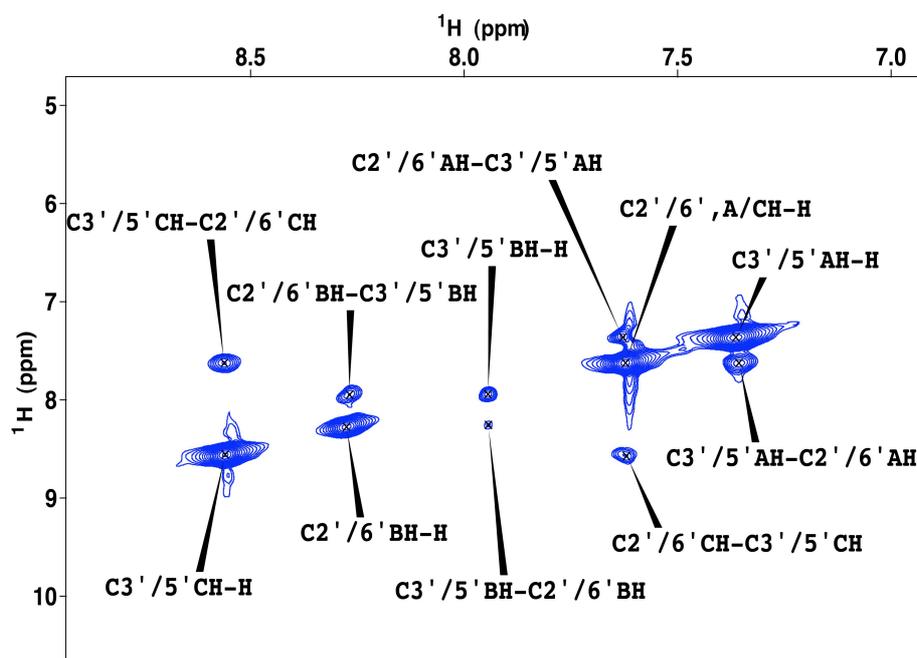


Abbildung 3.20: (1H - 1H)-NOESY-Spektrum von SB203580. In der Diagonale des Spektrums liegen die 1H -chemischen Verschiebungen entsprechend des 1D 1H -Spektrums, die Kreuzsignale der zueinander räumlich benachbarten Protonen liegen außerhalb der Diagonalen (Mischzeit 60 ms).

Im (^1H - ^1H)-NOESY-Spektrum von SB203580 (Abb. 3.20) sind in der Diagonale die chemischen Verschiebungen der H-Atome zu finden wie sie im 1D ^1H -Spektrum erscheinen. Im NOESY-Spektrum sieht man die Kreuzsignale zwischen räumlich benachbarten H-Atomen. Bis auf ein Kreuzsignal zwischen den H-Atomen der CH_3 -Gruppe des Sulfinylrestes und der 3', 5'-H-Atome des B-Rings sind alle Kreuzsignale zwischen benachbarten H-Atomen desselben Ringes zu finden. Das zu geringe Signal-zu-Rauschen-Verhältnis dieser fehlenden Resonanz könnte mit der Beweglichkeit der Sulfinylgruppe zusammen hängen.

Die Zuordnung von SB203580 nach Auswertung aller Spektren ist wie folgt: ^1H -NMR (1:1 NMR-Messpuffer : DMSO), δ in ppm: 8.56 (d, $^3\text{J}=5.30$ Hz, 2H, $\text{H}^{3'}$, $\text{H}^{5'}$ Ring C), 8.27 (d, $^3\text{J}=8.25$ Hz, 2H, $\text{H}^{2'}$, $\text{H}^{6'}$ Ring B), 7.95 (d, $^3\text{J}=8.25$ Hz, 2H, $\text{H}^{3'}$, $\text{H}^{5'}$ Ring B), 7.63 (d, $^3\text{J}=5.30$ Hz, 2H, $\text{H}^{2'}$, $\text{H}^{6'}$ Ring C), 7.61 (d, $^3\text{J}=6.0$ Hz, 2H, $\text{H}^{2'}$, $\text{H}^{6'}$ Ring A), 7.36 (t, $^3\text{J}=8.7$ Hz, HF, $\text{H}^{3'}$, $\text{H}^{5'}$ Ring A), 2.93 (s, 3H, CH_3);

^{13}C -NMR, δ in ppm: 162.65 (d, C, $^2\text{J}_{\text{CF}}=249$ Hz, $\text{C}^{4'}$, Ring A), 149.41 (d, 2C, $\text{C}^{3'}$, $\text{C}^{5'}$ Ring C), 146.45 (C, C^2), 144.32 (C, $\text{C}^{4'}$, Ring B), 132.16 (C, $\text{C}^{1'}$, Ring B), 131.34 (2C, $\text{C}^{2'}$, $\text{C}^{6'}$ Ring A), 127.25 (2C, $\text{C}^{2'}$, $\text{C}^{6'}$ Ring B), 125.55 (2C, $\text{C}^{3'}$, $\text{C}^{5'}$ Ring B), 122.46 (C, $\text{C}^{1'}$, Ring C), 122.61 (2C, $\text{C}^{2'}$, $\text{C}^{6'}$ Ring C), 117.11 (2C, $\text{C}^{3'}$, $\text{C}^{5'}$ Ring A), 48.07 (3C, CH_3).

Das $\text{C}^{1'}$ -Atom im Ring A konnte nicht zugeordnet werden, da das Resonanzsignal im (^{13}C - ^1H)-HBMC-Spektrum nicht detektierbar war.

3.3.2 Charakterisierung von NR243

Das 1D ^1H -Spektrum des Inhibitors NR234 zeigt im aromatischen Bereich zehn verschiedene Protonensignale, die zu insgesamt 11 aromatischen Wasserstoffen gehören (Abb. 3.21). Die chemischen Verschiebungen der Resonanzen der beiden Wasserstoffatome $\text{H}^{4'}$ und $\text{H}^{6'}$ am Pyridinring sind nicht nur in der H-Dimension, sondern auch in der C-Dimension sehr ähnlich.

Eine bereits vorhandene Protonenresonanzzuordnung von Laufer et al. (2006) konnte als Vergleich genutzt werden.

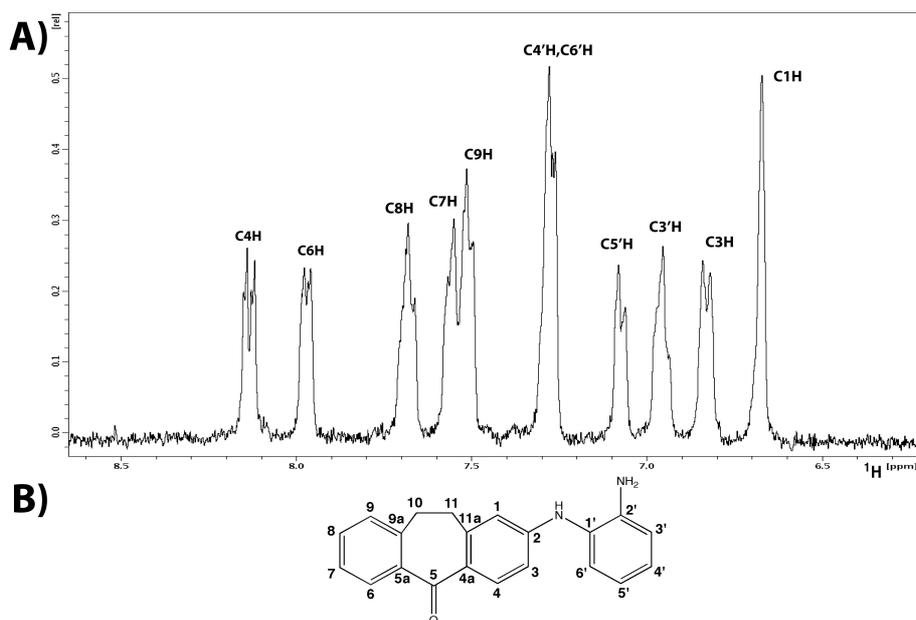


Abbildung 3.21: A) 1D ¹H-Spektrum von NR243 und B) nummerierte Darstellung des Moleküls NR243. Die Resonanzen der beiden C¹⁰H₂- und C¹¹H₂-Methylengruppen liegen unter den starken Signalen des HEPES-Puffersystems bei 3-3.1 ppm (Konzentration der Inhibitorprobe 5 mM).

In Abb. 3.21 sind das 1D ¹H-Spektrum von NR243 und die nummerierte Darstellung des Inhibitors gezeigt. Um die Protonen den direkt daran gebundenen C-Atomen zuordnen zu können, wurde mit derselben Probe ein (¹³C-¹H)-HSQC-, ein (¹³C-¹H)-HMBC- und ein (¹H-¹H)-NOESY-Spektrum aufgenommen.

In Abb. 3.22 ist das (¹³C-¹H)-HSQC-Spektrum von NR243 gezeigt. Es zeigt nicht nur die einfachen C-H-Kopplungen (¹J-Kopplungen), sondern auch sehr schwache Resonanzen der über zwei Bindungen entfernten C-Atome zum entsprechenden H-Atom (²J-Kopplung). Da fast alle Protonen-Kohlenstoffgruppen ihre chemischen Verschiebungen im aromatischen Bereich zeigen, wurde die Trägerfrequenz entsprechend gewählt, so dass die Signale der C¹⁰H₂- und C¹¹H₂-Methylengruppen ins Spektrum zurückgefaltet wurden.

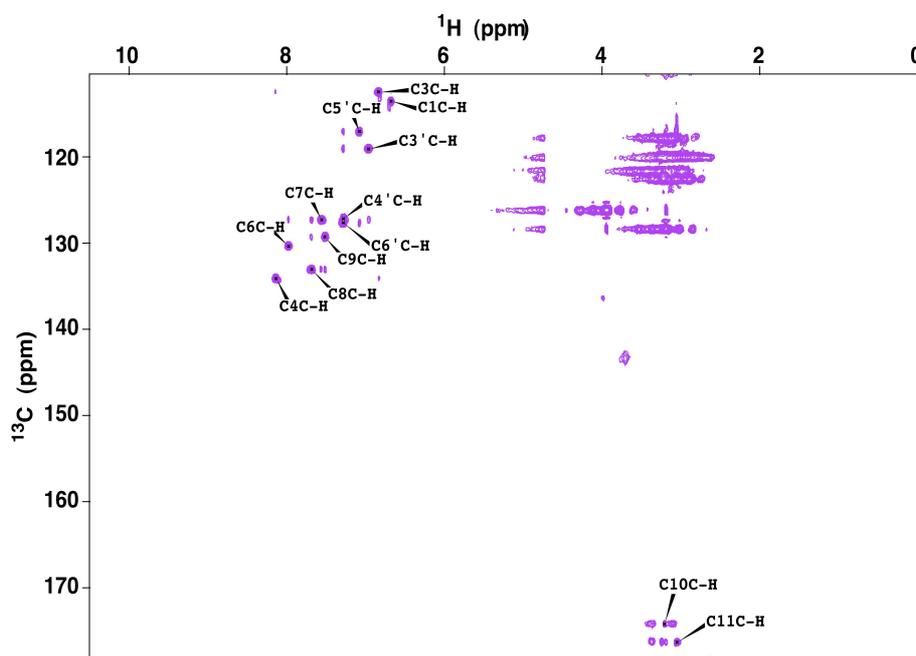


Abbildung 3.22: (^{13}C - ^1H)-HSQC-Spektrum von NR243. Die nicht zugeordneten Resonanzen im ^1H -Bereich zwischen 3 und 5 ppm sind Signale des HEPES-Puffersystems. Die Signale der C^{10}H_2 - und C^{11}H_2 -Gruppen wurden ins Spektrum zurückgefaltet, da ihre Resonanzen außerhalb des Aufnahmebereichs liegen.

In Abb. 3.23 ist das (^{13}C - ^1H)-HBMC-Spektrum von NR243 gezeigt. Es wurden alle möglichen Kreuzsignale im Spektrum zugeordnet. Die beiden Kreuzsignale der $\text{C}^{10}\text{-H}^9$ - und der $\text{C}^{11}\text{-H}^1$ -Kopplungen wurden in das Spektrum zurückgefaltet, da die chemischen Verschiebungen der Methylengruppen nicht im aromatischen Bereich liegen und somit außerhalb der spektralen Weite (Aufnahmebereich) lagen. Genauso wurde die Resonanz des C^5 -Carbonylkohlenstoffs ins Spektrum gefaltet, da die chemische Verschiebung der Carbonylgruppe bei tiefem Feld detektiert wird. Ebenso wie im HSQC-Spektrum sind auch Signale der ^2J -Kopplungen zu sehen, die zwar schwach sind, aber trotzdem eindeutig diese Kopplung zeigen. Die nicht zugeordneten Resonanzen im Spektrum stammen vom HEPES-Puffersystem.

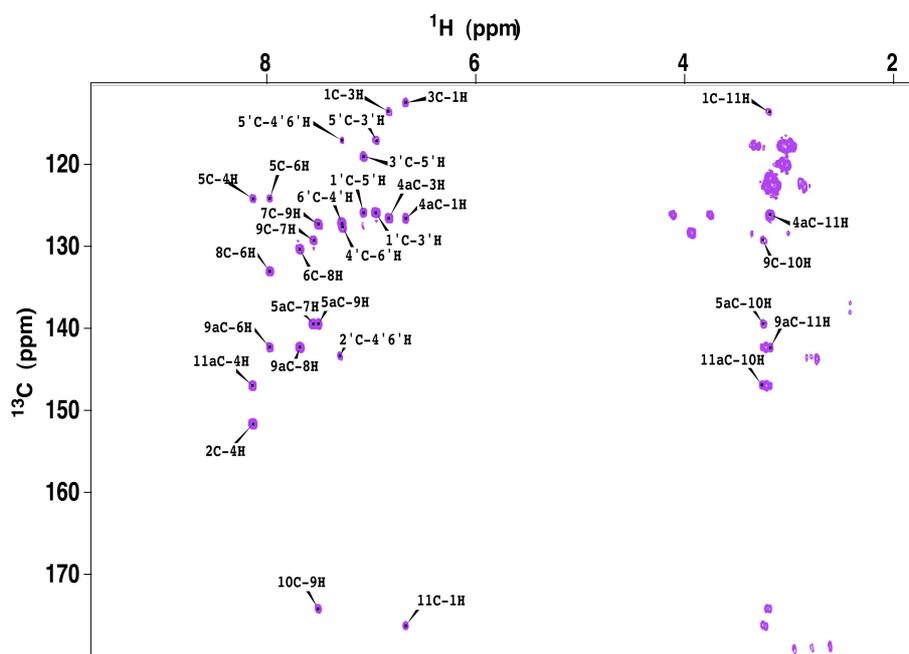


Abbildung 3.23: (^{13}C - ^1H)-HBMC-Spektrum von NR243. In diesem Spektrum sind die ^1H -chemischen Verschiebungen mit den ^{13}C -chemischen Verschiebungen über eine ^3J -Kopplung korreliert. Die nicht zugeordneten Resonanzen im Bereich der ^1H -chemischen Verschiebung von 3-4 ppm sind Signale des HEPES-Puffersystems.

Für die eindeutige Zuordnung der ^1H -Resonanzen wurde ein (^1H - ^1H)-NOESY-Spektrum von NR243 aufgenommen (Abb. 3.24). Dieses zeigt in der Diagonalen die Protonenverschiebungen wie sie auch im 1D ^1H -Spektrum von NR243 erscheinen. Zusätzlich sind alle Kreuzsignale zwischen zwei räumlich benachbarten H-Atomen zu sehen. Auch in diesem Spektrum konnten alle Protonen ihren jeweiligen Resonanzen zugeordnet werden.

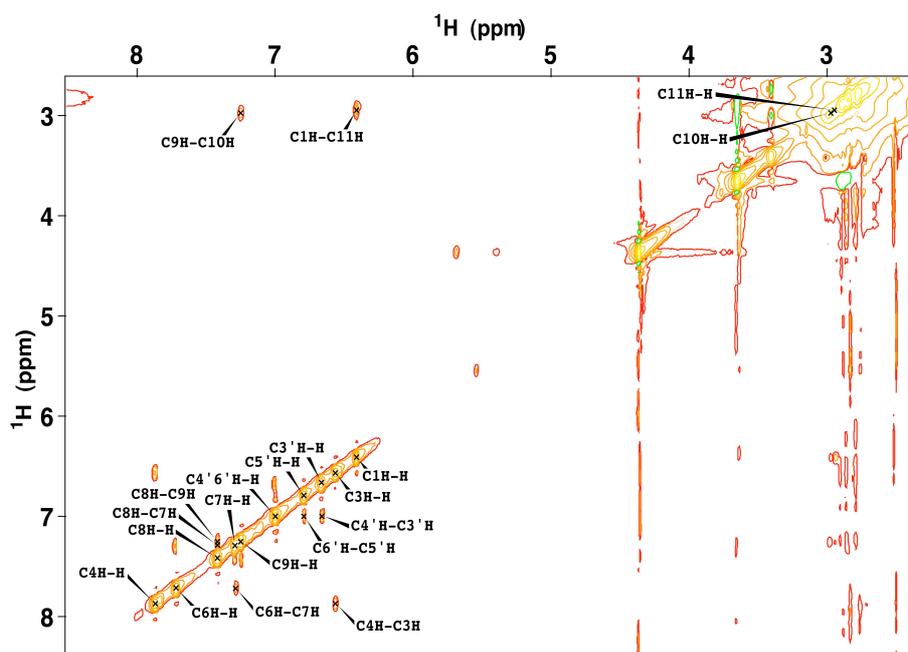


Abbildung 3.24: (^1H - ^1H)-NOESY-Spektrum von NR243. In der Diagonale des Spektrums liegen die ^1H -chemischen Verschiebungen des 1D-Spektrums, die Kreuzsignale der räumlich benachbarten Protonen befinden sich außerhalb der Diagonalen (Mischzeit 60 ms).

Die Zuordnung von NR243 nach Auswertung aller Spektren ist wie folgt: ^1H -NMR (1:1 NMR-Messpuffer : DMSO), δ in ppm: 8.14-8.12 (d, $^3J=8.47$ Hz, 1H, H⁴), 7.97 - 7.95 (d, $^3J=7.25$ Hz, 1H, H⁶), 7.67 (d, $^3J=7.36$ Hz, 1H, H⁸), 7.55 (d, $^3J=7.36$ Hz, 1H, H⁷), 7.51 (m, 1H, H⁹), 7.28 - 7.26 (m, 2H, H^{4'}, H^{6'}), 7.07 (d, $^3J=8.29$ Hz, 1H, H^{5'}), 6.97 - 6.93 (m, 1H, H^{3'}), 6.83 (d, $^3J=8.47$ Hz, 1H, H³), 6.67 (s, 1H, H¹), 3.11 (m, 2H, C¹⁰H₂), 3.05 (m, 2H, C¹¹H₂);

^{13}C -NMR, δ in ppm: 194.20 (C, C⁵), 146.90 (C, C^{11a}), 143.30 (C, C^{2'}), 142.30 (C, C^{9a}), 139.40 (C, C^{5a}), 134.04 (C, C⁴), 133.01 (C, C⁸), 130.32 (C, C⁶), 129.20 (C, C⁹), 127.60 (C, C^{6'}), 127.30 (C, C⁷), 127.10 (C, C^{4'}), 126.50 (C, C^{4a}), 125.80 (C, C^{1'}), 119.04 (C, C^{3'}), 117.10 (C, C^{5'}), 113.50 (C, C¹), 112.40 (C, C³), 36.30 (C, C¹¹), 34.40 (C, C¹⁰).

3.3.3 Klassifizierung der Inhibitoren anhand des DFG-Motivs

Vogtherr et al. (2006) charakterisierten die Bindungsart verschiedener bekannter Inhibitoren über deren Eigenschaft, Einfluss auf die Konformation des DFG-Motivs in p38 α zu nehmen. Dazu wurde nur die Aminosäure Phenylalanin in perdeutertem p38 α selektiv [^{15}N]-markiert, so dass in einem (^{15}N - ^1H)-TROSY-HSQC-Experiment nur die Amidresonanzen der Phenylalanine im Spektrum zu sehen waren. In unkomplexiertem p38 α ist die Resonanz des Phe 169 im DFG-Motiv in Lösung nicht sichtbar, da der Aktivierungsloop an der Außenseite des Proteins liegt und einen großen Bewegungsspielraum hat. Je nachdem welcher Inhibitor in der Bindetasche bindet, wechselwirkt dieser mit dem DFG-Motiv oder nicht. Gibt es Wechselwirkungen zwischen DFG-Motiv und Inhibitor wird der Aktivierungsloop in einer bestimmten Konformation fixiert und die Resonanz des Phe 169 wird im TROSY-HSQC-Spektrum sichtbar. So konnte festgelegt werden, dass SB203580 zur Gruppe der *DFG-in*-Binder gehört, da dieser keine Wechselwirkungen mit dem DFG-Motiv zeigt. Das bedeutet, dass sich das Motiv in einem konformellen Gleichgewicht zwischen seiner *DFG-in*- und *DFG-out*-Konformation befindet und die Geschwindigkeit der Konformationsänderungen des Aktivierungsloops im μs - bis ms -Bereich liegt (*intermediate exchange*; Kapitel 2.2.3.2), so dass die Resonanz des Phe 169 im Spektrum nicht zu sehen ist. Ein Inhibitor wie BIRB796 dagegen unterdrückt dieses konformelle Gleichgewicht des Aktivierungsloops, indem er mit dem DFG-Motiv wechselwirkt, und die Resonanz von Phe 169 wird im Spektrum sichtbar. Dieses Ergebnis stimmt auch mit der These überein, dass Inhibitoren, die als *DFG-in*-Binder klassifiziert werden, keinen Einfluss auf die Phosphorylierung bzw. den Übergang des Proteins in den aktiven Zustand nehmen, wobei Inhibitoren, die zu den *DFG-out*-Bindern zählen, die Phosphorylierung der Kinase verhindern.

Um nun eine Klassifizierung des neuen Inhibitors NR243 durchzuführen, wurden die Experimente von Vogtherr et al. mit den Inhibitoren SB203580 und BIRB796 reproduziert, um anschließend NR243 einer Gruppe der DFG-Binder zuordnen zu können.

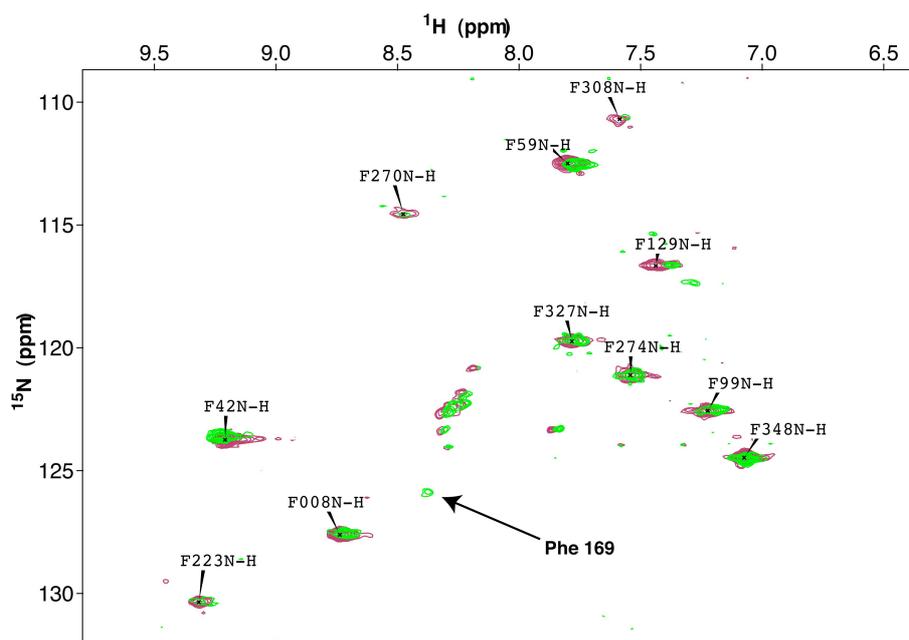


Abbildung 3.25: Überlagerung der beiden (^{15}N - ^1H)-TROSY-HSQC-Spektren von [^{15}N]-Phe-markiertem, deuteriertem p38 α im Komplex mit NR243 (rot, Konzentration von p38 α 0.9 mM, von NR243 1.5 mM) und BIRB796 (grün, Konzentration von p38 α 0.9 mM, von BIRB796 2.0 mM). Im Komplexspektrum mit BIRB796 erscheint die Resonanz von Phe 169 des DFG-Motivs.

In Abb. 3.25 ist die Überlagerung der (^{15}N - ^1H)-TROSY-HSQC-Spektren von [^{15}N]-Phe-p38 α im Komplex mit BIRB796 (grün) und NR243 (rot) gezeigt. Die zusätzlichen Signale in der Mitte des Spektrums resultieren wahrscheinlich aus einer Verstoffwechslung des markierten Phenylalanins während der Expression. Trotzdem wird im TROSY-HSQC-Spektrum von p38 α /BIRB796 ein sehr schwaches, zusätzliches Signal bei derselben chemischen Verschiebung sichtbar, die von Vogtherr et al. für die Aminosäure Phe 169 angegeben wurde. Im TROSY-HSQC-Spektrum von p38 α /NR243 ist dagegen keine Resonanz von Phe 169 zu sehen, was bedeutet, dass der Inhibitor NR243 die konformelle Freiheit des Aktivierungsloops nicht einschränkt und somit zu den *DFG-in*-Bindern gezählt werden kann.

3.4 Residuale dipolare Kopplungen (RDC)

Um konformelle Änderungen von p38 α nach Bindung eines Inhibitors zu detektieren, wurden (^{15}N - ^1H)-RDCs aufgenommen (Kapitel 2.2.3.3). Dazu wurde das [^{15}N] –markierte, perdeuterierte Protein im NMR-Messpuffer mit 20 mg/mL *Pseudomonas aeruginosa* Pf1 Phagen versetzt (Tjandra et al., 1997), da es in anderen Alignmentmedien wie der Otting-Phase (Rückert & Otting, 2000) oder dem SDS-Gel (Tycko et al., 2000) nicht stabil war. Durch Zugabe der Phagen wurde der Puffer pH auf 6 gesenkt und das D $_2$ O-Signal zeigte eine Aufspaltung von 12.8 Hz.

Es wurden jeweils ein TROSY-HSQC-Spektrum (*upfield*-Komponente) und ein HSQC-Spektrum (gemittelte *upfield/downfield*-Komponente) direkt nacheinander an einem 800 MHz Spektrometer mit 1.0 mM p38 α -Proben aufgenommen, die für die Komplexmessungen mit 2.0 mM Inhibitor versetzt waren. Diese Methode wurde statt des konventionellen IPAPs (*in phase anti phase*) aus dem Grund bevorzugt, da das HSQC-Experiment deutlich unsensitiver im direkten Vergleich zum TROSY-HSQC-Experiment war und deshalb die Messzeit des HSQC-Spektrums viermal länger gewählt wurde, um gute Spektren vergleichbarer Qualität zu erhalten.

3.4.1 Residuale dipolare Kopplungen von unkomplexiertem p38 α

Es wurden nur RDC-Werte mit einem Fehler ≤ 5 Hz für die Berechnungen herangezogen. So ergab sich für die unkomplexierte Form von p38 α eine Anzahl von 73 RDCs. Mit Hilfe des Programmes PALES (Zweckstetter & Bax, 2000) wurden die entsprechenden RDC-Werte für die Kristallstruktur von unkomplexiertem p38 α (1P38.pdb, 2.1 Å; Wang et al., 1997) berechnet und der *alignment tensor* unter Verwendung des SVD-Ansatzes (*singular value decomposition approach*) so bestimmt, dass der Unterschied zwischen den berechneten und den experimentellen Werten minimal war.

Die experimentell ermittelten RDC-Daten von unkomplexiertem p38 α verglichen mit den berechneten Werten aus der Kristallstruktur (1P38.pdb) ergaben einen Korrelationskoeffizienten von 0.94 ($Q = 0.25$). Das zeigt, dass die Konformationen der amino- und carboxyterminalen Bereiche des Proteins in Lösung der Kristallstruktur sehr ähnlich sind (Abb. 3.26).

Um einen hervorragenden Korrelationskoeffizienten zu erhalten, mussten allerdings die beiden residualen dipolaren Kopplungen von Gly 110 und Ala 111 aus den Berechnungen entfernt werden. Bei Einbeziehung dieser beiden Kopplungen in die Berechnungen, erhöhte sich der Q - Faktor von 0.25 auf 0.57, was auf eine gänzlich andere Konformation dieser beiden Aminosäuren in Lösung hinweist. Tatsächlich betrug die aus dem Kristallverband berechneten RDC-Werte der beiden Aminosäuren 21.6 Hz für Gly 110 und -16.9 Hz für Ala 111, die experimentellen RDC-Werte in Lösung dagegen lagen bei -5.9 Hz für Gly 110 und 19.6 Hz für Ala 111.

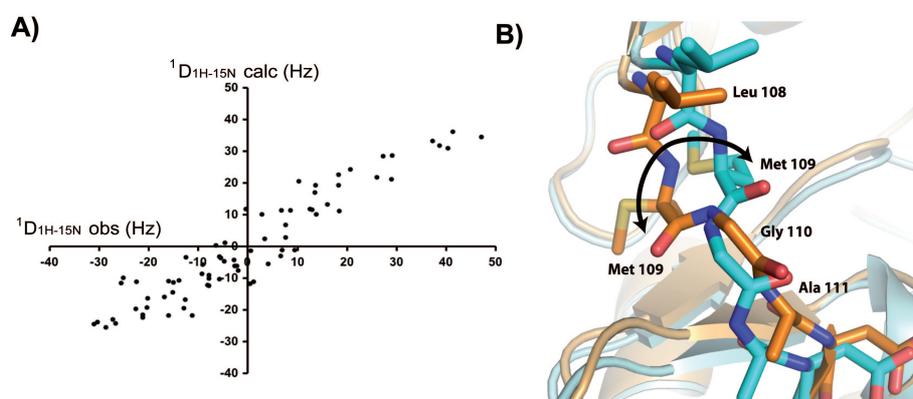


Abbildung 3.26: A) ($^1\text{H}-^{15}\text{N}$)-RDCs der freien Form von p38 α weisen verglichen mit den aus der Kristallstruktur (1P38.pdb) berechneten einen Korrelationsfaktor von 0.94 ($Q = 0.25$) auf; B) Peptid-Flip der Met 109-Gly 110-Peptidbindung bei p38 α im Komplex mit Wasserstoffbrückenakzeptoren, die mit der *Hinge Region* wechselwirken (1OVE.pdb in orange) verglichen mit der gewöhnlichen Stellung der Met 109-Gly 110-Peptidbindung in unkomplexiertem p38 α (1P38.pdb in blau).

In Abb. 3.26 ist in A) der RDC-Fit der aus der Kristallstruktur 1P38.pdb berechneten und gemessenen Werte des unkomplexierten p38 α dargestellt. In B) ist die Überlagerung der *Hinge Region* der Kristallstruktur von unkomplexiertem p38 α (1P38.pdb in blau) mit der Kristallstruktur eines p38 α -Quinazolinon-Komplexes (1OVE.pdb in orange) dargestellt. Der Inhibitor gehört zu einer Klasse, die eine Carbonylfunktion an der Stelle des Moleküls aufweist, die mit der *Hinge Region* wechselwirkt. Dieser Wasserstoffbrückenakzeptor induziert einen Peptid-Flip des Proteinrückgrats an den dihedralen Rückgratwinkeln ϕ und ψ der Aminosäuren Met 109 und Gly 110 in der Hinge Region (Fitzgerald et al., 2003). Bei Verwendung der berechneten RDCs der Hinge Region dieser Kristallstruktur (1OVE.pdb) von Fitzgerald et al. (2003) für die Ermittlung des Korrelationskoeffizienten mit PALES,

ergaben sich RDC-Werte von -7.9 Hz für Gly 110 und 22.9 Hz für Ala 111. Diese Werte lagen sehr nahe an den in Lösung gemessenen Werten und führten zu einer erstaunlich guten Korrelation mit den berechneten Werten von 0.83.

Die *Hinge Region* in unkomplexiertem p38 α zeigt also in Lösung als einen Peptid-Flip (Abb. 3.26), der sonst nur in Komplex-Kristallstrukturen mit Inhibitoren, die Wasserstoffbrückenakzeptoren in der Nähe der *Hinge Region* aufweisen, auftritt.

3.4.2 Residuale dipolare Kopplungen von Inhibitor-gebundenem p38 α

Für die beiden Komplexe p38 α /SB203580 sowie p38 α /NR243 wurden ebenfalls nur die RDCs verwendet, die einen Fehler ≤ 5 Hz aufwiesen. Das ergab für p38 α /SB203580 43 und für p38 α /NR243 45 residuale dipolare Kopplungen. Es wurde ebenfalls der *alignment tensor* unter Verwendung der Kristallstruktur 1P38.pdb des unkomplexierten p38 α mit PALES bestimmt.

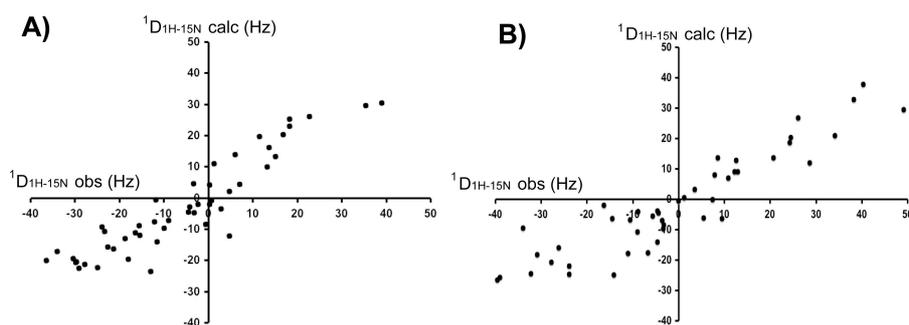


Abbildung 3.27: (^1H - ^{15}N)-RDCs des A) p38 α /SB203580-Komplexes, die einen Korrelationsfaktor von 0.92 ($Q=0.31$) zur Kristallstruktur (1P38.pdb) zeigen und des B) p38 α /NR243-Komplexes mit einem Korrelationsfaktor von 0.92 ($Q=0.35$).

In Abb. 3.27 sind die Fits der RDCs der Komplexstrukturen mit den theoretischen RDCs der Kristallstruktur 1P38.pdb dargestellt. Der Korrelationskoeffizient des Komplexes p38 α /SB203580 mit der Kristallstruktur 1P38.pdb beträgt 0.92 ($Q = 0.31$) und zeigt, dass die Konformationen der beiden amino- und carboxyterminalen Bereiche des Proteins in Lösung von der Kristallstruktur nicht signifikant abweichen. Ebenso zeigt die Komplexform p38 α /NR243 mit einem Faktor von 0.92 ($Q = 0.35$) keine wesentlichen Unterschiede zur Kristallstruktur.

Die geringe Zahl an verwendeten RDCs im Vergleich zum unkomplexierten Protein liegt einerseits an der starken Überlagerung der Resonanzen im HSQC-Spektrum andererseits an dem mittelschnellen Austausch von Rückgratprotonen und Methylgruppen im Bereich der Bindetasche. Das lässt auf ein verändertes dynamisches Verhalten der Komplexformen verglichen mit der freien Form von p38 α in Lösung schließen. Zu diesen Bereichen zählen die wichtigen Inhibitorbinderegionen, die *Hinge Region* (Thr 106 bis Ala 111), der Glycinreiche Loop (Gly 33 bis Val 38), sowie Teile der hydrophoben Tasche I (Ile 84 bis Leu 86).

3.5 Bestimmung der Inhibitorbindestellen aus NOE-Korrelationen

Eine Methode zur Messung von NOE-Korrelationen (*Nuclear Overhauser Effect*; Kapitel 2.2.3.4) zwischen p38 α und einem Inhibitor ist die selektive Markierung einer gewöhnlich protonierten Aminosäureart, die in der Bindetasche auftritt, bei vollständiger Deuterierung des restlichen Proteins, so dass die NOEs zwischen dem Inhibitor und dieser Aminosäure bestimmt werden können, um schließlich mit den vorhandenen Daten eine Modellstruktur erstellen zu können.

Die NOE-Wechselwirkungen werden gemäß ihrer Intensität in drei Klassen unterteilt (Kapitel 2.2.3.4). Je nach Intensität der Kreuzsignalresonanz wurden obere Distanzeinschränkungen für Methin-, Methylen- und Methylgruppen festgelegt (Ohlenschläger et al., 1998), die als Anhaltspunkt verwendet werden, da die für eine Intensitätsreferenzierung benötigten NOE-Korrelationen (NOEs, deren korrespondierende Abstände aufgrund der intraresidualen Topologie von Aminosäureresten, z.B. H $^{\beta_2}$ -H $^{\beta_3}$ -Abstände, H $^{\alpha}$ -H $^{\beta}$ -Abstände, H $^{\gamma_2}$ -H $^{\gamma_3}$ -Abstände, festgelegt sind) nicht vorhanden waren. Die Intensitätsreferenzierung der intermolekularen NOE-Korrelationen erfolgte über die intramolekularen NOE-Kreuzsignale der Inhibitoren im Komplex mit p38 α und durch deren Vergleich mit den intramolekularen Abständen in der SB203580-Komplexkristallstruktur (1A9U.pdb; Wang et al., 1998).

Um eindeutige Resonanzen in zweidimensionalen (^1H - ^1H)-NOESY-Spektren zu erhalten, wurden perdeuterierte, [^{15}N]-p38 α -Proben selektiv mit einer [^{15}N]-Aminosäure, die nicht deuteriert war, markiert (Kapitel 2.2.2.1).

Das verwendete Pulsprogramm enthielt einen ^{15}N -Filter (^{15}N -gefiltertes-(^1H - ^1H)-NOESY;

Anhang 5.3), um die Amidresonanzen des Proteins zu unterdrücken und so deren Auftreten im aromatischen Bereich zu verhindern.

3.5.1 NOE-Korrelationen zwischen p38 α und SB203580

Es wurden zwei [^{15}N]-markierte, perdeutериerte p38 α -Proben hergestellt, wovon die eine selektiv mit protoniertem (= nicht-deutериertem) [^{13}C , ^{15}N]-Leucin und die andere selektiv mit protoniertem [^{13}C , ^{15}N]-Threonin markiert waren (Kapitel 2.2.2.1). Auf diese Weise wurden nur NOE-Korrelationen vom Inhibitor zu den selektiv markierten Aminosäureseitenketten detektiert. Die Proteinprobe wurde mit einem geringen Überschuss an SB203580 versetzt, um das Protein vollständig abzusättigen, und bei 298 K in perdeutериertem NMR-Puffer gemessen. Um NOE-Kreuzsignale zwischen Inhibitor und Protein sichtbar zu machen, wurde für jedes NOESY-Spektrum eine Mischzeit von 500 ms bis 600 ms gewählt.

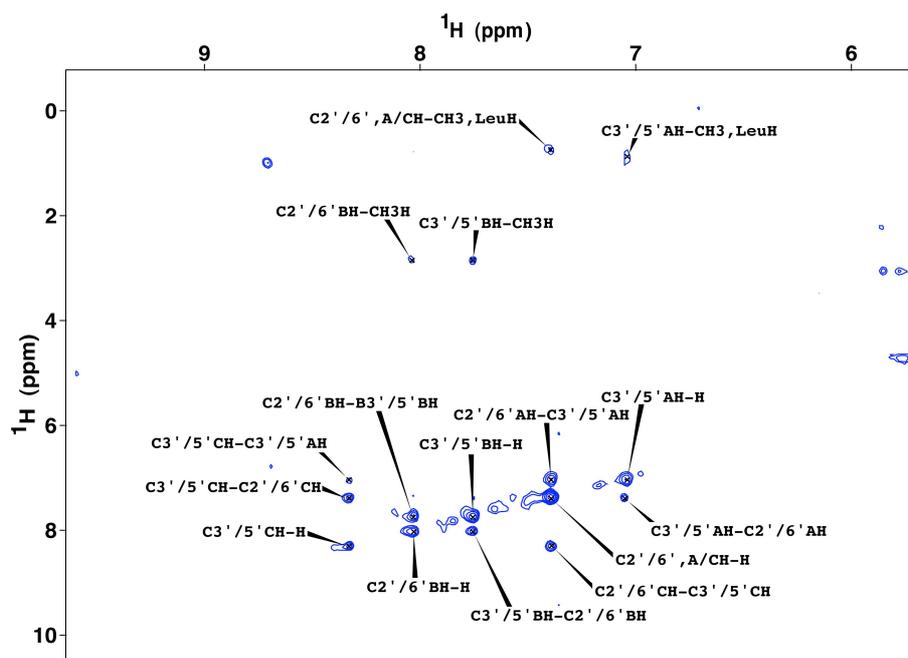


Abbildung 3.28: (^1H - ^1H)-NOESY-Spektrum von selektiv [^{13}C , ^{15}N]-markiertem, protoniertem (= nicht-deutериertem) Leucin in [^{15}N]-markiertem, perdeutериertem p38 α (Konzentration 1.2 mM) im Komplex mit SB203580 (Konzentration 1.5 mM). Im Spektrum erscheinen alle intramolekularen NOEs des Inhibitors und zwei Kreuzsignale zu Leucinmethylprotonen (Mischzeit 500 ms).

Im (^1H - ^1H)-NOESY-Spektrum (Abb. 3.28) sind alle Protonen-Signale des Inhibitors auf

der Diagonalen sichtbar. Zusätzlich sieht man alle intramolekularen Kreuzsignale von SB203580, wie die Korrelationen zwischen den C^{3'/5'}-H-Atomen und den C^{2'/6'}-H-Atomen in Ring C, den C^{3'/5'}-H-Atomen und den C^{2'/6'}-H-Atomen im A-Ring und diejenigen zwischen den C^{3'/5'}-H-Atomen und den C^{2'/6'}-H-Atomen im B-Ring. Ein sehr schwaches Kreuzsignal ist zwischen den C^{3'/5'}-H-Atomen in Ring A und den C^{3'/5'}-H-Atomen in Ring C zu sehen. Die Methylprotonen des Sulfinylrestes bilden nicht nur zu den C^{3'/5'}-H-Atomen des B-Rings ein Kreuzsignal, sondern auch zu den weiter entfernten C^{2'/6'}-H-Atomen desselben Ringes.

Desweiteren sind zwei intermolekulare Kreuzsignale von den C^{2'/6'}-H-Atomen im A- oder C-Ring und von den C^{2'/6'}-H-Atomen im A-Ring zu Leucinmethylprotonen im Spektrum zu sehen. Die ¹H-chemischen Verschiebungen in der indirekten Ebene von 0.74 ppm für die C^{2'/6'}-H-Atome im A- oder C-Ring zu Leucinmethylprotonen und 0.87 ppm für die C^{2'/6'}-H-Atome im A-Ring zu Leucinmethylprotonen zeigen, dass diese mit den chemischen Verschiebungen für H-Atome von Leucinmethylprotonen der BMRB übereinstimmen (mittlere chemische Verschiebung 0.73 - 0.75 ppm, BMRB, *biological magnetic resonance bank*, www.bmrb.wisc.edu), so dass nur die Methylprotonen der selektiv markierten Leucine der Bindetasche für die Inhibitorwechselwirkungen in Frage kommen. Ein weiteres Kreuzsignal liegt bei 8.69/0.97 ppm. Da die Diagonale bei 8.69 ppm allerdings keine Resonanz zeigt, sollte es sich bei dem Kreuzsignal um ein Artefakt handeln.

Durch Integration der intramolekularen Kreuzsignale der C^{3'/5'}-H-Atome und C^{2'/6'}-H-Atome im A-Ring, der C^{3'/5'}-H-Atome und C^{2'/6'}-H-Atome im B-Ring sowie der C^{3'/5'}-H-Atome und C^{2'/6'}-H-Atome im C-Ring wurden deren Intensitäten bestimmt. Der theoretische Abstand zweier aromatischer Ringprotonen beträgt 2.47 Å. Mit diesen Werten wurde eine mittlere Referenzierungskonstante bestimmt, mit deren Hilfe man aus den Intensitäten der intermolekularen Kreuzsignale die Abstände der Leucinmethylprotonen zu den Inhibitorprotonen berechnen kann (Kapitel 2.2.3.4). Dadurch konnte eine obere Distanzeinschränkung für die Protonen, die ein intermolekulares Kreuzsignal zeigen, bestimmt werden.

Es ergibt sich eine obere Distanzeinschränkung von ca. 2.70 Å für den Abstand der aromatischen Protonen des Inhibitors zu den Methylprotonen der Leucine. Die Leucinmethylprotonen, die diese Distanzeinschränkung zu den C^{2'/6'}-H-Atomen im A- oder C-Ring und den C^{3'/5'}-H-Atomen im A-Ring erfüllen, gehören zu den Leucinen 75 und

104 in der hydrophoben Tasche I. Aus der Kristallstruktur 1A9U.pdb (p38 α in Komplex mit SB203580, Wang et al., 1998) kann man entnehmen, dass die Methylprotonen des Leu 75 ca. 2.1 Å von den C^{3'/5'}-H-Atomen des A-Rings und ca. 2.8 Å von den C^{2'/6'}-H-Atomen des A-Rings entfernt liegen. Die Methylprotonen des Leu 104 liegen dagegen zwischen 3.1 und 3.6 Å von diesen vier aromatischen Inhibitorprotonen entfernt. Damit steht fest, dass die C^{2'/6'}-H-Atome des C-Rings zu weit von den Leucinmethylprotonen entfernt liegen, um für NOE-Wechselwirkungen in Frage zu kommen, und die Kreuzsignale im Spektrum nur für NOE-Korrelationen der Leucinmethylprotonen mit den C^{2'/6'}-H-Atomen des A-Ringes stehen. Da die chemischen Verschiebungen der C^{2'/6'}-H-Atome des A- und des C-Ringes gleich sind, konnte diese Unterscheidung in den bisher vorgestellten Spektren nicht getroffen werden.

Die auf der Diagonale im aromatischen Bereich liegenden zusätzlichen Resonanzen können aufgrund der schwachen Intensitäten und fehlenden Kreuzsignale nicht zugeordnet werden. Sie gehören wahrscheinlich zu anderen Konformationen des Inhibitors in der Bindetasche, die nur zu einem geringen Prozentsatz auftreten, da sie eventuell energetisch ungünstiger sind, aber dennoch aufgrund der Dynamik der Bindetasche existieren.

Bei einem Vergleich der chemischen Verschiebungen des gebundenen Inhibitors mit denjenigen des freien ergibt sich, dass alle Protonenresonanzen während der Bindung des Inhibitors an das Protein zu höherem Feld verschoben werden. Dabei werden die chemischen Verschiebungen der Protonen des B-Rings mit durchschnittlich 0.21 ppm weniger stark zu höherem Feld verschoben als die der Protonen des A-Rings (durchschnittlich 0.32 ppm), der in die hydrophobe Tasche I zeigt. Die Protonen des C-Ringes werden ebenfalls stärker von der Bindung beeinflusst (durchschnittliche Änderung der chemischen Verschiebungen 0.25 ppm) als die Protonen des B-Rings, wenn gleich weniger stark im Vergleich zu den Protonen des A-Rings.

Bei der [¹³C, ¹⁵N]-markierten, protonierten (= nicht-deutertem) Threonin-p38 α -Probe sollte nur Thr 106 der *Hinge Region*, das benachbart zum Inhibitor liegt, über die Methylgruppen NOEs zu SB203580 ausbilden. Die Konzentration der Proteinprobe betrug 1.6 mM, die des Inhibitors SB203580 2.5 mM und die Probe wurde bei 298 K in perdeutertem NMR-Puffer gemessen.

In Abb. 3.29 ist das (¹H-¹H)-NOESY-Komplexspektrum mit selektiv protoniertem Threonin gezeigt. Im Vergleich zum selektiv protonierten Leucin-Komplexspektrum sind weniger intramolekulare Kreuzsignale und weniger gut separierte Diagonalsignale des Inhibitors

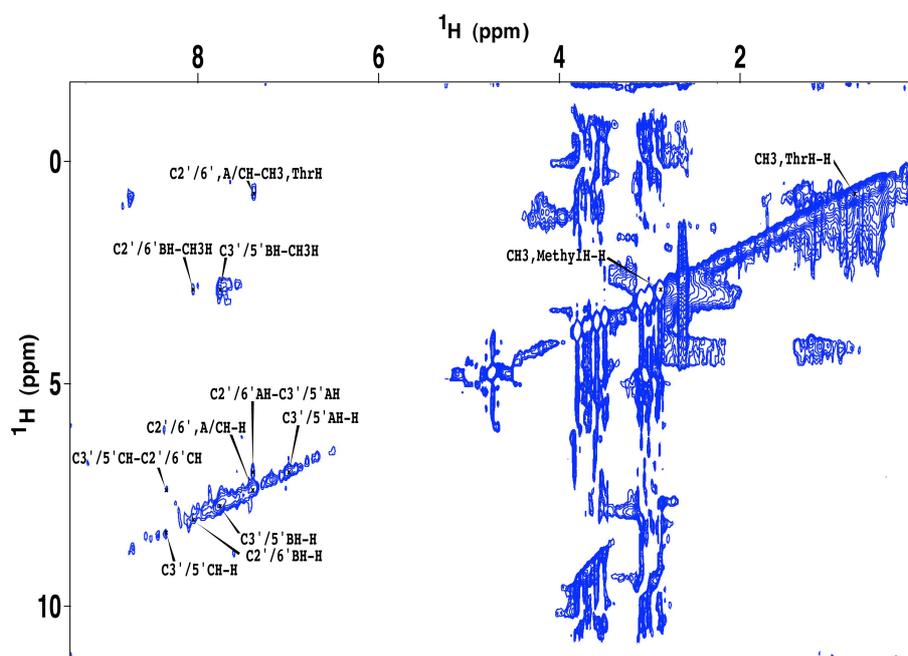


Abbildung 3.29: (^1H - ^1H)-NOESY-Spektrum von selektiv [^{13}C , ^{15}N]-markiertem, protoniertem Threonin in [^{15}N]-markiertem, perdeutertem p38 α (Konzentration 1.6 mM) im Komplex mit SB203580 (Konzentration 2.5 mM). Im Spektrum ist ein Kreuzsignal zu den Threoninmethylprotonen sichtbar, aber es sind nicht alle intramolekularen NOEs des Inhibitors vorhanden (Mischzeit 600 ms, Scanzahl 912).

zu sehen. Die Kreuzsignale zwischen den Sulfinylmethylprotonen und den vier Protonen des B-Rings sind stärker ausgeprägt, während die Kreuzsignale der $\text{C}^{3'}/5'$ -H-Atome zu den $\text{C}^{2'}/6'$ -H-Atomen des C-Rings oder der $\text{C}^{2'}/6'$ -H-Atome zu den $\text{C}^{3'}/5'$ -H-Atomen des A-Rings schwache Intensitäten aufweisen. Das Threonin-markierte Komplexspektrum wurde mit einer Mischzeit von 600 ms aufgenommen, während das Leucin-markierte Komplexspektrum mit 500 ms aufgenommen wurde. Die Mischzeiten bei NOESY-Spektren von Protein-Ligandkomplexen lassen sich auf einer Skala von 40 - 700 ms variieren. Je länger die Mischzeit ist, desto weiter ist die Relaxation des niedermolekularen Liganden fortgeschritten. Bei 500 ms sind im Leucin-markierten Komplexspektrum noch intramolekulare Kreuzsignale zu sehen, da SB203580 noch nicht vollständig relaxiert ist. Bei 600 ms ist dies jedoch nicht mehr der Fall, da kaum mehr intramolekulare Kreuzsignale zu beobachten sind. Wird eine längere Mischzeit gewählt, erhöht sich die Intensität der intermolekularen Kreuzsignale aufgrund der längeren Übertragung der Magnetisierung vom Protein zum Inhibitor, was für die Bestimmung der Protein-Inhibitor-Wechselwirkungen

von Vorteil ist. Allerdings führen auch unterschiedliche Protein- und Inhibitorkonzentrationen der Proben zu einem Unterschied in den beiden Spektren.

Die ^1H -chemische Verschiebung in der indirekten Ebene für das Kreuzsignal der $\text{C}^{2'}/6'$ -H-Atome im A- oder C-Ring zu Methylprotonen des Thr 106 beträgt 0.73 ppm. Diese chemische Verschiebung liegt zwar im Bereich der chemischen Verschiebungen der Protonen von Threonin-Methylgruppen (BMRB, mittlere chemische Verschiebung 1.17 ppm), aber am Unterschied der ppm-Werte wird deutlich, dass die Bindung des Inhibitors einen starken Einfluss auf die Protonen der Threoninmethylgruppe hat.

Da die intramolekularen Kreuzsignale in diesem Spektrum sehr schwach sind und die Berechnung der Intensitäten einen großen Fehler aufweist, konnte keine obere Distanzeinschränkung bestimmt werden. In der Kristallstruktur 1A9U.pdb zeigen die Threoninmethylprotonen einen durchschnittlichen Abstand von nur 2.7 \AA zu den Protonen des A-Rings und 3.1 \AA zu denjenigen des C-Rings. Das bedeutet, dass die Protonen $\text{H}^{2'}$ des A-Rings und $\text{H}^{6'}$ des C-Rings, die sich gegenüberliegen, NOEs zu den Methylprotonen des Thr 106 ausbilden können.

Vergleicht man nun die chemischen Verschiebungen der Protonen des Inhibitors im gebundenen und im freien Zustand, ist das Ergebnis äquivalent zu dem bereits im selektiv Leucin protonierten Komplexspektrum gefundenen Resultat. Die Protonenresonanzen werden durch Bindung des Inhibitors an das Protein zu höherem Feld verschoben, wobei die Protonen des B-Rings weniger stark, die des C-Rings stärker und die des A-Rings am stärksten beeinflusst werden.

3.5.2 NOE-Korrelationen zwischen p38 α und NR243

Es wurden drei [^{15}N]-markierte, perdeuterierte p38 α -Proben hergestellt, wovon eine selektiv protoniertes (= nicht-deuteriertes), [^{13}C , ^{15}N]-markiertes Leucin, die zweite selektiv protoniertes, [^{13}C , ^{15}N]-markiertes Threonin und die dritte selektiv protoniertes, [^{13}C , ^{15}N]-markiertes Tyrosin enthielt (Kapitel 2.2.2.1).

Die Konzentration der selektiv protonierten Leucin-Probe betrug 1.2 mM und wurde mit 2.0 mM NR243 versetzt. Das Protein wurde zwar mit einem geringen Überschuss an Inhibitor versetzt, um dieses vollständig abzusättigen, allerdings war kein freier Inhibitor in Lösung vorhanden, da dieser in wässriger Umgebung nicht löslich war. Die Probe musste abzentrifugiert werden, bevor sie gemessen werden konnte, da nach Zugabe des Inhibitors

NR243 geringe Mengen an Niederschlag sichtbar waren. Die Probe wurde bei 298 K in perdeutertem NMR-Puffer gemessen. Bei jeder Aufnahme eines NOESY-Spektrums wurde eine Mischzeit von 600 ms gewählt.

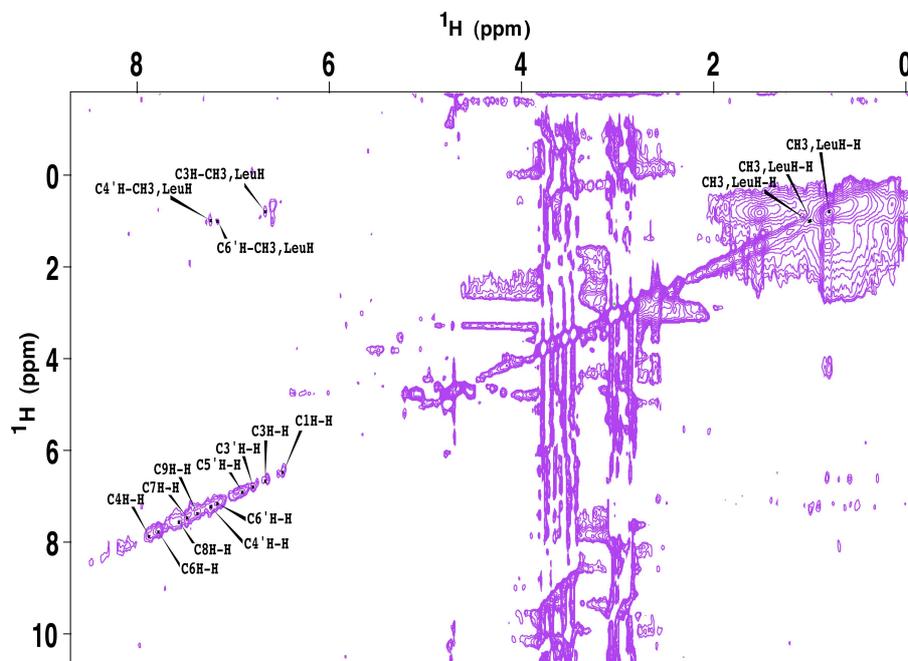


Abbildung 3.30: (^1H - ^1H)-NOESY-Spektrum von selektiv [^{13}C , ^{15}N]-markiertem, protoniertem (= nicht-deutertem) Leucin in [^{15}N]-markiertem, perdeutertem p38 α (Konzentration 1.2 mM) im Komplex mit NR243 (Konzentration 2.0 mM). Im Spektrum sind drei Kreuzsignale zu Leucinmethylprotonen sichtbar.

In Abb. 3.30 ist das (^1H - ^1H)-NOESY-Spektrum des selektiv Leucin-protonierten p38 α im Komplex mit NR243 dargestellt. Die Zuordnung der Diagonalsignale des Inhibitors war aufgrund von Überlagerung und fehlender intramolekularer Kreuzsignale im Gegensatz zu dem p38 α /SB203580-Komplex schwieriger, konnte jedoch durch Vergleich des NOESY-Spektrums des ungebundenen Inhibitors und Aufnahme einer Reihe von (^1H - ^1H)-NOESY-Spektren des Komplexes mit unterschiedlichen Mischzeiten (60 - 600 ms) durchgeführt werden.

Es wurden drei Kreuzsignale zwischen Inhibitor- und Leucinmethylprotonen zugeordnet, die von den Atomen C^3H , $\text{C}^{4'}\text{H}$ und $\text{C}^{6'}\text{H}$ zu Methylprotonen gebildet werden und eine chemische Verschiebung von 0.80 - 1.00 ppm in der indirekten Ebene aufweisen. Diese chemischen Verschiebungen stimmen mit den chemischen Verschiebungen der Protonen von

Leucinmethylgruppen überein (BMRB).

Da in diesem Spektrum keine intramolekularen Kreuzsignale zu sehen sind, da bei 600 ms die Relaxation des Inhibitors bereits weiter fortgeschritten ist, konnte eine obere Distanzeinschränkung von NR243 zu den Leucinmethylprotonen nicht berechnet werden. Allerdings sind für Wechselwirkungen mit dem Inhibitor wie bei SB203580 nur die Leucine in der hydrophoben Tasche I (Leu 75, Leu 86 und Leu 104) in Betracht zu ziehen, da die Seitenketten der übrigen Leucine in der Bindetasche entweder unzugänglich oder zu weit entfernt liegen.

Vergleicht man nun die chemischen Verschiebungen des Protein-gebundenen und freien Zustands des Inhibitors, ergibt sich eine geringe Verschiebung der Resonanzen des gebundenen Inhibitors zu höherem Feld, wobei die Protonenresonanzen des C⁶-C⁹-Rings eine geringere Verschiebung aufweisen (0.08 - 0.19 ppm) als die Protonen der C^{3'}-C^{6'}- und C³/C⁴-Atome (0.10 - 0.25). Das bedeutet, dass die Protonen des Amino-Phenylaminrings sowie des benachbarten Rings von der Bindung zum Protein stärker beeinflusst werden als die des C⁶-C⁹-Rings.

Eine zweite p38 α -Probe, die ebenfalls perdeutert und uniform [¹⁵N]-markiert hergestellt wurde, wurde mit protoniertem [¹³C, ¹⁵N]-Threonin markiert, um im (¹H-¹H)-NOESY-Spektrum eventuelle Kreuzsignale zwischen dem Inhibitor und dem einzigen Threonin in der Bindetasche (Thr 106 in der *Hinge Region*) zu zeigen.

In Abb. 3.31 ist das (¹H-¹H)-NOESY-Spektrum des selektiv Threonin-markierten p38 α im Komplex mit NR243 gezeigt. Die Zuordnung der Diagonalsignale erfolgte durch Vergleich mit dem NOESY-Spektrum des selektiv protonierten Leucin p38 α /NR243-Komplexes. Zwischen den Protonen C^{6'}H des Amino-Phenylaminrings und C³H des benachbarten Rings tritt eine NOE-Wechselwirkung auf, die im zuvor gezeigten NOESY-Spektrum nicht zu beobachten war (Abb. 3.30). Das kann an der unterschiedlichen Konzentration der beiden Proteinproben liegen. Dieses Kreuzsignal legt die Konformation des Amino-Phenylaminringes in Bezug auf das übrige Molekül fest. Ein weiteres Kreuzsignal tritt zwischen einem Inhibitorproton (C^{4'}H) und den Protonen der Threoninmethylgruppe auf. Die ¹H-chemische Verschiebung des Kreuzsignals (0.73 ppm) entspricht den chemischen Verschiebungen der Protonen einer Threoninmethylgruppe (BMRB).

Durch das Auftreten des intramolekularen Kreuzsignals lässt sich eine obere Distanzeinschränkung zu der Methylgruppe des Thr 106 bestimmen. Die H-Atome des C³- und C^{6'}-Atoms besitzen einen Abstand von bis zu 2.1 Å je nach Torsion der Ringe zueinander. Mit

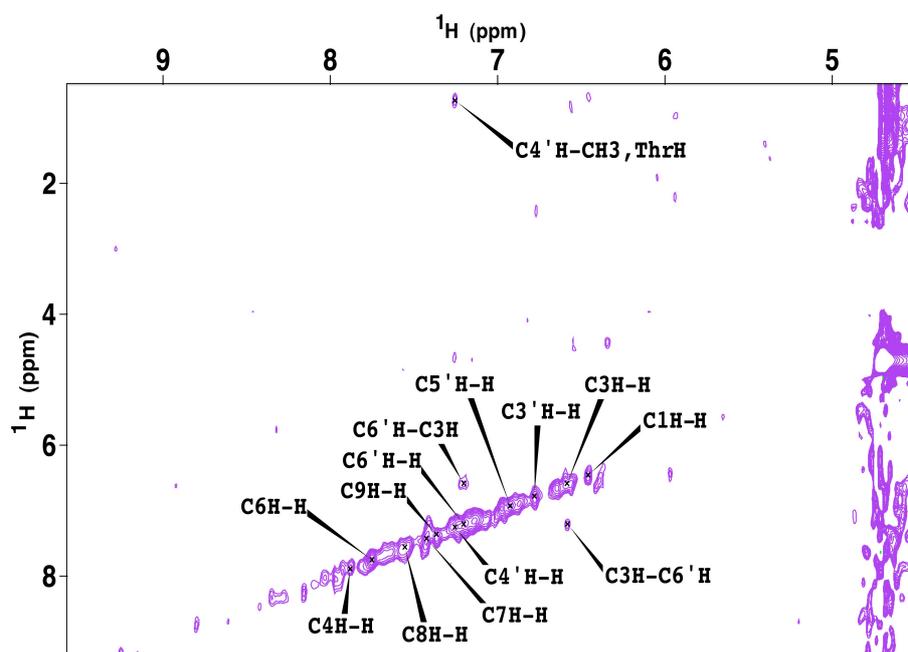


Abbildung 3.31: (^1H - ^1H)-NOESY-Spektrum von selektiv [^{13}C , ^{15}N]-markiertem, protoniertem Threonin in [^{15}N]-markiertem, perdeutertem p38 α (Konzentration 1.6 mM) im Komplex mit NR243 (Konzentration 2.0 mM). Im Spektrum ist ein Kreuzsignal zu Threoninmethylprotonen sichtbar.

Hilfe des Intensitätenvergleichs ergibt sich ein Abstand von circa 2.80 Å des $\text{C}^{4'}$ -H-Atoms zu den Methylprotonen des Thr 106.

Bei Vergleich der chemischen Verschiebungen des unkomplexierten und Inhibitor-gebundenen Zustandes ergeben sich dieselben Änderungen wie für den selektiv Leucin-protonierten p38 α /NR243-Komplex.

Um NOE-Wechselwirkungen zwischen Protein und dem C^6 - C^9 -Ring des Inhibitors zu beobachten, wurde eine selektiv protonierte, [^{13}C , ^{15}N]-markierte Tyrosin p38 α -Probe hergestellt. Das einzige Tyrosin, das in der Bindetasche des Proteins liegt ist Tyr 35 im Glycin-reichen Loop. Die Konzentration der Proteinprobe betrug 1.5 mM und wurde mit 2.0 mM NR243 versetzt. Sie wurde bei 298 K in perdeutertem NMR-Puffer gemessen. Das (^1H - ^1H)-NOESY-Spektrum zeigt die Resonanzen der aliphatischen und aromatischen Protonen der Tyrosine, wodurch die Resonanzen des Inhibitors, die eine sehr ähnliche chemische Verschiebung haben, überlagert werden. Chemische Verschiebungen der aromatischen Tyrosinprotonen liegen zwischen 6.23 und 7.36 ppm (BMRB) und stimmen mit den gemessenen chemischen Verschiebungen überein (6.48-7.24). Die chemischen

Verschiebungen der H^β -Protonen liegen gemäß BMRB zwischen 2.8 und 2.9 ppm, was ebenfalls mit den gemessenen Werten übereinstimmt. Es erscheinen Kreuzsignale zwischen den H^β - und den H^δ - sowie H^ϵ -Protonen mit einer Verschiebung von 2.8 ppm in der indirekten Dimension (y-Achse des Spektrums) über einen Bereich von 6.64 - 7.18 ppm in der direkten Dimension (x-Achse des Spektrums).

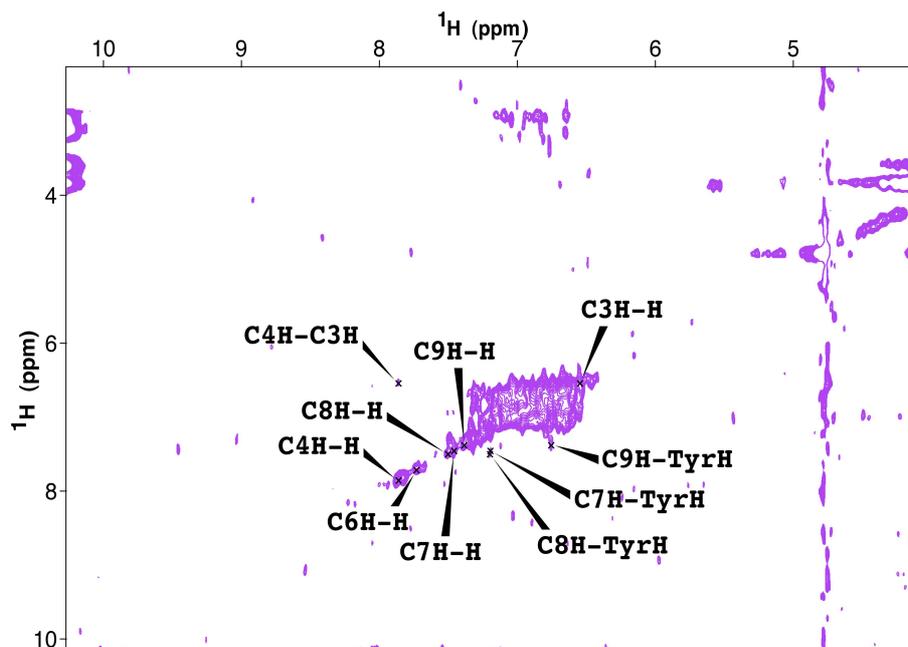


Abbildung 3.32: (^1H - ^1H)-NOESY-Spektrum von selektiv [^{13}C , ^{15}N] markiertem, protoniertem Tyrosin in [^{15}N]-markiertem, perdeutertem p38 α (Konzentration 1.5 mM) im Komplex mit NR243 (Konzentration 2.0 mM). Im Spektrum sind Kreuzsignale zu Tyrosinprotonen sichtbar.

In Abb. 3.32 ist das (^1H - ^1H)-NOESY-Spektrum des selektiv Tyrosin-markierten p38 α im Komplex mit NR243 dargestellt. Die Resonanzen des Amino-Phenylaminrings werden von den Resonanzen der aromatischen Tyrosinprotonen überlagert, so dass nur noch die Protonen des C^6 - C^9 -Phenylrings durch Vergleich der chemischen Verschiebungen mit den beiden zuvor aufgenommenen NOESY-Spektren zugeordnet werden konnten. Es sind Kreuzsignale der H^δ -Phenylprotonen des Tyrosins zu den C^7H - und C^8H -Atomen des Phenylrings und ein Kreuzsignal zwischen dem C^9H -Atome und den H^ϵ -Phenylprotonen des Tyrosins sichtbar. Zusätzlich gibt es ein intramolekulares Kreuzsignal zwischen den C^4H - und C^3H -Atomen des zentralen Aminophenylrings des Inhibitors.

Da in diesem Spektrum nur ein intramolekulares Kreuzsignal zuzuordnen ist, würde die

Berechnung einer oberen Distanzeinschränkung von NR243 zu den aromatischen Tyrosinprotonen einen zu großen Fehler aufweisen. Die chemischen Verschiebungen des gebundenen im Vergleich zu freiem Inhibitor sind in gleicher Weise zu höherem Feld verschoben wie in den bereits vorgestellten NOESY-Spektren.

3.6 HADDOCK als Docking-Werkzeug zur Darstellung des p38 α /NR243-Komplexes

Das Programm HADDOCK 2.0 (*High Ambiguity Driven Biomolecular Docking*; Dominguez et al., 2003) wurde für die Modellierung des p38 α -NR243-Komplexes ausgewählt. Die Koordinaten für p38 α wurden aus der Proteindatenbankdatei 1P38.pdb der Kristallstruktur von unkomplexiertem p38 α herangezogen. Die Geometrie des Inhibitors NR243 wurde mit *InsightII* erstellt und anschließend einem kurzen Minimierungsprotokoll in *Discover* unterzogen (Hill & Sauer, 1994; Hwang et al. 1994; Maple et al. 1994). Dann wurden die Parameter- und Topologiedaten mit Hilfe des PRODRG2-Servers generiert (Schüttelkopf & van Alten, 2004). Das Dockingprotokoll wurde nach Festlegung von *ambiguous interaction restraints* (AIR) durchgeführt. Als AIRs wurden die Reste definiert, die in den NOESY-Spektren Kreuzsignale zu dem Inhibitor zeigten und somit für eine Wechselwirkung mit NR243 in Frage kommen, wie Tyr 35, Thr 106, Leu 75, Leu 86 und Leu 104. Als Distanzeinschränkung wurden 3.5 Å gewählt und die Reste Leu 75, Leu 86 und Leu 104 als absolut flexibel definiert. Die Distanzeinschränkungen legten einen maximalen Abstand von 3.5 Å zwischen den C³-H-, C^{4'}-H- und C^{6'}-H-Atomen und den Seitenketten der Leucine 75, 86 und 104, zwischen dem C^{4'}-H-Atom und den Methylprotonen von Thr 106 sowie zwischen den C⁷-H- und C⁹-H-Atomen und dem Phenylring von Tyr 35 fest. Bei Berechnungen, in denen der Inhibitor als rigides Molekül behandelt wurde, konnten keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden, deshalb wurde NR243 in zwei Fragmente zerlegt (der Amino-Phenylring wurde vom restlichen Molekül separiert), die beide in sich starr aber zueinander als flexibel definiert wurden. In Tab. 3.3 sind die einzelnen Schritte des Docking-Protokolls aufgeführt.

Tabelle 3.3: Docking-Protokoll mit folgenden Docking-Parametern: *semi-ambiguous restraints* sind 35, 75, 86, 104, 106, flexible Reste sind 75, 86, 104. MD = *molecular dynamics*, SA = *semi flexible annealing*, TA = *torsion angle space*, CA = *cartesian space*

| Läufe | Art des Laufs | Schritte | Temperatur (K) | Raum | Rückgrat | Seitenketten | Ligand |
|-------|--------------------|----------|----------------|------|----------|--------------|----------|
| 1000 | Minimierung | - | - | - | rigide | rigide | rigide |
| 300 | MD | 500 | 2000 | TA | rigide | rigide | rigide |
| 300 | SA | 500 | 2000 bis 50 | TA | rigide | rigide | rigide |
| 300 | SA | 2000 | 1000 bis 50 | TA | rigide | flexibel | flexibel |
| 300 | SA | 2000 | 1000 bis 50 | TA | flexibel | flexibel | flexibel |
| 1000 | Wasserverfeinerung | - | - | CA | flexibel | flexibel | flexibel |

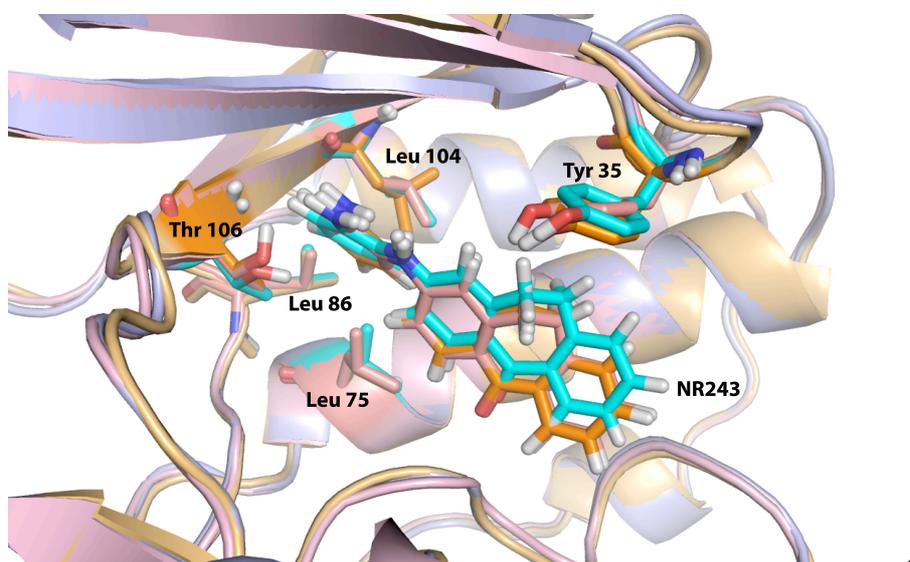


Abbildung 3.33: Die drei besten Modellstrukturen des Komplexes p38 α /NR243 nach Docking unter Verwendung der NOE-Daten. Die Abstände der Aminosäureseitenketten von Thr 106, Leu 75 und Leu 86 liegen zwischen 2.0 und 3.0 Å von den in NOESY-Spektren interagierenden Inhibitorprotonen entfernt.

Aus den Docking-Berechnungen gingen 80 Strukturen hervor, von denen die besten 40 nach dem letzten Schritt der Wasserverfeinerung, der eine Verfeinerung der Strukturen in einer Lösungsmittelschicht zur Verbesserung der *Scoring*-Funktion beinhaltet, analysiert und anhand ihres *HADDOCK-scores* eingestuft wurden. Die drei besten Strukturen wurden als Repräsentanten der Strukturguppe ausgesucht und sind in Abb. 3.33 gezeigt.

In Abb. 3.33 ist eine Überlagerung der drei besten Docking-Strukturen zu sehen. Die Distanzen der C³-H-, C^{4'}-H- und C^{6'}-H-Atome des Inhibitors zu den Protonen der Aminosäureseitenketten von Thr 106, Leu 75 und Leu 86 liegen zwischen 2.0 und 3.0 Å. Das be-

deutet, dass die Abstände den berechneten oberen Distanzeinschränkungen damit genügen und das Docking-Modell mit den experimentellen Randbedingungen im Einklang steht. In Abb. 3.34 ist das Stereobild der Überlagerung der Komplexstrukturen zur besseren Verdeutlichung gezeigt.

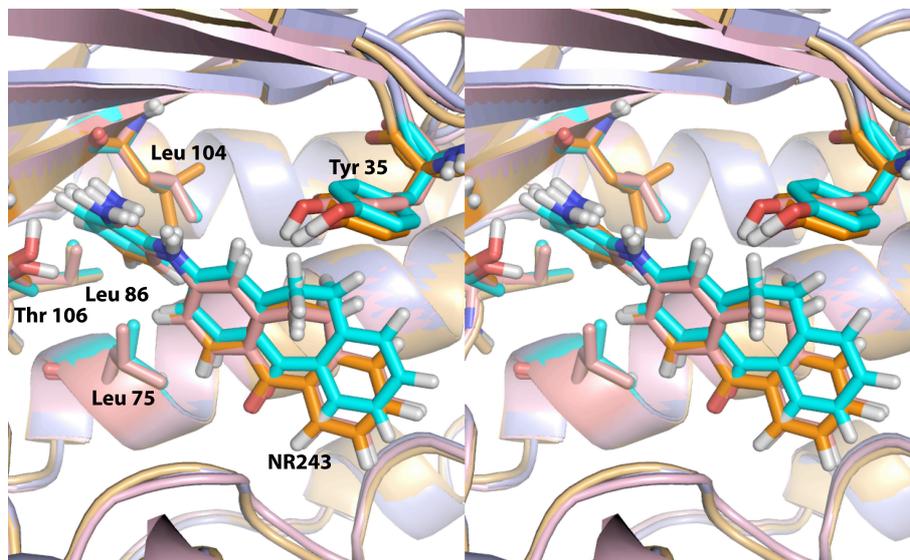


Abbildung 3.34: Die drei besten Modellstrukturen des Komplexes p38 α /NR243 nach Docking unter Verwendung der NOE-Daten. Die Abstände der Protonen der Aminosäureseitenketten von Thr 106, Leu 75 und Leu 86 liegen zwischen 2.0 und 3.0 Å von den in den NOESY-Spektren interagierenden Inhibitorprotonen entfernt.

Kapitel 4

Diskussion

In dieser Arbeit wurde mittels mehrdimensionalen, heteronuklearen NMR-spektroskopischen Methoden gezeigt, dass ohne vollständige Resonanzzuordnung eine Protein-Inhibitor-Komplexstruktur gelöst werden kann. Außerdem lassen sich interessante Schlüsse über das dynamische Verhalten von p38 α /Inhibitor-Komplexen ziehen, die neue Erkenntnisse im Bereich der Struktur-Wirkungsbeziehung von Protein-Inhibitor-Komplexen liefern könnten.

4.1 Optimierung der Proteinreinigung der p38 α MAP-Kinase

Die Strukturbestimmung eines Proteins oder eines Protein-Inhibitor-Komplexes mittels NMR-Spektroskopie setzt die Produktion ausreichender Mengen jenes Proteins in hoher Reinheit voraus.

Die für p38 α kodierende DNA wurde von Prof. T. Stehle im pET15b-Vektor zu Verfügung gestellt. Aus Kosten- und Effizienzgründen wurde die für p38 α kodierende DNA in den pET16b-TEV-Vektor kloniert, der die DNA eines His₇-Tags mit TEV-Protease-Schnittstelle enthält. Die Expression des Proteins erfolgte nach Diskin et al. (2007) nach Induktion ($OD_{600} \approx 0.48$) bei 25 °C, um den Heterogenitätslevel, also den unterschiedlichen Phosphorylierungszustand verschiedener Proteinmoleküle, auf ein Minimum zu reduzieren. Um die Heterogenität noch weiter zu senken wurde p38 α mit der Phosphatase YopH ko-exprimiert, so dass sich die Homogenität des unphosphorylierten Proteins weiter erhöhte

(Kapitel 3.1).

Das Aufreinigungsprotokoll wurde nach Bukhtiyarova et al. (2004) mit einer Abspaltung des His₇-Tags und einer Größenausschlusschromatographiesäule modifiziert, so dass eine Ausbeute von 23 mg Protein pro Liter Expressionskultur mit einer Reinheit ≥ 98 % erreicht werden konnte.

Da sich die Qualität der Proteinspektren durch Perdeuterierung des Proteins entscheidend verbessern lässt (Gardner & Kay, 1998), wurde die Expression von p38 α in perdeutertem M9-Minimalmedium durchgeführt. Für die selektive Markierung der Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Phenylalanin oder Tyrosin wurde zunächst der auxotrophe Expressionsstamm DL31(DE3) verwendet. Da allerdings bei dieser Methode alle Aminosäuren einzeln zum Medium gegeben werden müssen, ist eine Seitenkettendeuterierung nicht möglich. Bei Hajduk et al. (2004) ist eine Methode für die selektive Markierung bzw. Protonierung von Aminosäuren beschrieben, die es erlaubt, den BL21(DE3)-Expressionstamm zu verwenden, ohne eine Verstoffwechslung der Aminosäuren befürchten zu müssen. Dabei werden 100 mg der markierten Aminosäure eine Stunde vor Induktion direkt zur Expressionslösung gegeben. Das bedeutet, dass eine vollständige Perdeuterierung des Proteins bei selektiver Protonierung einer Aminosäure durchgeführt werden kann, was für die Herstellung der Proben zur Messung von NOESY-Spektren sehr wichtig war. Deshalb wurde bei erforderlicher Perdeuterierung des Proteins die selektive Markierung nach dieser Methode durchgeführt (Kapitel 3.1.2.2).

4.2 Spezifische Resonanzzuordnung der freien sowie Inhibitor-gebundenen p38 α -Formen

4.2.1 Vollständigkeit der Resonanzzuordnungen von unkomplexiertem p38 α

Vogtherr et al. (2005) veröffentlichten eine Resonanzzuordnung für Maus-p38 α . Das Konstrukt beinhaltet die Reste 2 - 349 und es wurden 3D-heteronukleare NMR-Experimente mit uniform markiertem Protein und 2D-heteronukleare Experimente mit uniform und selektiv markiertem Protein aufgenommen. Distanzinformationen wurden mit einem paramagnetischen Adenosinderivat-Tag bestimmt. Es wurden 254 der 337 theoretisch sichtbaren Signale beobachtet, wovon 216 der Rückgrat- und C $^{\beta}$ -chemischen Verschiebungen den entsprechenden Aminosäuren zugeordnet werden konnten.

Ein (^{15}N - ^1H)-TROSY-HSQC-Spektrum von unkomplexiertem, unphosphoryliertem, menschlichem p38 α zeigt 265 von 342 möglichen Resonanzen. Der Unterschied zwischen menschlichem p38 α und Maus-p38 α besteht nur in zwei Aminosäuren, nämlich Leu 48 im β_3 -Strang und Thr 263 in der α_{2L14} -Helix die bei Maus-p38 α His 48 und Ala 263 sind.

Eine Resonanzzuordnung des Proteinrückgrats wurde unter Verwendung der veröffentlichten Zuordnung durchgeführt, wobei außer einem (^{15}N - ^1H)-TROSY-HSQC- und TROSY-HNCA-Spektrum von uniform [^{13}C , ^{15}N]-markiertem, perdeutertem Protein auch (^{15}N - ^1H)-TROSY-HSQC- und HN(CO)-Spektren von selektiv markierten Proben aufgenommen wurden. Durch die $\text{H}^N\text{C}_i^\alpha$ - $\text{H}^N\text{C}_{i-1}^\alpha$ -Konnektivitäten im TROSY-HNCA-Spektrum von uniform markierten Proteinproben konnte ein Großteil der Resonanzen im (^{15}N - ^1H)-TROSY-HSQC-Spektrum zugeordnet werden.

Um eine eindeutige Zuordnung der *Hinge Region* vornehmen zu können, die eine sehr wichtige Inhibitorbindestelle darstellt, wurden perdeuterte Proteinproben hergestellt, die mit zwei in dieser Region sequentiell aufeinanderfolgenden Aminosäuren selektiv markiert wurden (^{13}C , ^{15}N]-Histidin/ ^{15}N]-Leucin, [^{13}C , ^{15}N]-Leucin/ ^{15}N]-Methionin und [^{13}C , ^{15}N]-Methionin/ ^{15}N]-Glycin). Durch selektive Markierung des Proteins zeigten (^{15}N - ^1H)-TROSY-HSQC-Spektren weniger Resonanzüberlagerung und HN(CO)-Spektren nur die Kreuzsignale von jeweils zwei sequentiell direkt aufeinanderfolgenden markierten Aminosäuren. Dadurch konnte eine Zuordnung von 70.5 % der sichtbaren Resonanzen erreicht werden (Kapitel. 3.2.1.1)

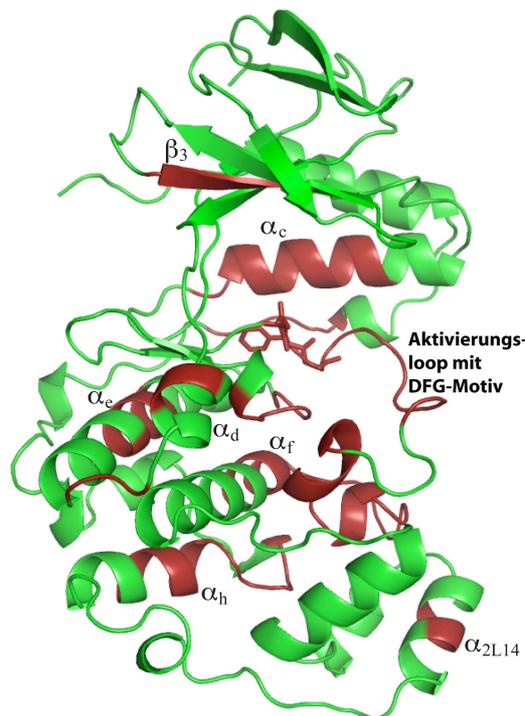


Abbildung 4.1: In der Kristallstruktur 1A9U.pdb (Wang et al., 1998) wurden die Aminosäuren rot markiert, deren Resonanzen aufgrund von Überlagerung oder Fehlen in TROSY-HSQC- und TROSY-HNCA-Spektren nicht zugeordnet werden.

In Abb. 4.1 sind in der Kristallstruktur 1A9U.pdb die Aminosäuren markiert (rot), deren Resonanzen nach Auswertung aller Spektren aufgrund von Überlagerungen in den (^{15}N - ^1H)-TROSY-HSQC-Spektren oder nicht detektierbaren C_{i-1}^α -Verschiebungen im TROSY-HNCA-Spektrum nicht zugeordnet werden konnten. Dazu gehören Teile des β_3 -Faltblattes, der α_c -, α_d -, α_e -, α_f -, α_h - und α_{2L14} -Helices sowie der Aktivierungsloop mit dem DFG-Motiv.

4.2.2 Vollständigkeit der Resonanzzuordnungen der p38 α /SB203580- und p38 α /NR243-Komplexe

SB203580 sollte als Referenzverbindung bei der Erforschung von p38 α -Komplexen mittels Lösungs-NMR dienen, da dieser Komplex schon für NMR-Studien herangezogen wurde (Vogtherr et al., 2006) und die Kristallstruktur aufgeklärt wurde (1A9U.pdb; Wang et al., 1998). SB203580 bindet mit einem IC_{50} -Wert von 100 ± 37 nM an inaktives p38 α (Za-

man et al., 2006). Die Untersuchung des Komplexes p38 α /SB203580 mittels zweidimensionaler NMR wurde auf dieselbe Weise durchgeführt wie bereits für das unkomplexierte Protein beschrieben. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Rückgrat- sowie Methylgruppenresonanzen der Aminosäuren in Teilen des β_1 -, β_2 - und β_5 -Faltblattes, die zur Bindetasche gehören, nicht mehr zugeordnet werden konnten, da diese in den unterschiedlichen Spektren nicht mehr detektierbar waren.

Das bedeutet, dass in diesen Bereichen der Bindetasche ein mittelschneller Austausch stattfindet (Kapitel 2.2.3.2). Bindet also der Inhibitor SB203580 an p38 α , werden die Regionen des Glycin-reichen Loops (Gly 33 bis Val 38), der hydrophoben Tasche I (Teile der β_3 -, β_4 - und β_5 -Stränge und der α_c -Helix) und der *Hinge Region* (Thr 106 bis Ala 111) beeinflusst. Es konnten 61 % der im (^{15}N - ^1H)-TROSY-HSQC-Spektrum sichtbaren Resonanzen zugeordnet werden (Kapitel 3.2.1.2).

Eine ähnliche Beobachtung konnte bei dem p38 α /NR243-Komplex gemacht werden. In allen aufgenommenen Spektren fehlten aufgrund von mittelschnellem Austausch nach Zugabe des Inhibitors Resonanzen, die Aminosäuren der hydrophoben Tasche I und des Glycin-reichen Loops in unkomplexiertem p38 α zugeordnet worden waren, also Gly 33 bis Val 38 des Glycin-reichen Loops und Teile der β_1 -, β_2 -, und β_5 -Stränge der hydrophoben Tasche I. Außerdem war in der *Hinge Region* zusätzlich zu den Resten Thr 106 bis Ala 111 die Resonanz von Asp 112 nicht mehr sichtbar. Auch dieser Inhibitor induziert also einen mittelschnellen Austausch in allen Regionen, auf die er während der Bindung Einfluss hat. Im (^{15}N - ^1H)-TROSY-HSQC-Spektrum konnten 61.6 % der sichtbaren Resonanzen zugeordnet werden (Kapitel 3.2.1.3).

In Abb. 4.2 sind die Aminosäuren anhand der Kristallstruktur 1A9U.pdb markiert, deren Resonanzen in den Komplexstrukturen nicht mehr detektierbar sind, wobei die rot markierten identisch mit den nicht zugeordneten Resonanzen der Aminosäuren in unkomplexiertem p38 α sind, jedoch die blau markierten Aminosäuren zu Resonanzen gehören, die nur in den Komplexspektren nicht mehr detektierbar sind. Beide Inhibitoren erzeugen also bei der Bindung denselben Effekt am Protein. Resonanzen von Aminosäuren der Bindetasche sind aufgrund eines mittelschnellen Austauschs nicht mehr zu detektieren, was bedeutet, dass ein verändertes dynamisches Verhalten dieser Bereiche vorliegt und beide Inhibitoren in ähnlicher Weise in der Bindetasche lokalisiert sind. Dieses veränderte dynamische Verhalten könnte darauf hindeuten, dass sich das konformelle Gleichgewicht des Proteins bei Komplexierung eines Inhibitors zu einem anderen Hauptkonformer verlagert

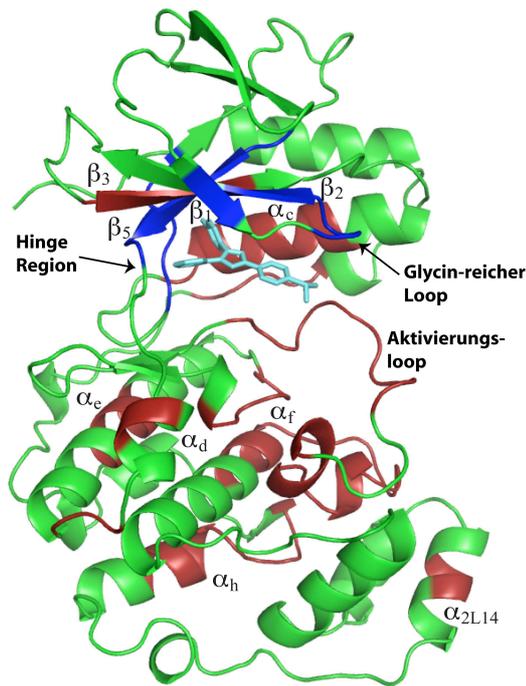


Abbildung 4.2: Vollständigkeit der Resonanzzuordnung von p38 α im Komplex mit SB203580 und NR243 verdeutlicht an der Kristallstruktur des p38 α /SB203580-Komplexes 1A9U.pdb. Rot sind die Aminosäuren gekennzeichnet, deren Resonanzen bereits in unkomplexiertem p38 α nicht zugeordnet werden konnten und blau die Aminosäuren, deren Resonanzen nach der Bindung der Inhibitoren in den aufgenommenen Spektren nicht mehr sichtbar waren.

(*conformational sampling*, Kapitel 4.5.2).

Im Vergleich zu den Kristallstrukturen lässt sich eine interessante Beobachtung für beide Protein-Inhibitor-Komplexe in Lösung machen. Sobald SB203580 oder NR243 an p38 α binden, sind die Resonanzen der wichtigen Bindetascheregionen nicht mehr sichtbar. Das bedeutet, dass sich die Dynamik dieser Bereiche verändert. Die Komplexkristallstruktur von p38 α mit SB203580 (1A9U.pdb; Wang et al., 1996) weist für die Bereiche der Bindetasche B-Faktoren auf, die zum Beispiel in der *Hinge Region* zwischen 16 und 50 \AA^2 und in der hydrophoben Tasche I zwischen 18 und 45 \AA^2 liegen. Die Größe des B-Faktors (*Debye-Waller factor*) repräsentiert die statische Unordnung des Kristalls sowie sein thermodynamisches Verhalten (Blow, 2002). Der B-Faktor ist eine Gauss-Funktion, die die Elektronendichte eines Atomes gemäß des Grades der Unordnung anordnet. Je besser die Auflösung eines Kristalls desto niedriger sind die B-Faktoren der Atome. Für Proteinkristalle mit guter Auflösung liegt der B-Faktor im Bereich von 20 \AA^2 . Das bedeutet, dass die Atome in der *Hinge Region* und in der hydrophoben Tasche I bereits Effekte einer erhöhten Unordnung zeigen. Die B-Faktoren der Atome des Glycin-reichen Loops erreichen teilweise bis zu 80 \AA^2 (Tyr 35), wodurch ein Hinweis auf die vorhandene Flexibilität geliefert wird. Auf die Frage, ob der Ursprung dieser Flexibilität vom Protein oder dem

Inhibitor selbst herrührt, wird noch eingegangen werden.

4.3 Messung residueller dipolarer Kopplungen

Für die freie Form von p38 α ergab sich nach Messung und Auswertung der (¹⁵N-¹H)-TROSY-HSQC- und (¹⁵N-¹H)-HSQC-Spektren der partiell anisotropen und isotropen Proben eine Anzahl von 73 Kopplungen, wovon 38 Kopplungen zum Amino-Terminus und 35 zum Carboxy-Terminus gehörten. Nach Vergleich der gemessenen RDCs mit den berechneten Werten der Kristallstruktur des unkomplexierten p38 α (1P38.pdb) wurde ein Korrelationskoeffizient von 0.94 ($Q = 0.25$) bestimmt. 73 Kopplungen aus 342 möglichen Resonanzen repräsentieren nur ein Viertel der Aminosäuren im Protein. Daraus resultiert das Ergebnis, dass die Gesamtkonformation des Proteins in Lösung der Kristallstruktur 1P38.pdb entspricht (Kapitel 3.4.1).

Genauso verhält es sich mit den Komplexstrukturen, obwohl deren Spektren eine etwas geringere Zahl an RDCs zeigen. Bei 43 Kopplungen des Komplexes p38 α /SB203580 ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von 0.92 ($Q = 0.31$) für 25 amino-terminale und 18 carboxy-terminale Kopplungen. Ebenso zeigt die Komplexform p38 α /NR243 mit einem Faktor von 0.92 ($Q = 0.35$) bei 45 Kopplungen, wovon 24 zu amino-terminalen und 21 zu carboxy-terminalen Aminosäuren gehören, keine wesentlichen Unterschiede zur Kristallstruktur (Kapitel 3.4.2).

4.3.1 Vergleich der RDCs der *Hinge Region* von freiem p38 α mit p38 α im Komplex mit Wasserstoffbrückenakzeptoren

In der freien Form von p38 α spielen die RDC-Daten der beiden Aminosäuren Gly 110 und Ala 111 bei der Auswertung eine interessante Rolle. Die experimentellen RDC-Werte der beiden Reste liegen bei -5.9 Hz für Gly 110 und 19.6 Hz für Ala 111, wohingegen die aus der Kristallstruktur 1P38.pdb berechneten Werte 21.6 Hz für Gly 110 und -16.9 Hz für Ala 111 ergeben. Das bedeutet, dass die räumliche Anordnung dieser beiden Aminosäuren des Proteins in Lösung eine andere ist als im Kristall des unkomplexierten Proteins.

Fitzgerald et al. (2003) entwickelten die beiden Inhibitorclassen der Quinazolinone und Pyridol-Pyrimidine, die mit einem Wasserstoffbrückenakzeptor an die *Hinge Region* von p38 α binden und scheinbar einen Peptid-Flip der dihedralen φ - und ψ -Rückgratwinkel

der Aminosäuren Met 109 und Gly 110 auslösen (Kapitel 1.3.2.2). Verwendet man nun die berechneten RDCs der beiden Aminosäuren Gly 110 und Ala 111 einer dieser Kristallstrukturen (hier 1OVE.pdb; Fitzgerald et al., 2003), lieferte das Werte von -7.9 Hz für Gly 110 und 22.9 Hz für Ala 111, was den gemessenen Werten sehr nahe kommt. Das bedeutet, dass die *Hinge Region* des unkomplexierten Proteins in Lösung eine Konformation einnimmt, die sonst nur in einer bestimmten Klasse von Komplexstrukturen gefunden wird (Kapitel 3.4.1). Dieser Peptid-Flip wird im folgenden Kapitel behandelt.

4.3.2 Die Kristallstrukturen von p38 α /Wasserstoffbrückenakzeptor-Komplexen

Es gibt verschiedene Klassen von Inhibitoren mit Wasserstoffbrückenakzeptoren, von denen Komplexkristallstrukturen mit p38 α bestimmt wurden. VX745 wurde bereits in der Einleitung (Kapitel 1.3.2.2) vorgestellt. Fitzgerald et al. (2003) entwickelten Inhibitoren, die ebenfalls einen Einfluss auf die Konformation der *Hinge Region* von p38 α durch Wasserstoffbrückenakzeptorgruppen in ihrer Struktur aufweisen.

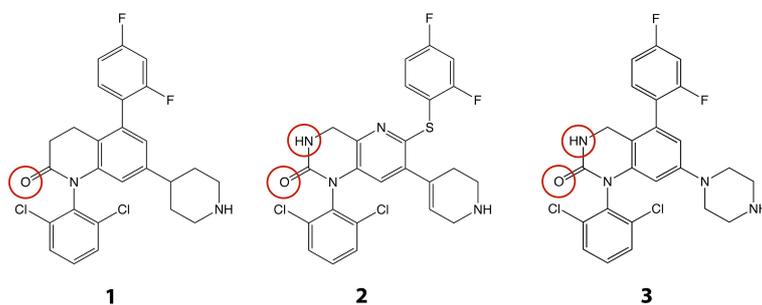


Abbildung 4.3: Drei ATP kompetitive Inhibitoren, die scheinbar bei Bindung an p38 α eine Konformationsänderung des Proteins in der *Hinge Region* hervorrufen. Die Inhibitoren bilden Wasserstoffbrücken von ihren Carbonylgruppen zu den Amidgruppen von Met 109 und Gly 110 und mit den Amidgruppen zu der Carboxylgruppe von His 107. Um die chemischen Namen der Inhibitoren zu verkürzen, werden diese im weiteren Text mit Inhibitor 1 - 3 bezeichnet.

Zur Klasse der Quinazolinone gehört der Inhibitor 1-(2,6-Dichlorophenyl)-5-(2,4-difluorophenyl)-7-piperidin-4-yl-3,4-dihydroquinolin-2(1H)-on (Inhibitor **1**, im Komplex mit p38 α : 1OVE.pdb, Auflösung 2.1 Å), während zur Klasse der Pyridol-Pyrimidine die beiden Inhibitoren 1-(2,6-Dihydrophenyl)-6-[(2,4-difluorophenyl)sulfanyl]-

7-(1,2,3,6-tetrahydro-4-pyridinyl)-3,4-dihydropyrido[3,2- D]pyrimidin-2(1H)-on (Inhibitor **2**, Komplexstruktur 1OUY.pdb, Auflösung 2.5 Å) und 1-(2,6-dichlorophenyl)-5-(2,4-difluorophenyl)-7-piperazin-1-yl-3,4-dihydroquinazolin-2(1H)-on (Inhibitor **3**, Komplexstruktur 1M7Q.pdb, Auflösung 2.4 Å) gehören (Abb. 4.3). Diese Inhibitoren sind ATP kompetitiv und bilden alle Wasserstoffbrücken zu den Amidsticktstoffen von Met 109 sowie Gly 110 aus. Inhibitoren **2** und **3** wechselwirken außerdem mit der Carbonylgruppe von His 107 (Abb. 4.4).

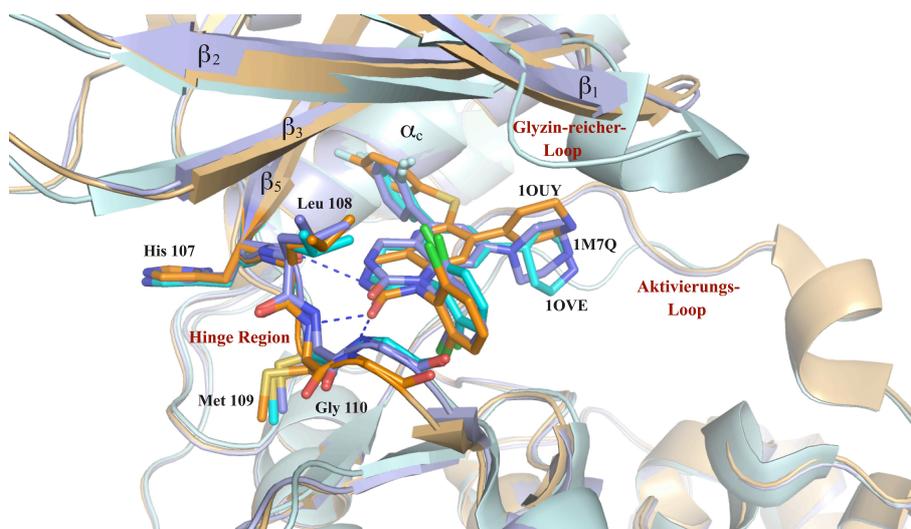


Abbildung 4.4: Überlagerung der Kristallstrukturen 1OVE.pdb mit Inhibitor 1 (blau), 1OUY.pdb mit Inhibitor 2 (orange) und 1M7Q.pdb mit Inhibitor 3 (violett). Die Wasserstoffbrücken sind am Beispiel des Inhibitors 2 dargestellt.

Zur Verdeutlichung ist in Abb. 4.5 der Ausschnitt der Bindetasche der einzelnen Komplexstrukturen mit den drei Inhibitoren in gleicher Orientierung nebeneinander dargestellt. Man erkennt, dass jeder der drei Inhibitoren über seine Carbonylfunktion als Wasserstoffbrückenakzeptor Wechselwirkungen mit der *Hinge Region* ausbildet. Das sekundäre Stickstoffatom der Inhibitoren **1** und **2** in dem Ring, der eine Harnstoffeinheit einschließt, wechselwirkt mit dem Carbonylsauerstoff von His 107 (Strukturen 1OUY.pdb und 1M7Q.pdb). Eine vergleichbare Wasserstoffbrücke kann von Inhibitor **1** nicht ausgebildet werden, da diesem Molekül das sekundäre Stickstoffatom fehlt. In der Struktur 1OVE.pdb mit Inhibitor **1** liegt der Phenylring von Phe 35 zwischen dem Dichlorphenyl- und dem Piperidinring des Inhibitors, was die Anordnung der Proteinmoleküle im Kristallgitter hervorrufen kann. Durch die Position von Tyr 35 erfährt jedoch der Glycin-reiche

Loop eine Torsion, die ihn in der Beweglichkeit einzuschränken scheint (B-Faktoren $\sim 50 \text{ \AA}^2$) und unterscheidet sich von den Glycin-reichen Loops in 1OUY.pdb und 1M7Q.pdb (B-Faktoren $\sim 80 \text{ \AA}^2$). Bei diesen beiden Strukturen liegt der Phenylring von Tyr 35 weit entfernt vom Inhibitor.

Inhibitor **1** bindet mit einer höheren Affinität an die Kinase als die anderen beiden, die 4- bis 5-fach größere IC_{50} -Werte aufweisen (IC_{50} -Werte von **1** = 0.74 nM, **2** = 4.3 nM und **3** = 3.2 nM, bei inaktivem p38 α ; Fitzgerald et al., 2003).

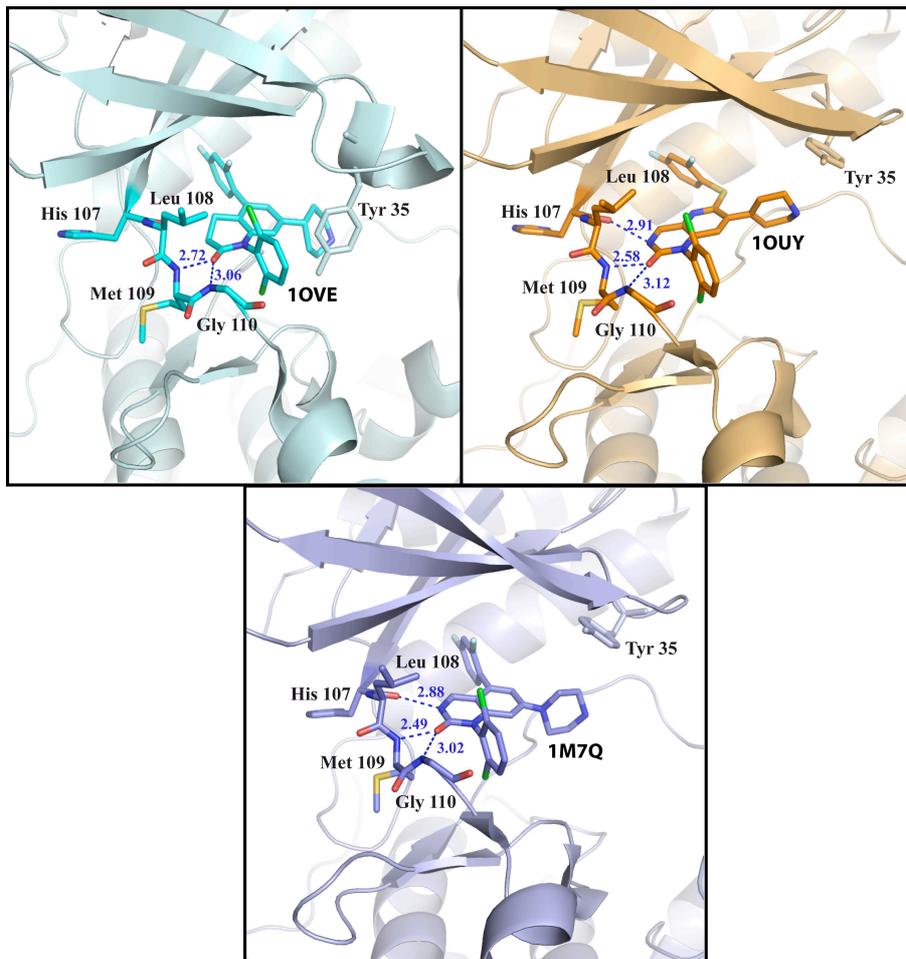


Abbildung 4.5: Einzelne Darstellung der Bindetasche der Kristallstrukturen 1OVE.pdb (blau), 1OUY.pdb (orange) und 1M7Q.pdb (violett) zur Verdeutlichung der Bindungen der Inhibitoren. Alle Wasserstoffbrücken zu den Inhibitoren werden von der *Hinge Region* ausgebildet.

Alle drei Inhibitoren bilden Wasserstoffbrücken von ihrem Carbonylsauerstoffatom zu den NH-Gruppen der Amidbindungen Met 109 und Gly 110. Andere Inhibitorclassen weisen in

ihrer Struktur Protonendonoren auf, die in der Nähe der *Hinge Region* liegen (SB203580). Die Carbonylgruppe der drei Inhibitoren **1**, **2** und **3** bewirkt einen Wechsel der Polarität, weshalb nicht mehr die Carbonylgruppen des Proteinrückgrats mit den Inhibitoren wechselwirken können, sondern die NH-Gruppen der Amidbindungen zu Wasserstoffbrückenbildungen herangezogen werden. Dabei ändern sich die (ϕ, ψ) -Winkel zwischen Met 109 (Aminosäure i) und Gly 110 (Aminosäure $i+1$) von einer (β, α_R) zu einer (α_R, α_L) Konformation, ohne dass sich die Konformationen angrenzender Peptidbindungswinkel ändern. Dieser Flip gehört zur Gruppe der so genannten Typ 2 Flips (Hayward, 2001). Bei dieser Art Flip ist die zweite Aminosäure $i+1$ meist ein Glycin, da diese Aminosäure eine Wendung der Peptidbindungswinkel von $\phi = -180^\circ, 180^\circ$ durchführen muss. Die Energiebarriere, die bei einer solchen Winkeländerung überwunden werden muss, ist bei einem Glycin wesentlich geringer, denn jede andere Aminosäure besitzt eine sperrigere Seitenkette. Die Anwesenheit von Glycin an Position 110 ist somit ein Bindekriterium für Inhibitor Klassen mit Wasserstoffbrückenakzeptoren, die einen Peptid-Flip induzieren.

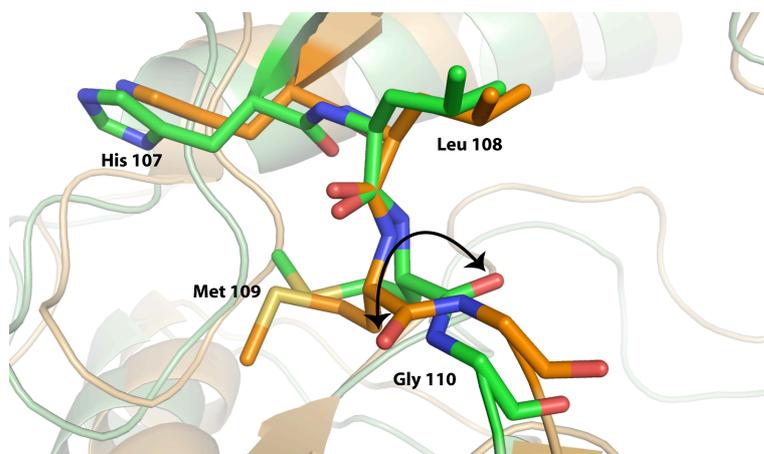


Abbildung 4.6: Peptid-Flip der Peptidbindung Met 109 - Gly 110 in der Kristallstruktur 1OUY.pdb (orange) überlagert mit der Struktur 1A9U.pdb ohne Peptid-Flip.

In Abb. 4.6 ist die *Hinge Region* der Komplexstrukturen 1OUY.pdb (p38 α im Komplex mit Inhibitor **1**, orange) und 1A9U.pdb (p38 α im Komplex mit SB203580, grün) zur Verdeutlichung des Peptid-Flips überlagert dargestellt. Ein Hinweis für die erhöhte Selektivität der Inhibitoren wurde geliefert, indem Gly 110 zu Alanin und auch Aspartat mutiert wurde und die Inhibitoren **1**, **2** und **3** ein wesentlich schlechteres Bindungsverhalten im Vergleich zu p38 α -wt zeigten (IC₅₀-Werte für p38 α G110A von **1** = 6.4 nM, **2** = 61 nM und **3** = 26 nM, sowie für p38 α G110D von **1** = 14 nM, **2** = 160 nM und **3** = 67 nM bei inaktivem p38 α ; Fitzgerald et al., 2003). Aus diesem Grund sind diese Inhibitoren auch

hochselektiv für p38 α , denn bei ERK1 und 2 befindet sich ein Glutamat und bei JNK1-3 ein Aspartat an dieser Position in der *Hinge Region*.

Der Difluorophenylring der Inhibitoren zeigt in die hydrophobe Tasche I, wo die Aminosäure Thr 106 den nötigen Platz schafft, denn in der Familie der MAP-Kinasen befindet sich meist eine Aminosäure mit raumfüllenderer Seitenkette an Position 106 (bei p38 γ und p38 δ ein Methionin, bei ERK1 und 2 ein Glutamin und bei JNK1-3 ebenfalls ein Methionin), so dass dann der Platz in der hydrophoben Tasche I für diese Gruppe Inhibitoren nicht ausreichen würde. Das stellt einen weiteren Grund für die hohe Selektivität dar. Der dritte Substituent in der Struktur der Inhibitoren, ein Piperidinring ist für eine erhöhte Wasserlöslichkeit und somit eine bessere orale Verfügbarkeit der Inhibitoren verantwortlich.

Wie bereits in Kapitel 1.3.2.3 erwähnt, sind die Inhibitoren von Fitzgerald et al. nicht die einzigen, die bei der Komplexbildung mit p38 α einen Peptid-Flip des Met 109 - Gly 110 in der *Hinge Region* der Proteins zeigen. Auch die Struktur des allosterischen Inhibitors BIRB796 enthält einen Wasserstoffbrückenakzeptor, einen Morpholinring, der in der Nähe der *Hinge Region* liegt. Es werden ebenso wie für die Gruppe der Quinazolinone und Pyridol-Pyrimidine Wechselwirkungen zu den NH-Gruppen der Amidbindungen Met 109 und Gly 110 im Proteinrückgrat gebildet. In Abb. 4.7 ist die Struktur von p38 α im Komplex mit BIRB796 (1KV2.pdb, pink) mit der Struktur 1A9U.pdb (grün) überlagert dargestellt, um den Peptid-Flip zu verdeutlichen.

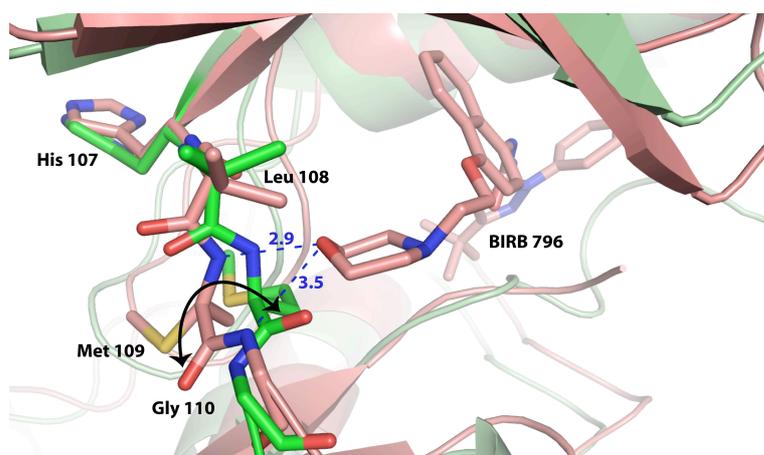


Abbildung 4.7: Der Peptid-Flip der Peptidbindung Met 109 - Gly 110 tritt in der Kristallstruktur 1KV2.pdb (pink) des p38 α /BIRB796-Komplexes ebenso auf, wie in Komplexen mit Quinazolinonen und Pyridol-Pyrimidinen. Die Überlagerung mit der Struktur 1A9U.pdb verdeutlicht die 180° Drehung der Peptidbindung.

Die Messungen von RDCs des unkomplexierten Proteins zeigen, dass der Peptid-Flip eine natürliche Erscheinung der *Hinge Region* in Lösung ist (Kapitel 3.4.1). Man kann vermuten, dass der Peptid-Flip nicht erst von Inhibitoren mit Wasserstoffbrückenakzeptoren ausgelöst wird, sondern diese Anordnung von Met 109 und Gly 110 ein Hauptkonformer der *Hinge Region* in Lösung darstellt. Da die Überwindung der Energiebarriere bei einer Drehung der Peptidbindung von Met 109 - Gly 110 um 180° um ein Vielfaches geringer ist als bei jeder anderen Aminosäure in der $i+1$ -Position, werden je nach Struktur des Inhibitors entweder von der Carbonylgruppe von Met 109 oder den Amidgruppen von Met 109 und Gly 110 Wasserstoffbrücken zu den funktionellen Gruppen ausgebildet. Beispiele dafür sind die Komplexstrukturen von p38 α mit BIRB796, SB203580 oder der Gruppe von Quinazolinonen und Pyridol-Pyrimidinen.

4.4 Komplexstrukturbestimmung mit NMR, Kristallstruktur und Docking mit HADDOCK

Um eindeutige Resonanzen in zweidimensionalen (^1H , ^1H)-NOESY-Spektren zu erhalten, wurden perdeuterierte, [^{15}N]-markierte p38 α Proben hergestellt. Die Proteinproben wurden jeweils mit [^{13}C , ^{15}N]-markiertem, protoniertem Leucin, Threonin bzw. Tyrosin selektiv markiert. Um eine Überlagerung der Inhibitorresonanzen mit Rückgratresonanzen des Proteins im aromatischen Bereich zu verhindern, wurden ^{15}N -gefilterte (^1H , ^1H)-NOESY-Spektren aufgenommen.

4.4.1 Der p38 α /SB203580-Komplex

Der Inhibitor SB203580 ist ein *DFG-in*-Binder, was durch Überprüfung der These von Vogtherr et al. (2006) anhand der Messung einer [^{15}N]-Phe-markierten Probe im Komplex mit SB203580 bestätigt werden konnte (Kapitel 3.3.3).

Um die Position von SB203580 in der Bindetasche von p38 α in Lösung zu bestimmen und mit der Kristallstruktur zu vergleichen, wurde die Methode der selektiven Seitenkettenprotonierung zur Messung spezifischer Kreuzsignale in (^1H - ^1H)-NOESY-Spektren angewendet. Eine perdeuterierte p38 α -Probe wurde mit protoniertem [^{13}C , ^{15}N]-Leucin eine andere mit protoniertem [^{13}C , ^{15}N]-Threonin markiert. In beiden NOESY-Spektren sieht man die Diagonalpeaks und die intramolekularen Kreuzsignale des

Inhibitors (Abb. 3.28 und 3.29; Kapitel 3.5.1).

Da aufgrund von starken Überlagerungen der Resonanzen α -helikaler Bereiche und Verlust vieler Resonanzen durch mittelschnellen Austausch weder bei Vogtherr et al. (2005) noch in dieser Arbeit eine Seitenkettenuordnung des Proteins durchgeführt werden konnte, mussten Kreuzresonanzen von Leucin- oder Threoninmethylprotonen zu Inhibitorprotonen in den NOESY-Spektren anders ausgewertet werden.

In der Bindetasche befinden sich neun Leucine. Die gemittelten ^1H -chemischen Verschiebungen von Leucinmethylprotonen liegen zwischen 0.76 und 0.74 ppm (BMRB). Das NOESY-Komplexspektrum zeigt zwei intermolekulare Kreuzresonanzen, die bei 0.73 ppm und 0.88 ppm liegen, so dass es sich um Leucinmethylprotonen handelt, die sich in unmittelbarer Nähe des Inhibitors befinden (Abb. 3.28; Kapitel 3.5.1). Um diesen ^1H - ^1H -Abstand zwischen den Inhibitorprotonen und den Leucinmethylprotonen zu ermitteln, wurden die Intensitäten der intramolekularen sowie der intermolekularen Kreuzsignale bestimmt. Der ^1H - ^1H -Abstand von benachbarten Phenylringprotonen beträgt 2.47 ppm. Über das Verhältnis der intramolekularen Signalintensitäten zum Abstand zweier benachbarter Phenylringprotonen wurden die Abstände der Leucinmethylprotonen zum Inhibitor bestimmt. Die Kreuzsignale gehören zu Leucinmethylprotonen, deren Abstände einer oberen Distanzeinschränkung von ungefähr 2.70 Å zu den Inhibitorprotonen genügen müssen.

Aus der Kristallstruktur 1A9U.pdb kann man entnehmen, dass die Methylprotonen von Leu 75 2.1 Å von den $\text{C}^{3'}/5'$ -H-Atomen und 2.8 Å von den $\text{C}^{2'}/6'$ -H-Atomen des A-Rings entfernt liegen. Dagegen liegt zum Beispiel eine Methylgruppe des Leu 104 zwischen 3.1 und 3.6 Å von den vier aromatischen Protonen entfernt. Das bedeutet, dass Leu 75 den geringsten Abstand zum Inhibitor besitzt, der sich im Bereich der durch Signalintensitätenvergleich berechneten Proton-Proton-Distanzen befindet.

Die ^1H -chemischen Verschiebungen von Threoninmethylprotonen liegen in einem Bereich von ca. 1.14 ppm. Im Threonin-protonierten NOESY-Komplexspektrum sieht man ein Kreuzsignal bei 0.67 ppm, so dass es sich um Protonen einer Threoninmethylgruppe handelt, die NOE-Wechselwirkungen zum Inhibitor ausbilden (Abb. 3.29, Kapitel 3.5.1). Aus dem Spektrum kann man entnehmen, dass die Protonen $\text{H}^{3'}/5'$ in Ring A und $\text{H}^{3'}/5'$ in Ring C des Inhibitors nahe genug an Thr 106 liegen, um NOEs auszubilden, allerdings lässt sich aufgrund von sehr schwachen intramolekularen Kreuzsignalen keine Berechnung der oberen Distanzeinschränkung durchführen. In der Kristallstruktur 1A9U.pdb zeigen die Protonen der Threoninmethylgruppe einen Abstand von ca. 2.7 Å zu den Atomen des

A-Rings jedoch ca. 3.1 Å zu denjenigen des C-Rings.

Mit der Methode der selektiven Protonierung in (^1H - ^1H)-NOESY-Komplexspektren und der Methode der Distanzeinschränkungen ermittelt aus dem Verhältnis der Signalintensitäten und den Protonenabständen, kann man feststellen, dass die Position des Inhibitors SB203580 in der Bindetasche von p38 α durchaus der Position des Inhibitors in der Kristallstruktur 1A9U.pdb sehr ähnlich ist oder dieser sogar entsprechen könnte.

4.4.2 Der p38 α /NR243-Komplex

Der Inhibitor NR243 gehört zur Gruppe der *DFG-in*-Binder, was ebenso wie bei dem p38 α /SB203580 Komplex durch eine [^{15}N]-Phenylalaninmarkierung durch Aufnahme eines (^{15}N - ^1H)-TROSY-HSQC-Spektrums gezeigt werden konnte (Kapitel 3.3.3).

Um die Konformation des Inhibitors NR243 in der Bindetasche von p38 α zu bestimmen, wurde dieselbe Methode wie bei der Untersuchung des p38 α /SB203580-Komplexes angewendet. Uniform [^{15}N]-markierte, perdeuterierte p38 α -Proben wurden selektiv markiert. Dazu wurden die [^{13}C , ^{15}N]-markierten, protonierten Aminosäuren Leucin, Threonin und Tyrosin verwendet. Im Komplex mit NR243 wurden ^{15}N -gefilterte (^1H - ^1H)-NOESY-Spektren aufgenommen (Kapitel 3.5.2).

Die Auswertung des Leucin-p38 α /NR243-Komplexes ergab intermolekulare NOE-Kreuzsignale zu den Atomen C 3 -H, C $^{4'}$ -H und C $^{6'}$ -H des Inhibitors NR243 (Abb. 3.30). Die Abwesenheit intramolekularer Kreuzsignale des Inhibitors verhinderte eine Berechnung der oberen Distanzeinschränkung zwischen Leucinen der Bindetasche und dem Inhibitor NR243. Allerdings waren wie bei SB203580 für Wechselwirkungen mit dem Inhibitor nur die Leucine in der hydrophoben Tasche I (Leu 75, Leu 86 und Leu 104) in Betracht zu ziehen, die nicht weiter als maximal 5 Å vom Inhibitor entfernt liegen, weswegen die übrigen Leucinseitenketten aufgrund ihrer aus der Bindetasche gedrehten Positionen und Entfernungen in diversen Kristallstrukturen (1A9U.pdb oder 1P38.pdb sowie 1OVE.pdb, OUY.pdb oder 1KV2.pdb) nicht in Frage kommen konnten.

Im (^1H - ^1H)-NOESY-Spektrum von Threonin-p38 α /NR243 ist eine Kreuzkorrelation vorhanden (Abb. 3.31). Da sich in der Bindetasche nur ein Threonin, Thr 106 in der *Hinge Region*, befindet, zeigt das Kreuzsignal NOE-Wechselwirkungen zwischen der Methylgruppe dieses Threonins und dem C $^{4'}$ H-Atom des Inhibitors NR243 an. Das Kreuzsignal liegt bei 0.73 ppm und ist vergleichbar mit der chemischen Verschiebung der Threoninmethyl-

protonen im p38 α /SB203580-Komplex. In diesem NOESY-Spektrum sind intramolekulare Kreuzsignale zwischen den Atomen C³-H und C^{6'}-H von NR243 sichtbar, so dass eine obere Distanzeinschränkung zu der Methylgruppe des Thr 106 bestimmt werden konnte. Die H-Atome der C³- und C^{6'}-Ringkohlenstoffe sind theoretisch ca. 2.10 Å voneinander entfernt. Mit Hilfe des Intensitätenvergleichs ergibt sich ein Abstand von ungefähr 2.80 Å des C^{4'}-H-Atoms zu den Protonen der Methylgruppe des Thr 106.

Sowohl die Leucine 75, 86 und 104 als auch Threonin 106 liegen auf derselben Seite der Bindetasche. Um die Position des Inhibitors in der Bindetasche zu bestimmen, wurde eine Tyrosin-protonierte p38 α -Probe verwendet, da das einzige Tyrosin der Bindetasche das Tyr 35 im Glycin-reichen Loop ist und in vielen Komplexen π - π -Interaktionen zwischen seinem Phenylring und einem aromatischen Ringsystem in Inhibitoren ausbildet. Da Tyrosine aromatische Ringsysteme besitzen, wurden die chemischen Verschiebungen des Inhibitors auf der Diagonalen des (¹H-¹H)-NOESY-Spektrums zum Teil überlagert (Abb. 3.32). Da aber die chemischen Verschiebungen der Protonen des C⁶-C⁹-Rings des Inhibitors nicht mehr im Bereich der Signale der Tyrosinprotonen liegen, konnten diese Signale zugeordnet werden. Es konnten Kreuzresonanzen dieser Protonen zu Tyrosinphenylprotonen zugeordnet werden, so dass der C⁶-C⁹-Ring des Inhibitors eine Distanz von weniger als 5 Å vom Tyr 35 in der Bindetasche besitzen sollte.

Um die Komplexstruktur zu lösen, wurden die aus den (¹H, ¹H)-NOESY-Spektren erhaltenen Informationen in HADDOCK verarbeitet (Dominguez et al., 2003). In Abb. 4.8 ist ein Beispiel der drei besten Komplexstrukturen nach erfolgreichen Docking-Berechnungen dargestellt (Kapitel 3.6). Als AIRs wurden die Reste definiert, die in den NOESY-Spektren Kreuzsignale zu NR243 zeigten, also Tyr 35, Leu 75, Leu 86, Leu 104 und Thr 106. Mit einer Distanzeinschränkung von 3.5 Å zu diesen Resten ergab sich eine Gruppe von Komplexstrukturen, bei denen die Inhibitorprotonen C³-H, C^{4'}-H und C^{6'}-H zwischen 2.0 und 3.0 Å von den definierten Methylgruppenprotonen entfernt liegen.

In Abb. 4.8 sind die Abstände zwischen den wahrscheinlichsten Protonenpaaren von Protein und Inhibitor angegeben. So kann man zwischen dem Proton C^{4'}-H und den Methylprotonen des Thr 106 einen ungefähren Abstand von 2.60 Å und den Methylprotonen des Leu 86 von 2.00 Å annehmen. Das Proton C^{6'}-H liegt demnach zwischen 3.00 und 3.10 Å und das C³-H-Atom ungefähr 2.60 Å von den Methylprotonen des Leu 75 entfernt. Die Protonen des Tyr 35-Phenylrings zeigen einen Abstand von 3.20 Å zu dem C⁹-H-Atom des Inhibitors. Die Methylprotonen des Leu 104 liegen zwischen 4.00 und 4.40 Å von den

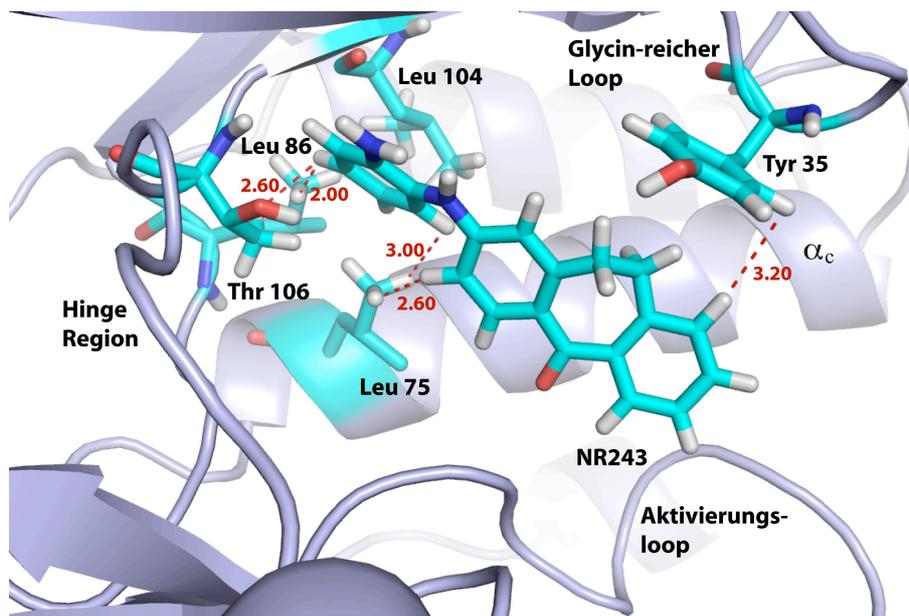


Abbildung 4.8: Beispiel einer der drei besten Komplexstrukturen aus dem Ensemble der Docking-Strukturen. Die Aminosäuren, die NOEs zu Inhibitorprotonen zeigen, sind hervorgehoben und wahrscheinliche H-H-Abstände in rot markiert.

$C^{4'}$ - und $C^{6'}$ -Protonen des Inhibitors entfernt, zeigen aber eine Distanz von nur 2.60 Å zu dem $C^{5'}$ -Ringproton. Diese Wechselwirkung konnte allerdings in den (1H , 1H)-NOESY-Spektren nicht beobachtet werden. Da die Kreuzresonanzen allerdings generell nur als schwache Signale im Spektrum detektiert werden, könnte das wiederum auf das Auftreten eines mittelschnellen Austauschs im Speziellen auch bei dieser Aminosäure (Leu 104) hindeuten.

4.5 Zusammenfassung und Ausblick

4.5.1 Methode der Strukturlösung mit spezieller Markierungstechnik und Modelling

Die Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen potentiellen Arzneistoffen und ihren Zielproteinen ist für die weitergehende Entwicklung noch selektiver bindender niedermolekularer Substanzen von größter Bedeutung. Einige Proteine lassen sich im Komplex mit potentiellen Inhibitoren kristallisieren und die Bindungsweise des Liganden damit erforschen. In einem Kristall deutet sich die Dynamik im Protein in der Größe des B-Faktors an, der die statische Unordnung in der Kristallpackung sowie die thermodynamische Variabilität in den Proteinmolekülen anzeigt. Eine Kristallstruktur ist also eine Mittelung von Einzelstrukturen über dieses dynamische Verhalten des Proteins, das sich in einer dichten Molekülpackung befindet. In Lösung liegt ein Protein in einer völlig anderen Umgebung vor und zeigt ein dynamisches Verhalten auf einer anderen Zeitskala. Mit NMR kann man nicht nur eine Struktur in Lösung bestimmen, sondern gewinnt auch Einblicke in das dynamische Verhalten des Proteins oder eines Protein-Inhibitor-Komplexes wie es in der natürlichen Umgebung der Zelle sein könnte. In der BMRB (*Biological Magnetic Resonance Data Bank*) kann man bereits einige Kinasen mit deren Resonanzzuordnung oder auch Strukturen finden. Oxenoid et al. (2004) veröffentlichten die Zuordnung von Diacylglycerol-Kinase (DAGK). Eine Resonanzzuordnung des Proteinerückgrats von cAMP-abhängiger Proteinkinase (PKA) im Komplex mit einem Inhibitor wurde von Langer et al. (2004) durchgeführt, wobei die Methode der selektiven Markierung mit der Anwendung eines paramagnetischen Spin-Labels kombiniert wurde. Vajpai et al. (2008) zeigten mittels der vollständigen Zuordnung der Rückgratresonanzen der Abelson Kinase (Abl) sowie Messung residualer dipolarer Kopplungen und ^{15}N -Relaxationsdaten die Art der Bindung der Inhibitoren Imatinib (Gleevec) und Dasatinib.

p38 α ist ein 40 kDa großes Protein mit einer Vielzahl an α -Helices, deren Aminosäuren in 2D HSQC-Spektren ähnliche chemische Verschiebungen aufweisen. Dadurch entstehen starke Überlagerungen, so dass eine Zuordnung dieser Resonanzen erschwert ist. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Methode der selektiven Markierung angewendet.

Markiert man nur selektiv Aminosäuren, sind im HSQC-Spektrum nur die Rückgratresonanzen dieser selektiv markierten Aminosäure zu finden, was das Spektrum sehr viel

übersichtlicher gestaltet. Die Methode der selektiven Markierung wurde unter anderem bei Fiaux et al. (2004) angewendet.

Durch die Markierung zweier sequentiell benachbarter Aminosäuren kann die Aufnahme von HN(CO)-Spektren weiteren Aufschluss über die Rückgratresonanzzuordnung des Proteins geben (Weigelt et al., 2001). 2D HN(CO)-Spektren zeigen ein Kreuzsignal eines Aminosäurepaares an der Stelle, an der die Resonanz der sequentiell späteren Aminosäure im HSQC-Spektrum erscheint. Auf diese Weise kann ein Teil der Rückgratresonanzen den Aminosäuren im Protein zugeordnet werden.

Desweiteren kann man mit der Messung von RDCs herausfinden, in wie weit die Lösungsstruktur des Komplexes mit der Kristallstruktur des Proteins übereinstimmt. Je nach Ergiebigkeit der RDC-Daten erstreckt sich die Genauigkeit dieser Strukturübereinstimmung von der globalen Erscheinung der Proteinstruktur bis hin zur genauen Analyse der einzelnen Sekundärstrukturelemente. Bei p38 α konnte durch Aufnahme von RDC-Daten und deren Vergleich mit der Kristallstruktur des unkomplexierten Proteins eine Übereinstimmung der globalen Struktur in Lösung der unkomplexierten sowie komplexierten Proteinformen festgestellt werden. Ein Unterschied besteht allerdings in der Bindetaschenregion, denn nach Bindung eines Inhibitors sind Resonanzen der vom Inhibitor beeinflussten Aminosäuren aufgrund von mittelschnellem Austausch nicht mehr detektierbar. Das bedeutet, dass sich das dynamische Verhalten des Proteins in dieser Region ändert, aber ohne einen Hinweis darauf zu geben, ob der Ursprung der veränderten Dynamik im Protein oder im gebundenen Inhibitor zu finden ist. Zusätzlich konnte durch Messung von RDC-Daten eine weitere interessante Entdeckung gemacht werden. Die *Hinge Region* des unkomplexierten Proteins liegt in Lösung anders als im Kristall vor. Sie nimmt eine Konformation ein, die nur in Kristallstrukturen von Komplexformen der Kinase mit Quinazolinon- bzw. Pyridol-Pyrimidin-Inhibitoren beobachtet wird.

Um nun das Problem der Komplex-Strukturaufklärung und der nicht vorhandenen Seitenkettenuordnung zu lösen, wurde mit der Aufnahme intermolekularer NOE-Wechselwirkungen und selektiv markierten Aminosäuren gearbeitet. Die Anzahl von NOE-Signalen kann ebenso wie die der Amidsignale in 2D HSQC-Spektren so reduziert werden, dass eine Zuordnung der Resonanzen möglich wird. Das Ausmaß des *Nuclear Overhauser*-Effekts hängt sehr stark vom Abstand der beiden dipolar-gekoppelten Spins ab, was NOEs zu sehr sensitiven Messinstrumenten von kurzen inter- bzw. intramolekularen Wechselwirkungen macht. Um nun die Anzahl von Störelementen möglichst gering zu

halten, wurde p38 α bis auf eine selektiv protonierte Aminosäure vollständig perdeutert hergestellt. Zudem wurde ein perdeutrierter NMR-Messpuffer verwendet. Trotz der fehlenden Seitenkettenzuordnung konnten die gemessenen NOE-Wechselwirkungen nach Vergleich mit den vorhandenen Kristallstrukturen bestimmten Aminosäuren in der Bindetasche zugeordnet werden. Außerdem war es möglich, Aminosäuren zu markieren, die nur einmal in der Bindetasche vorkommen, so dass eine Wechselwirkung vom Inhibitor eindeutig dieser Aminosäure zugeordnet werden konnte. Mit Hilfe eines Intensitätenvergleichs von intramolekularen zu intermolekularen NOE-Signalen, konnten obere Distanzeinschränkungen der entsprechenden Inhibitorprotonen zu den Methylprotonen der Seitenketten bestimmt werden. Diese Distanzen und die Bestimmung der mit dem Inhibitor wechselwirkenden Aminosäuren durch das Ausschlussprinzip, ermöglichte die Berechnung einer Komplexstruktur mit HADDOCK.

In dieser Arbeit zeigte sich die Messung von intermolekularen NOE-Wechselwirkungen von selektiv markierten Aminosäuren zu Inhibitorprotonen als erfolgreich, was zum Einen die Auswertung von NOESY-Spektren des p38 α /SB203580-Komplexes bei Markierung von Leucin, Threonin oder Tyrosin im Protein beweist. Die NOE-Signale bestätigen einerseits, dass die Position des Inhibitors in der Bindetasche im Einklang mit der Kristallstruktur steht, andererseits kann man aber anhand der TROSY-HSQC-Spektren und RDC-Daten von einer Ansammlung verschiedener ähnlicher Komplexstrukturen aufgrund der Beweglichkeit des Proteins sprechen, wovon die Kristallstruktur nur eine Konformation widerspiegelt, was im folgenden Kapitel ausführlich diskutiert wird.

Ebenso ist es möglich, ohne eine Kristallkomplexstruktur sowie eine vollständige Resonanzzuordnung eines Proteins auf die in dieser Arbeit beschriebene Weise eine Protein-Inhibitor-Struktur zu lösen, wie es hier im Falle des p38 α /NR243-Komplexes gezeigt wurde. Ist das Verfahren etabliert, ist es sogar möglich, eine Struktur innerhalb kürzester Zeit zu erhalten, was ein Vorteil beim schnellen Test (*Screening*) von Inhibitoren ist.

4.5.2 Bindung verschiedener Inhibitoren und Verhalten der Proteinbindetasche - *conformational sampling*

Betrachtet man die Vollständigkeit der Rückgratresonanzzuordnung bei unkomplexiertem p38 α verglichen mit Inhibitor gebundenem Protein, fällt auf, dass Resonanzen von Amino-

säuren der Bindetasche in den Inhibitor gebundenen Spektren nicht mehr detektierbar sind. Das ist der Fall, wenn sich die verschiedenen Teile der Bindetasche mit einer Geschwindigkeit im μs - bis ms -Bereich zwischen verschiedenen Konformationen hin und her bewegen. Katalyse und Ligandenaustausch erfolgen normalerweise auf dieser Zeitskala, denn das entspricht einem Zeitraum, den ein Protein für eine konformelle Änderung im Zusammenhang mit enzymatischen Vorgängen benötigt. Die Hypothese des *induced-fit* wurde von Koshland (1958) eingeführt und besagt, dass der Ligand an eine Konformation bindet und diese Wechselwirkung das Enzym zum Übergang in eine andere Konformation veranlasst, die eine bevorzugtere Bindung des Liganden zulässt (Goh et al., 2004).

Eine solch veränderte Beweglichkeit nach Zugabe eines Inhibitors kann jedoch verschiedene Gründe haben. Entweder der Inhibitor selbst bewegt sich zwischen verschiedenen Konformationen hin und her und animiert das Protein in den angrenzenden Regionen sich ebenfalls zu bewegen oder aber der Inhibitor oszilliert nicht zwischen verschiedenen Konformationen und das Protein nimmt von sich aus verschiedene Zustände an (Boehr et al., 2006).

Die Auswertung der RDC-Daten führten zu solchen Überlegungen, denn diese zeigen den Verlust von Rückgratresonanzen der Aminosäuren der Bindetasche, sobald ein Inhibitor gebunden wurde. Betrachtet man als nächstes die NOE-Daten, sieht man deutlich die Resonanzen der Inhibitoren auf der Diagonalen in den NOESY-Spektren und manchmal sogar noch zusätzlich die intramolekularen NOE-Signale des Inhibitors. Da die Messmethode der NOE-Wechselwirkungen wesentlich sensitiver als ein HSQC-Spektrum ist, können die Signale zwischen Inhibitor- und Aminosäureseitenkettenprotonen detektiert werden, obwohl sich das Aminosäurerückgrat im mittelschnellen Austausch befindet. Diese Bewegung nimmt also keinen Einfluss auf die Detektion der Inhibitorprotonen bzw. das dynamische Verhalten des Inhibitors. Durch die Bindung eines Inhibitors an das Protein scheint dieses also nicht in eine bestimmte Konformation gezwungen zu werden, wie es aus den Kristallstrukturen interpretiert werden könnte, sondern die Regionen der Bindetasche befinden sich in einer ständigen Bewegung zwischen verschiedenen Konformationen, die in einer Kristallstruktur in einer Art Mittelung zum Ausdruck kommen.

Wo die Hypothese des *induced-fit* also eine konformelle Homogenität voraussetzt, berücksichtigt die These der konformellen Selektion (*conformational sampling*) die Tatsache, dass Proteine aus sich selbst heraus eine Vielzahl von Konformationen einnehmen können, also eine gewisse Heterogenität aufweisen (Kumar et al., 2000). Demnach besteht ein Enzym

aus einem Hauptkonformer, jedoch interagiert meist eines der in der Minderheit vorliegenden Konformere letztendlich mit dem Liganden, da es eine günstigere Passform für den Liganden aufweist. Eine Bindung des Liganden verursacht eine höhere Population dieses Konformers, so dass eine Ligandbindung keine neue Konformation induziert, sondern das konformelle Gleichgewicht verschiebt (Ma et al., 2002). Ein Ligand induziert also nicht die Bildung eines neuen Zustandes des Proteins, sondern wählt einen der bereits existierenden (Henzler-Wildman & Kern, 2007).

NMR ist ein wichtiges Werkzeug für die Untersuchung des dynamischen Verhaltens von Proteinen sowie deren Kommunikation und Wechselwirkungen in Protein-Komplexen. NMR Experimente erlauben eine quantitative Charakterisierung der Umwandlung des Proteins in verschiedene Zustände und der Vergleich dieser Umwandlung mit der Aktivität des Proteins liefert die Verbindung zum katalytischen Mechanismus, was unter anderem von Wolf-Watz et al. (2004) am Beispiel eines thermophilen-mesophilen Enzympaares gezeigt werden konnte. Die Natur hat sich bis heute zu einem Punkt entwickelt, wo chemische Reaktionen in der Bindtasche eines Proteins so schnell sind, dass die Limitierung der enzymatischen Katalyse die Fähigkeit zur ebenso schnellen Konformationsänderung des Proteins ist.

Die Entwicklung neuer Inhibitoren unter Berücksichtigung des dynamischen Verhaltens von Proteinen bei Protein-Ligand- oder Protein-Protein-Wechselwirkungen bekommt also eine immer wichtigere Bedeutung. Lange et al. (2008) zeigten durch Messung residualer dipolarer Kopplungen am Beispiel von Ubiquitin auf der Nanosekunden-Zeitskala, dass das Protein in Lösung in allen Konformationen vorhanden ist, die die Kristallstrukturen des Proteins im Komplex mit verschiedenen Liganden zeigen, so dass auch hier die These des *conformational sampling* bewiesen wurde. Die Analyse dieses Ensembles von Strukturen eines Proteins mit der Technik der NMR könnte zu einem besseren Verständnis der Evolution auf der molekularen Ebene führen und somit neue Wege für Struktur-Wirkungsbeziehungen und Wirkstoffentwicklung öffnen (Boehr & Wright, 2008).

Kapitel 5

Anhang

5.1 Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

| | |
|------------------|--|
| 1D, 2D, 3D | Ein-, Zwei-, Dreidimensional |
| Å | Angström (0,1 nm) |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| ATP | Adenintriphosphat |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| BMRB | Biological Magnetic Resonance Bank |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| °C | Grad Celsius |
| cAMP, cGMP | zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat, zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat |
| CARA | Computer Aided Resonance Assignment (Programm zur Visualisierung und Auswertung von NMR-Spektren) |
| cm | Zentimeter |
| ct | constant time (konstante Zeit) |
| δ | chemische Verschiebung |
| Da | Dalton (Molekulargewichtsangabe für Biopolymere) |
| dATP, dTTP, | 2-Desoxyadenosin-5-triphosphate, 2-Desoxytyrosin-5-triphosphate, |
| dCTP, dGTP | 2-Desoxycytosin-5-triphosphate, 2-Desoxyguanosin-5-triphosphate |
| D ₂ O | Deuteriumoxid (² D ₂ O) |

| | |
|------------------|--|
| DNA | desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure) |
| DSS | 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat |
| DTT | Dithiotreitol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| et al. | et alteri oder alii (und andere) |
| F1, F2, F3 | Dimensionen von NMR-Spektren nach Fourier-Transformation |
| FPLC | Fast Protein Liquid Chromatography |
| g | Gramm |
| g | Erdbeschleunigung (bei Zentrifugengeschwindigkeitsangaben) |
| GARP | globally optimized, alternating-phase rectangular pulses (Entkopplungsschema) |
| GDP | Guanosin-5'-diphosphat |
| G-Protein | Guanosin-Nukleotid-bindendes Protein |
| GTP | Guanosin-5'-triphosphat |
| h | Stunde |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsure |
| HSQC | heteronuclear single quantum coherence (Heteronukleare Einquanten-Kohärenz) |
| IC ₅₀ | mittlere inhibitorische Konzentration |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| kb | kilobasen |
| K _D | Dissoziationskonstante |
| kDa | Kilodalton |
| L | Liter |
| LB-Medium | Luria-Bertani Medium |
| M | Molar (Mol/Liter) |
| μ g | Mikrogramm |
| μ l | Mikroliter |
| μ M | Mikromolar |
| μ m | Mikrometer |
| M9-Medium | künstliches Minimalmedium zur Isotopenmarkierung |
| mA | Milliampere |

| | |
|-------------------|--|
| mg | Milligramm |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| MWCO | molecular weight cut-off (Molekulargewichtsausschlussgrenze) |
| ν | Frequenz |
| NAD | Nikotin-Adenin-Dinukleotid |
| nm | Nanometer |
| NMR | nuclear magnetic resonance (Kernmagnetische Resonanz) |
| NMRPipe | Programm zur Prozessierung von NMR-Spektren |
| NOE | nuclear overhauser effect / enhancement (Kern-Overhauser-Effekt) |
| NOESY | NOE spectroscopy (NOE-Spektroskopie) |
| OD ₆₀₀ | Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PDB | Protein Data Bank |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| ppm | parts per million (Masseinheit für chemische Verschiebungen) |
| r.m.s.d. | root mean square deviation (Quadratwurzel aus den mittleren Abweichungsquadraten) |
| rpm | rotations per minute (Umdrehungen pro Minute) |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde |
| SDS | sodium dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat) |
| TBE | TRIS-Borat-EDTA-Puffer |
| TEMED | N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TROSY | transverse relaxation optimized spectroscopy (Optimierte transverse Relaxationsspektroskopie) |
| U | unit (Einheit) |
| UV | Ultraviolett |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| XWINNMR | Bruker-NMR-Software |

| | |
|-----------|---|
| w/v | weight per volume (Gewicht pro Volumen) |
| V | Volumen |
| WALTZ-16 | wonderful alternating phase technique for zero residual splittings (Entkopplungsschema) |
| WATERGATE | water supression by gradient-tailored exitation (Technik zur Unterdrückung des H ₂ O-NMR-Signals) |

5.2 Ein- und Dreibuchstaben-Aminosäure-Kode

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

5.3 Pulsprogramm des ^{15}N -unterdrückten ($^1\text{H}, ^1\text{H}$)-NOESY

avance-version (06/11/09)

define GRADIENT0 10u p20:gp0 200u

define GRADIENT1 10u p21:gp1 200u

define GRADIENT2 10u p22:gp2 200u

define GRADIENT3 10u p23:gp3 200u

define GRADIENT4 10u p24:gp4 200u

define GRADIENT5 10u p25:gp5 200u

define delay INEPT_D

d12=20u

p2=p1*2

p6=p5*2

INEPT_D=d2-p21-210u

d7=d8-(p23+210u)

in0=inf1/2

d0=in0/2-p1*4/3.1416

1 ze

2 1m

10u do:f2

10u LOCKH_OFF

10u pl9:f1

d1 cw:f1 ph29

4u do:f1

10u pl1:f1

10u pl2:f2

10u pl3:f3

10u LOCKH_ON

10u

```

GRADIENT0
1m
(p1 ph20):f1
GRADIENT1
INEPT_D
(center(p2 ph20):f1 (p6 ph20):f3)
GRADIENT1
INEPT_D
(p1 ph20):f1 (p5 ph20):f3
GRADIENT2
(refalign (p1 ph1 d0 d0 p1 ph2):f1 center(p4 ph20):f2)
GRADIENT3
d7
(p1 ph20):f1
GRADIENT4
INEPT_D
(center(p2 ph20):f1 (p6 ph20):f3)
GRADIENT4
INEPT_D pl12:f2
(p1 ph20):f1 (p5 ph20):f3
GRADIENT5
20u LOCKH_OFF
(p1 ph3):f1
go=2 ph31 cpd2:f2
1m do:f2 mc #0 to 2 F1PH(ip1,id0)
10u do:f2
10u LOCKH_OFF
10u do:f1
10u do:f3
exit

ph1 =0 2
ph2 =0 0 2 2

```

ph3 =0 0 0 0 2 2 2 2

ph31=0 2 2 0 2 0 0 2

ph29=0

ph20=0

ph21=1

ph22=2

ph23=3

pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)

pl9 : f1 channel - power level for presaturation

p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse

d1 : relaxation delay; 1-5 * T1

d12: delay for power switching [20 usec]

NS: 1 * n, total number of scans: NS * TD0

Literaturverzeichnis

- Adams, J. (2003). Activation loop phosphorylation and catalysis in protein kinases: is there functional evidence for the autoinhibitor model? *Biochemistry* **42**, 601–607.
- Adams, J., J. Boehm, S. Kassis, P. Gorycki, E. Webb, R. Hall, M. Sorensen, J. Lee, A. Ayrton, D. Griswold, & T. Gallagher (1998). Pyrimidylimidazol Inhioters of CSBP/ kinase demonstration drecreased inhibition of hepatic cytochome P450-Enzyme. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 3111–3116.
- Akella, R., T. Moon, & E. Goldsmith (2008). Unique MAP Kinase binding sites. *Biochim. Biophys. Acta* **1784**, 48–55.
- Alessi, D., Y. Saito, D. Campbell, P. Cohen, G. Sithanandam, U. Rapp, A. Ashworth, C. Marshall, & S. Cowley (1994). Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J.* **13**, 1610–1619.
- Almo, S., J. Bonanno, J. Sauder, S. Emtage, T. Dilorenzo, V. Malashkevich, S. Wasserman, S. Swaminathan, S. Eswaramoorthy, R. Agarwal, D. Kumaran, M. Madegowda, S. Ragumani, Y. Patskovsky, J. Alvarado, U. Ramagopal, J. Faber-Barata, M. Chance, A. Sali, A. Fiser, Z. Zhang, D. Lawrence, & S. Burley (2007). Structural genomics of protein phosphatases. *J. Struct. func. genomics* **8**, 121–140.
- Armstrong, R., H. Kondo, J. Granot, E. Kaiser, & A. Mildvan (1979). Magnetic resonance and kinetic studies of the manganese(II) ion and substrate complexes of the catalytic subunit of adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinase from bovine heart. *Biochemistry* **18**, 1230–1238.
- Arrowsmith, C. & Y. Wu (1998). NMR of large (≥ 25 kDa) proteins and protein complexes. *Prog. NMR Spec.* **32**, 277–286.

- Baker, E. & R. Hubbard (1984). Hydrogen bonding in globular proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **44**, 97–179.
- Bezaniilla, F. (2000). The voltage sensor in voltage dependent ion channels. *Physiol. Rev.* **80**, 555–592.
- Bloch, F., W. Hansen, & M. Packard (1946). The nuclear induction. *Phys. Rev.* **69**, 127.
- Blow, D. (2002). In *Outline of crystallography for biologists*. Oxford Unity Press.
- Bodenhausen, G. & D. J. Ruben (1980). Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **69**, 185.
- Boehm, J., J. Smietana, M. Sorensen, R. Garigipati, T. Gallagher, P. Sheldrake, J. Bradbeer, A. Badger, J. Laydon, J. Lee, L. Hillegass, D. Griswold, J. Breton, M. Chabot-Fletcher, & J. Adams (1996). 1-substituted 4-aryl-5-pyridinylimidazoles: a new class of cytokine suppressive drugs with low 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitory potency. *J. Med. Chem.* **39**, 3929–3937.
- Boehr, D., H. Dyson, & P. Wright (2006). An NMR perspective of enzyme dynamics. *Chem. Rev.* **106**, 3055–3079.
- Boehr, D. & P. Wright (2008). How do proteins interact? *Science* **320**, 1429–1430.
- Boulton, T., S. Nye, D. Robbins, N. Ip, E. Radziejewska, S. Morgenbesser, R. DePinho, N. Panayotatos, M. Cobb, & G. Yancopoulos (1991). ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**, 663–675.
- Brunger, A., P. Adams, G. Glorie, W. DeLano, P. Gros, R. Grosse-Kunstleve, J. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. Pannu, R. Read, L. Rice, T. Simonson, & G. Warren (1998). Crystallography and NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst. D* **54**, 905–921.
- Bukhtiyarova, M., K. Northrop, X. Chai, D. Casper, M. Karpusas, & E. Springman (2004). Improved expression, purification and crystallization of p38 α MAPK. *Prot. Exp. Pur.* **37**, 154–161.

- Bunkoczi, G., E. Salah, P. Filippakopoulos, O. Fedorov, S. Müller, F. Sobott, S. Parker, H. Zhang, W. Min, B. Turk, & S. Knapp (2007). Structural and Functional Characterization of the Human Protein Kinase ASK1. *Structure* **15**, 1215–1226.
- Campbell, I. (1998). The modular architecture of leukocyte cell-surface receptors. *Immunol. Rev.* **163**, 11–18.
- Cavanagh, J., W. Fairbrother, A. Palmer, M. Rance, & N. Skelton (2007). Protein NMR spectroscopy. *Elsevier Academic Press* **2**, 753–755.
- Clore, G. M., A. M. Gronenborn, M. Nilges, & C. A. Ryan (1987). Three-dimensional structure of potato carboxypeptidase inhibitor in solution. A study using nuclear magnetic resonance, distance geometry, and restrained molecular dynamics. *Biochemistry* **26**, 8012–8023.
- Cohen, P. (2002). Protein kinases - the major drug targets for the twentyfirst century? *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 309–315.
- Colotta, F., S. Dower, J. Sims, & A. Mantovani (1994). The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol. Today* **15**, 562–566.
- Cornilescu, G., J. Marquardt, M. Ottiger, & A. Bax (1998). Validation of protein structure from anisotropic carbonyl chemical shifts in a dilute liquid crystalline phase. *JACS* **120**, 6836–6837.
- Darnell, J. (1996). The JAK-STAT pathway: summary of initial studies and recent advances. *Recent Prog. Horm. Res.* **51**, 391–404.
- Delaglio, F., S. Grzesiek, G. Viuster, G. Zhu, J. Pfeifer, & A. Bax (1995). NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* **6**, 277–293.
- DeLano, W. The PyMOL molecular graphics system . <http://www.pymol.org>.
- DeLazlo, S., D. Visco, L. Agarwal, L. Chang, J. Chin, G. Croft, A. Forsyth, D. Fletcher, B. Frantz, C. Hacker, W. Hanlon, C. Harper, M. Kostura, B. Li, S. Luell, M. MacCoss, N. Mantlo, E. O'Neill, C. Orevillo, M. Pang, J. Parsons, A. Rolando, Y. Shaly, K. Sidler,

- & S. O'Keefe (1998). Pyrroles and other heterocycles as inhibitors of p38 kinase. *Biomed. Med. Chem. Lett.* **8**, 2689–2694.
- DeMaeyer, E. & J. DeMaeyer-Guignard (1998). Type I interferons. *Int. Rev. Immunol.* **17**, 53–73.
- Diener, K., X. Wang, C. Chen, C. Meyer, G. Keesler, M. Zukowski, T. Tan, & Z. Yao (1997). Activation of the c-Jun N-terminal kinase pathway by a novel protein kinase related to human germinal center kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9687–9692.
- Dinarello, C. (1991). Inflammatory cytokines: interleukin-1 and tumor necrosis factor as effector molecules in autoimmune diseases. *Curr. Opin. Immunol.* **3**, 941–948.
- Diskin, R., D. Engelberg, & O. Livnah (2007). High-resolution diffracting crystals of intrinsically active p38 α MAPK: a case study for low-throughput approaches. *Acta Cryst. D* **63**, 260–265.
- Dominguez, C., R. Boelens, & A. Bonvin (2003). HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *JACS* **125**, 1731–1737.
- Dowell, J., D. Minna, & P. Kirkpatrick (2005). Erlotinib hydrochloride. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 13–14.
- Druker, B., S. Tamura, E. Buchdunger, S. Ohno, G. Segal, S. Fanning, J. Zimmermann, & N. Lydon (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.* **2**, 561–566.
- Dyson, H. & P. . Wright (1998). Equilibrium NMR studies of unfolded and partially folded proteins. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 499–503.
- Drijard, B., M. Hibi, I. Wu, T. Barrett, B. Su, T. Deng, M. Karin, & R. Davis (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**, 1025–1037.
- Drijard, B., J. Raingeaud, T. Barrett, I. Wu, J. Han, R. Ulevitch, & R. Davis (1995). Independent human MAP kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* **267**, 682–685.

- Ebert, A., C. Wechselberger, I. Martinez-Lacaci, C. Bianco, H. Weitzel, & D. Salomon (2000). Expression and function of EGF-related peptides and their receptors in gynecological cancer—from basic science to therapy. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **20**, 1–46.
- Enslin, H., D. Brancho, & R. Davis (2000). Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *EMBO J.* **19**, 1301–1311.
- Ferrell, J. (1997). How responses get more switch like as you move down a protein kinase cascade. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 288–289.
- Fiaux, J., E. Bertelsen, A. Horwich, & K. Wüthrich (2004). Uniform and residue-specific ^{15}N -labeling of proteins on a highly deuterated background. *J. Biomol. NMR* **29**, 289–297.
- Fitzgerald, C., S. Patel, J. Becker, P. Cameron, D. Zaller, V. Pikounis, S. O’Keefe, & G. Scapin (2003). Structural basis for p38 MAP Kinase quinazolinone and pyridolpyrimidine inhibitor specificity. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 764–769.
- Gaestel, M. (2006). MAPKAP kinases - MKs - two’s company, three’s a crowd. *Nature Rev.* **7**, 120–130.
- Gallagher, T., G. Seibel, S. Kassis, J. Laydon, M. Blumenthal, J. Lee, J. Boehm, S. Fier-Thompson, J. Abt, M. Soreson, J. Smietana, R. Hall, R. Garigipati, P. Bender, K. Erhard, A. Krog, G. Hofmann, P. Sheldrake, P. McDonnell, S. Kumar, P. Young, & J. Adams (1997). Regulation of stress-induced cytokine production by pyridinylimidazoles; inhibition of CSBP kinase. *Bioorg. Med. Chem.* **5**, 49–64.
- Gardner, K. & L. Kay (1998). The use of ^2H , ^{13}C , ^{15}N multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 357–406.
- Ge, B., H. Gram, F. DiPadova, B. Huang, L. New, R. Ulevitch, Y. Luo, & J. Han (2002). MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science* **295**, 1291–1294.
- Gill, S. & P. von Hippel (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319–326.

- Goedert, M., A. Cuenda, M. Craxton, R. Jakes, & P. Cohen (1997). Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *EMBO J.* **16**, 3563–3571.
- Goh, C., D. Milburn, & M. Gerstein (2004). Conformational changes associated with protein-protein interactions. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **14**, 104–109.
- Grodberg, J. & J. J. Dunn (1988). ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* **170**, 1245–1253.
- Groom, L., A. Sneddon, D. Alessi, S. Dowd, & S. Keyse (1996). Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase. *EMBO J.* **15**, 3621–3632.
- Grzesiek, S. & A. Bax (1993). The importance of not saturating H₂O in protein NMR. Application to sensitivity enhancement and NOE measurements. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 12593–12594.
- Güntert, P., W. Braun, & K. Wüthrich (1991). Efficient computation of three-dimensional protein structures in solution from nuclear magnetic resonance data using the program DIANA and the supporting programs CALIBA, HABAS and GLOMSA. *J. Mol. Biol.* **217**, 517–530.
- Gustin, M., J. Albertyn, M. Alexander, & K. Davenport (1998). MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1264–1300.
- Hajduk, P., J. Mack, E. Olejniczak, C. Park, P. Dandliker, & B. Beutel (2004). SOS-NMR: A saturation transfer NMR-based method for determining the structures of protein-ligand complexes. *JACS* **126**, 2390–2398.
- Hall, A. (2000). In *GTPases*. Oxford Unity Press.
- Hamilton, M. & A. Wolfman (1998). Ha-ras and N-ras regulate MAPK activity by distinct mechanisms in vivo. *Oncogene* **16**, 1417–1428.

- Han, J., J. Lee, L. Bibbs, & R. Ulevitch (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**, 808–811.
- Hancock, C., A. Macias, E. Lee, S. Yu, A. Mackerell, & P. Shapiro (2005). Identification of novel extracellular signal-regulated kinase docking domain inhibitors. *J. Med. Chem.* **48**, 4586–4595.
- Hansen, M., L. Mueller, & A. Pardi (1998). Tunable alignment of macromolecules by filamentous phage yields dipolar coupling interactions. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 1065–1074.
- Hayward, S. (2001). Peptide-plane flipping in proteins. *Prot. Sci.* **10**, 2219–2227.
- Heldin, C., A. Ostman, & L. Rönstrand (1998). Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1379**, 79–113.
- Henzler-Wildman, K. & D. Kern (2007). Dynamic personalities of proteins. *Nature* **450**, 964–972.
- Hesse, M., H. Meier, & B. Zeeh (2002). In *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Hill, J. & J. Sauer (1994). Molecular mechanics potential for silica and zeolite catalysts based on ab initio calculations. 1. Dense and microporous silica. *J. Phys. Chem.* **98**, 1238–1244.
- Hubbard, S. (1999). Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **71**, 343–358.
- Ikura, M. & A. Bax (1992). Isotope-Filtered 2D NMR of a Protein-Peptide Complex: Study of a Skeletal Muscle Myosin Light Chain Kinase Fragment Bound to Calmodulin. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 2433–2440.
- Iyer, G., S. Garrod, V. Woods, & S. Taylor (2005). Catalytic independent functions of a protein kinase as revealed by a kinase-dead mutant: study of the Lys72His mutant of cAMP-dependent kinase. *J. Mol. Biol.* **351**, 1110–1122.
- Jarvis, B. & B. Faulds (1999). Etanercept: a review of its use in rheumatoid arthritis. *Drugs* **57**, 945–966.

- Ji, T., M. Grossmann, & I. Ji (1998). G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J. Biol. Chem.* **273**, 17299–17302.
- Johnson, G. & R. Lapadat (2002). Mitogen activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK and p38 protein kinases. *Science* **298**, 1911–1912.
- Kaminska, B. (2005). MAPK signaling pathways as molecular targets for antiinflammatory therapy - from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim. Biophys. Acta* **1754**, 253–262.
- Kay, L. (1998). Protein dynamics from NMR. *Nature Struct. Biol.* **5**, 513–517.
- Keller, R. (2004). In *The computer aided resonance assignment tutorial*. Cantina Verlag: Goldau.
- Keltner, N. & A. Gorman (2007). Second messengers. *Pers. Psychiatr. Care* **43**, 60–64.
- Khokhlatchev, A., B. Canagarajah, J. Wilsbacher, M. Robinson, M. Atkinson, & M. Cobb (1998). Phosphorylation of the MAP Kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* **93**, 605–615.
- Kornev, A., N. Haste, S. Taylor, & L. Eyck (2006). Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *PNAS* **103**, 17783–17788.
- Koshland, D. (1958). Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **44**, 98–104.
- Krupa, A., G. Preethi, & N. Srinivasan (2004). . *J. Mol. Biol.* **339**, 1025–1039.
- Kumar, S., B. Ma, C. Tsai, N. Sinha, & R. Nissinov (2000). Folding and binding cascades: dynamic landscapes and population shifts. *Prot. Sci.* **9**, 10–19.
- Kumar, S., P. McDonnell, R. Gum, A. Hand, J. Lee, & P. Young (1997). Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**, 533–538.
- Kyriakis, J., H. App, X. Zhang, P. Banerjee, D. Brautigan, U. Rapp, & J. Avruch (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* **358**, 417–421.

- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lander, E., L. Linton, B. Birren, & C. Nusbaum (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921.
- Lange, O., N. Lakomek, C. Fares, G. Schröder, K. Walter, S. Becker, J. Meiler, H. Grubmüller, C. Griesinger, & B. Groot (2008). Recognition dynamics up to microseconds revealed from an RDC-derived ubiquitin ensemble in solution. *Science* **320**, 1471–1475.
- Langer, T., M. Vogtherr, B. Elshorst, M. Betz, U. Schieborr, K. Saxena, & H. Schwalbe (2004). NMR Backbone Assignment of a protein kinase catalytic domain by a combination of several approaches: Application to the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Chem. Biochem.* **5**, 1508–1516.
- Laufer, S., G. Ahrens, S. Karcher, J. Hering, & R. Niess (2006). Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Phenylamino-Substituted 6,11-Dihydro-dibenzo[b,e]oxepin-11-ones and Dibenzo[a,d]cycloheptan-5-ones: Novel p38 MAP Kinase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **49**, 7912–7915.
- Lee, J., A. Badger, D. Griswold, D. Dunnington, A. Truneh, B. Votta, J. White, P. Young, & P. Bender (1993). Bicyclic imidazoles as a novel class of cytokines biosynthesis inhibitors. *Ann. NY Acad. Sci.* **696**, 149–170.
- Lee, J., J. Laydon, P. McDonnell, T. Gallagher, S. Kumary, D. Green, D. McNulty, M. Blumenthal, J. Heys, S. Landvatter, J. Strickler, M. McLaughlin, I. Siemens, S. Fisher, G. Livvi, J. White, J. Adams, & P. Young (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* **372**, 739–746.
- LeMaster, D. & F. Richards (1988). NMR sequential assignment of *Escherichia coli* thioredoxin utilizing random fractional deuteration. *Biochemistry* **27**, 142–150.
- Levinson, N., O. Kuchment, K. Shen, M. Young, M. Koldobskiy, M. Karplus, P. Cole, & J. Kuriyan (2006). A Src-Like Inactive Conformation in the Abl Tyrosine Kinase Domain. *Plos Biol.* **4**, 753–77.
- Linge, J., S. O'Donoghue, & M. Nilges (2001). *Methods Enzymol.* **339**, 71–90.

- Liverton, N. & J. Butcher (1999). Design and synthesis of potent, selective and bioavailable tetrasubstituted imidazole inhibitors of p38 mitogen activated protein kinase. *J. Med. Chem.* **42**, 2180–2190.
- Lodish, H., A. Berk, S. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, & J. Darnell. , booktitle = Molekulare Zellbiologie, publisher = Spektrum Akademischer Verlag, 4. Auflage, Heidelberg, Berlin, editor = , year = 2001, pages = .
- Ma, B., M. Shatzky, H. Wolfson, & R. Nussinov (2002). Multiple diverse ligands binding at a single protein site: a matter of pre-existing populations. *Prot. Sci.* **11**, 184–197.
- Manning, G., D. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, & S. Sundarsanam (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912–1932.
- Marion, D., M. Ikura, R. Tschudin, & A. Bax (1989). Rapid recording of 2D NMR spectra without phase cycling. Application to the study of hydrogen exchange in proteins. *J. Magn. Reson.* **85**, 393–399.
- Matsukawa, J., A. Matsuzawa, K. Takeda, & H. Ichijo (2004). The ASK1-MAP Kinase cascades in mammalian stress response. *J. Biochem.* **136**, 261–265.
- Matsuzawa, A., K. Saegusa, T. Noguchi, C. Sadamitsu, H. Nishitoh, S. Nagai, S. Koyasu, K. Matsumoto, K. Takeda, & H. Ichijo (2005). ROS-dependent activation TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat. Immunol.* **6**, 587–592.
- Maxam, A. & W. Gilbert (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 560–564.
- Meier, R., J. Rouse, A. Cuenda, A. Nebreda, & P. Cohen (1996). Cellular stresses and cytokines activate multiple mitogen-activated-protein kinase kinase homologues in PC12 and KB cells. *Eur. J. Biochem.* **236**, 796–805.
- Morisson, D., G. Heidecker, U. Rapp, & T. Copeland (1993). Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *J. Biol. Chem.* **268**, 17309–17316.
- Morrison, D. & R. Cutler (1997). The complexity of Raf-1 regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 174–179.

- Morrison, D. & R. Davis (2003). Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold protein in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 91–118.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, F. Faloona, G. Horn, & H. Erlich (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51 Pt 1**, 263–273.
- Nagar, B., O. Hantschel, M. Young, K. Scheffzek, D. Veach, W. Bornmann, B. Clarkson, G. Superti-Furga, & J. Kuriyan (2003). Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* **112**, 859–863.
- Natarajan, S., D. Wisnoski, S. Singh, J. S. and E.A. O’neill, C. Schwartz, C. Thompson, C. Fitzgerald, S. O’Keefe, S. Kumar, C. Hop, D. Zaller, D. Schmatz, & J. Doherty (2003). p38 MAP Kinase inhibitors part 1: design and development of a new class of potent and highly selective inhibitors based on 3,4-dihydropyridol(3,2-d)pyrimidone scaffold. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 273–276.
- Neuhaus, D. & M. Williamson (2000). In *The Nuclear Overhauser Effect in structural and conformational analysis*. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Neumayer, W., M. Groll, V. Lehmann, U. Antoneka, S. Kähler, J. Heesemann, & G. Wilharm (2004). Yersinia enterocolitica type III secretion chaperone SycH. Recombinant expression, purification, characterisation, and crystallisation. *Prot. Exp. Purif.* **35**, 237–247.
- Ohlenschläger, O., R. Ramachandran, K.-H. Gührs, B. Schlott, & L. Brown (1998). The NMR solution structure of the plasminogen-activator protein staphylokinase. *Biochemistry* **37**, 10635–10642.
- Orkin, S. (1996). Development of the hematopoietic system. *Curr. Opin. Genet. Dev* **6**, 597–602.
- Owens, D. & S. Keyse (2007). Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* **26**, 3203–3213.
- Oxenoid, K., H. Kim, J. Jacob, F. Sönnichsen, & C. Sanders (2004). NMR Assignments for a Helical 40 kDa Membrane Protein. *JACS* **126**, 5048–5049.

- Palmer, A. (1997). Probing molecular motion by NMR. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 732–737.
- Pargellis, C., L. Tong, L. Churchill, P. Cirillo, T. Gilmore, A. Graham, P. Grob, E. Hickey, N. Moss, S. Pav, & J. Regan (2002). Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 268–272.
- Pawson, T. & J. Scott (1997). Signalling through scaffold, anchoring and adaptor proteins. *Science* **278**, 2075–2080.
- Pearson, G., F. Robinson, T. Gibson, B. Xu, M. Karandikar, K. Berman, & M. Cobb (2001). Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocr. Rev.* **22**, 153–183.
- Peifer, C., G. Wagner, & S. Laufer (2006). New approaches to the treatment of inflammatory disorders small molecule inhibitors of p38 MAP Kinase. *Curr. Topics Med. Chem.* **6**, 113–149.
- Pellecchia, M., D. Meiningner, Q. Dong, E. Chang, R. Jack, & D. Sem (2002). NMR-based structural characterization of large protein-ligand interactions. *J. Biomol. NMR* **22**, 165–173.
- Piotto, M., V. Saudek, & V. Sklenář (1992). Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* **2**, 661–665.
- Prestegard, J., K. Mayer, H. Valafar, & G. Benison (2005). Determination of protein backbone structures from residual dipolar couplings. *Methods Enzymol.* **394**, 175–209.
- Purcell, E., H. Torrey, & R. Pound (1946). Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Phys. Rev.* **69**, 37–38.
- Raman, M., S. Earnest, K. Zhang, Y. Zhao, & M. Cobb (2007). TAO kinases mediate activation of p38 in response to DNA damage. *EMBO J.* **26**, 2005–2014.
- Regan, J., C. Pargellis, P. Cirillo, T. Gilmore, E. Hickey, G. Peet, A. Proto, A. Swinamer, & N. Moss (2003). The kinetics of binding to p38 MAP kinase by analogues of BIRB796. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 3101–3104.

- Rouse, J., P. Cohen, S. Trigon, M. Morgane, A. Alonso-Llamazares, D. Zamanillo, T. Hunt, & A. Nebreda (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* **78**, 1027–1037.
- Ruckert, M. & G. Otting (2000). Alignment of biological macromolecules in novel nonionic liquid crystalline media for NMR experiments. *JACS* **122**, 7793–7797.
- Rückert, M. & G. Otting (2000). Alignment of biological macromolecules in novel nonionic liquid crystalline media for NMR experiments. *JAKS* **122**, 7793–7797.
- Sambrook, J., F. Fritsch, & M. Maniatis. , booktitle = Molecular cloning: A laboratory manual, publisher = Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, editor = , year = 1989, pages = .
- Sanz, V., I. Arozarena, & P. Crespo (2000). Distinct carboxy termini confer divergent characteristics to the mitogen-activated protein kinase p38 α and its splice isoform Mxi2. *FEBS Lett.* **474**, 169–174.
- Sawyers, C. (2004). Targeted cancer therapy. *Nature* **294**, 294–297.
- Schuttelkopf, A. & D. van Alten (2004). PRODRG: A tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Cryst. D Biol. Cryst.* **60**, 1355–1363.
- Seger, R., D. Seger, F. Lozeman, N. Ahn, L. Graves, J. Campbell, L. Ericsson, M. Harrylock, A. Jensen, & E. Krebs (1992). Human T-cell mitogen-activated protein kinase kinases are related to yeast signal transduction kinases. *J. Biol. Chem.* **267**, 25628–25631.
- Shaka, A. J. & J. Keeler (1987). Broadband spin decoupling in isotropic lipids. *Prog. NMR Spectroscopy* **19**, 49–192.
- Shaka, A. J., J. Keeler, T. Frenkiel, & R. Freeman (1983). An improved sequence for broadband decoupling: Waltz-16. *J. Magn. Reson.* **52**, 335–338.
- Shuker, S., P. Hajduk, R. Meadows, & S. Fesik (1996). Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science* **274**, 1531–1534.

- Slack, D., O. Seternes, M. Gabrielsen, & S. Keyse (2001). Distinct binding determinants for ERK2/p38alpha and JNK map kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of map kinase phosphatase-1. *J. Biol. Chem.* **276**, 16491–16500.
- Smith, C., T. Farrah, & R. Goodwin (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* **76**, 959–962.
- Stancato, L., Y. Chow, K. Hutchison, G. Perdew, R. Jove, & W. Pratt (1993). Raf exists in a native heterocomplex with hsp90 and p50 that can be reconstituted in a cell-free system. *J. Biol. Chem.* **268**, 21711–21716.
- Su, Y., J. Han, S. Xu, M. Cobb, & E. Skolnik (1997). NIK is a new Ste20-related kinase that binds NCK and MEKK1 and activates the SAPK/JNK cascade via a conserved regulatory domain. *EMBO J.* **16**, 1279–1290.
- Swope, S., S. Moss, C. Blackstone, & R. Huganir (1992). Phosphorylation of ligand-gated ion channels: a possible mode of synaptic plasticity. *FASEB J.* **6**, 2514–2523.
- Takeda, K., T. Noguchi, & H. Ichijo (2006). ASK1 Signalosome: a signaling complex essential for cellular stress response. *J. Oral Biosci.* **48**, 7–11.
- Takeda, K., R. Shimosono, T. Noguchi, T. Umeda, Y. Morimoto, I. Naguro, K. Tobiume, M. Saitoh, A. Matsuzawa, & H. Ichijo (2007). Apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 2 functions as a mitogen-activated protein kinase kinase kinase in a heteromeric complex with ASK1. *J. Biol. Chem.* **282**, 7522–7531.
- Tanoue, T., M. Adachi, T. Moriguchi, & E. Nishida (2000). A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature Cell Biol.* **2**, 110–116.
- Thaimattam, R., R. Banerjee, R. Miglani, & J. Iqbal (2007). Protein kinase inhibitors: Structural insights into selectivity. *Curr. Pharm. Des.* **13**, 2751–2765.
- Theze, J., P. Alzari, & J. Bertoglio (1996). Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions. *Immunol. Today* **17**, 481–486.
- Tjandra, N. & A. Bax (1997). Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium. *Science* **287**, 1111–1114.

- Tjandra, N., J. Omichinski, A. Gronenborn, G. Clore, & A. Bax (1997). Use of dipolar ^1H - ^{15}N and ^1H - ^{13}C couplings in the structure determination of magnetically oriented macromolecules in solution. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 732–738.
- Tournier, C., P. Hess, D. Yang, J. Xu, T. Turner, A. Nimnual, D. Bar-Sagi, S. Jones, R. Flavell, & R. Davis (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* **288**, 870–874.
- Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 205–215.
- Tugarinov, V., V. Kanelis, & L. Kay (2006). Isotope labeling strategies for the study of high-molecular-weight proteins by solution NMR spectroscopy. *Nat. Prot.* **1**, 749–754.
- Tycko, R., F. Blanco, & Y. Ishii (2000). Alignment of biopolymers in strained gels: a new way to create detectable dipole-dipole couplings in high resolution biomolecular NMR. *JACS* **122**, 9340–9341.
- Uings, I. & S. Farrow (2000). Cell receptors and cell signalling. *J. Clin. Pathol.* **53**, 295–299.
- Vajpai, N., A. Strauss, G. Fendrich, S. Cowan-Jacob, P. Manley, S. Grzesiek, & W. Jahnke (2008). Solution Conformations and Dynamics of ABL Kinase-Inhibitor Complexes Determined by NMR Substantiate the Different Binding Modes of Imatinib/Nilotinib and Dasatinib. *J. Biol. Chem.* **283**, 18292–18302.
- Vogtherr, M., K. Saxena, S. Grimme, M. Betz, U. Schieberr, B. Pescatore, T. Langer, & H. Schwalbe (2005). NMR backbone assignment of the mitogen-activated protein (MAP) kinase p38. *J. Biomol. NMR* **32**, 175.
- Vogtherr, M., K. Saxena, S. Hoelder, S. Grimme, M. Betz, U. Schieberr, B. Pescatore, M. Robin, L. Delarbre, T. Langer, K. Wendt, & H. Schwalbe (2006). NMR characterization of kinase p38 dynamics in free and ligand-bound forms. *Angew. Chem. Int. Ed Eng.* **45**, 993–997.
- Vojtek, A. & J. Cooper (1995). Rho family members - activators of MAP kinase cascades. *Cell* **82**, 527–529.

- Wang, X., K. Diener, D. Jannuzzi, D. Trollinger, T. Tan, H. Lichtenstein, M. Zukowski, & Z. Yao (1996). Molecular cloning and characterization of a novel protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen-activated protein kinase kinase kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 31607–31611.
- Wang, Y., S. Huang, V. Sah, J. Ross, J. Brown, J. Han, & K. Chien (1998). Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J. Biol. Chem.* **273**, 2161–2168.
- Wang, Z., B. Canagarajah, J. Boehm, S. Kassis, M. Cobb, P. Young, S. Abdel-Meguid, J. Adams, & E. Goldsmith (1998). Structural basis of inhibitor selectivity in MAP kinases. *Structure* **6**, 1117–1128.
- Wang, Z., P. Harkins, R. Ulevitch, J. Han, M. Cobb, & E. Goldsmith (1997). The structure of mitogen-activated protein kinase p38 at 2.1-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2327–2332.
- Waugh, D. (1996). Genetic tools for selective labeling of proteins with α -¹⁵N-amino acids. *J. Biomol. NMR* **8**, 184–192.
- Weigelt, J., M. Dongen, J. Uppenberg, J. Schultz, & M. Wikström (2001). Site-selective screening by NMR spectroscopy with labeled amino acid pairs. *JACS* **124**, 2446–2447.
- Wells, A. (1999). EGF receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 637–643.
- Wilson, K., F. M.J., P. Caron, J. Griffith, W. Cheng, P. McCaffrey, S. Chambers, & M. Su (1996). Crystal structure of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 27696–27700.
- Wolf-Watz, M., V. Thai, K. Henzler-Wildman, G. Hadjipavlou, E. Eisenmesser, & D. Kern (2004). Linkage between dynamics and catalysis in a thermophilic-mesophilic enzyme pair. *Nat. Struct. Biol.* **11**, 945–949.
- Wu, M. & S. Wang (2008). Human TAO kinase 1 induces apoptosis in SH-SY5Y cells. *Cell Biol. Int.* **32**, 151–156.
- Xu, R., B. Ayers, D. Cowburn, & T. Muir (1999). Chemical ligation of folded recombinant proteins: segmental isotopic labeling of domains for NMR studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 388–393.

- Yang, S., P. Yates, A. Whitmarsh, R. Davis, & A. Sharrocks (1998). The Elk-1 ETS-domain transcription factor contains a mitogen-activated protein kinase targeting motif. *Mol. Cell Biol.* **18**, 710–720.
- Yasuda, J., A. Whitmarsh, J. Cavanagh, M. Sharma, & R. Davis (1999). The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol. Cell Biol.* **19**, 7245–7254.
- Yoon, S. & R. Seger (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Fac.* **24**, 21–44.
- Zaman, G., M. Lee, J. Kok, R. Nelissen, & E. Loomans (2006). Enzyme fragment complementation assay for p38 α mitogen-activated protein kinase to study the binding kinetics of enzyme inhibitors. *ASSAY Drug Dev. Tech.* **4**, 411–420.
- Zervos, A., L. Faccio, J. Gatto, J. Kyriakis, & R. Brent (1995). Mxi2, a mitogen-activated protein kinase that recognizes and phosphorylates Max protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10531–10534.
- Zhang, J., F. Zhang, D. Ebert, M. Cobb, & E. Goldsmith (1995). Activity of the MAP kinase ERK2 is controlled by a flexible surface loop. *Structure* **3**, 299–307.
- Zhang, J., B. Zhou, C. Zheng, & Z. Zhang (2003). A bipartite mechanism for ERK2 recognition by its cognate regulators and substrates. *J. Biol. Chem.* **278**, 29901–29912.
- Zheng, J., E. Trafny, D. Knighton, N. Xuong, S. Taylor, L. Eyck, & J. Sowadski (1993). 2.2 Å refined crystal structure of the catalytic subunit of cAMP dependent protein kinase complexed with MnATP and a peptide inhibitor. *Acta Cryst.D* **49**, 362–365.
- Zhou, J. & J. Adams (1997). Participation of ADP dissociation in the rate-determining step in cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* **36**, 15733–157387.
- Zhou, T., L. Sun, J. Humphreys, & E. Goldsmith (2006). Docking interactions induce exposure of activation loop in the MAP kinases ERK2. *Structure* **14**, 1011–1019.
- Zweckstetter, M. & A. Bax (2000). Prediction of sterically induced alignment in a dilute liquid crystalline phase: Aid to protein structure determination by NMR. *JACS* **122**, 3791–3792.

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Christian Griesinger, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und sich immer Zeit für Diskussionen und die Lösung von Problemen nahm sowie die guten Arbeitsbedingungen.

Ich danke Prof. Dr. Gerhard Klebe ganz herzlich, der es mir gestattete, mich als externe Doktorandin in seiner Arbeitsgruppe auf zu nehmen, deren Mitglied ich zu meiner Diplomarbeitszeit war.

Mein weiterer Dank gilt meinem Gruppenleiter Dr. Stefan Becker für die Betreuung sowie Karin Giller, die mich als Chemikerin mit viel Geduld in die Geheimnisse der Molekularbiologie einführte und immer ein offenes Ohr für alle Fragen und Problemchen hatte.

Dr. Nicolas Coudevylle für die Einführung in die NMR-Spektroskopie und seiner Hilfe bei der Aufnahme und Auswertung der Daten. Dr. Donghan Lee und Min-Kyu Cho für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und Hilfeleistung in allen NMR-Fragen.

Dr. Jochen Junker und Dr. Dirk Bockelmann für ihre Hilfsbereitschaft in allen Computerfragen.

Meinen Kollegen Edith Wöltjen, Benedikt Frank, Sebastian Himmel, Dr. Fernando Rodriguez-Castaneda und Dr. Monika Bayrhuber für das Ertragen meiner Launen, die aufbauenden Gespräche und die kurzweiligen Abende außerhalb des Instituts.

Meinen vier besten Freundinnen Christine Schmitt, Tina Fried, Kristina Vath und Christina Keintzel, deren unzerstörbare Freundschaft mir Stärke, Hoffnung und Zuversicht gibt und das Leben zu jederzeit lebenswert macht.

Dr. Holger Schmidt, der mir zur Seite stand, mich unterstützte und motivierte, der mir das Gute im Menschen zeigte und mir die notwendige Ablenkung von der stressigen Arbeit schenkte.

Meiner Schwester Stefanie, die immer für mich da war und Verständnis für meine Launen, Krisen und Probleme hatte.

Und natürlich meiner Mutter für die Unterstützung bei all meinen Entscheidungen. Für ihre immerwährende Begleitung auf meinem bisherigen Lebensweg, ohne deren Fürsorge und Verständnis ich vieles nicht gewagt hätte.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

Untersuchung von p38 α MAP-Kinase/Inhibitor-Komplexen in Lösung mittels Kernresonanzspektroskopie

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 22.08.2008