

**Proteindesign zur Verbesserung des
Nucleosidanaloga-Umsatzes in menschlichen Zellen:
Desoxycytidin-Kinase und UMP/CMP-Kinase**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen**

vorgelegt von
Stephan Ort
aus Witzenhausen

Göttingen 2005

D7

Referent: Prof. Dr. D. Gallwitz

Korreferent: PD Dr. S. Irniger

Tag der mündlichen Prüfung: 30. 6. 2005

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

- E. Sabini, S. Ort, C. Monnerjahn, M. Konrad und A. Lavie. Structure of human dCK suggests strategies to improve anticancer and antiviral therapy. *Nat. Struct. Biol.*, 10(7):513-9, 2003
- D. Segura-Pena, N. Sekulic, S. Ort, M. Konrad und A. Lavie. Substrate-induced conformational changes in human UMP/CMP kinase. *J. Biol. Chem.*, 279(32): 33882-9, 2004
- M. Godsey, S. Ort, E. Sabini, M. Konrad und A. Lavie. Structure of human deoxycytidine kinase in the presence and absence of the preferred phosphate donor product uridine diphosphate. Manuskript zur Einreichung vorbereitet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Nucleosidphosphat-Stoffwechsel	1
1.1.1	Menschlicher Nucleosid-Metabolismus	1
1.1.2	Unterschiede zwischen <i>E. coli</i> - und Säugetierzellen	2
1.2	Nucleosid-Kinasen	3
1.2.1	Die menschliche Desoxycytidin-Kinase	5
1.2.2	Die menschliche UMP/CMP-Kinase	6
1.3	Limitierende Faktoren in der Chemotherapie	6
1.3.1	Wirkstoffresistenzen	9
1.3.2	Desaminierung von Nucleosiden	9
1.4	Gen- und proteintherapeutische Strategien	11
1.4.1	Gentherapeutische Ansätze	11
1.4.2	Proteintransduktion	12
1.5	Zielsetzung	14
2	Material	15
2.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	15
2.2	Plasmide	15
2.3	Oligonucleotide	16
2.4	Enzyme	18
2.5	Chemikalien und Medienzusätze	18
2.6	Verbrauchsmaterialien	19
2.7	Geräte	19
2.8	Lösungen und Puffer	20
2.9	Wissenschaftliche Computerprogramme	22
3	Methoden	23
3.1	Molekularbiologische Methoden	23
3.1.1	Nährmedien für <i>E. coli</i>	23
3.1.2	Anzucht von <i>E. coli</i> -Kulturen	23
3.1.3	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	24
3.1.4	DNA-Präparationen	24
3.1.5	Bestimmung der DNA-Konzentration	25
3.1.6	Enzymatische Behandlung von DNA	26
3.1.7	Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese	27
3.1.8	DNA-Isolierung aus präparativen Gelen	28
3.1.9	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen (Hitzeschock-Methode)	29

3.1.10	DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion	29
3.1.11	Kolonie-PCR	30
3.1.12	Gerichtete Mutagenese mit der PCR	31
3.2	Isolierung von Proteinen aus <i>E. coli</i>	33
3.2.1	Expression im analytischen Maßstab	33
3.2.2	Expression von His ₆ -Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	33
3.2.3	Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	35
3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	38
3.3.1	Bradford-Test	38
3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration durch UV-Absorption	38
3.4	Analyse von Proteinen durch SDS-PAGE	38
3.5	Isotherme Titrationskalorimetrie	40
3.6	Proteintransduktion	42
3.7	Kinetische Methoden	43
3.7.1	Messung der Enzymaktivität	43
3.7.2	Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter	46
3.7.3	Desaminase-Test	49
4	Ergebnisse	51
4.1	Die menschliche Desoxycytidin-Kinase	51
4.1.1	Enzymatische Aktivitäten	52
4.1.2	Kalorimetrische Bindungsmessungen	53
4.1.3	Kristallstruktur	55
4.1.4	Substratspezifität	58
4.2	Die Rolle der „Insert“-Region in der menschlichen dCK	60
4.2.1	Deletionen der „Insert“-Region	60
4.2.2	Veränderung der Substratspezifität	61
4.2.3	Kristallstruktur der Deletionsmutante dCK Δ 1	63
4.3	Mutationen zur Verbesserung der Kinaseaktivität	67
4.3.1	Die universelle Desoxyribonucleosid-Kinase dNK von <i>Drosophila melanogaster</i>	67
4.3.2	Die Dreifachmutante der menschlichen dCK	68
4.4	Die menschliche UMP/CMP-Kinase	74
4.4.1	Enzymatische Aktivitäten	75
4.4.2	Die offene Konformation	77
4.4.3	Substratspezifität	85
4.5	Die menschlichen Cytidin-Desaminasen	88
4.5.1	Die Cytidin-Desaminase	88
4.5.2	Die Desoxycytidylat-Desaminase	89
4.6	Proteintransduktion von dCK-Varianten in menschliche Zellen	92
5	Diskussion	97
5.1	Die menschliche Desoxycytidin-Kinase	97
5.1.1	Veränderung der Substratspezifität	102
5.1.2	Verbesserung der Kinaseaktivität	104
5.2	Die menschliche UMP/CMP-Kinase	107
5.3	Die menschlichen Cytidin-Desaminasen	112

5.4 Anwendung der dCK-Varianten in menschlichen Zellen	114
6 Zusammenfassung	119
A Anhang	121
A.1 Nucleotidsequenzen	121
A.1.1 Die menschliche dCK	121
A.1.2 Die menschliche UMP/CMP-Kinase	122
A.1.3 Die <i>Drosophila melanogaster</i> dNK	124
A.1.4 Die menschliche Cytidin-Desaminase	125
A.1.5 Die menschliche Desoxycytidylat-Desaminase	126
A.2 Abkürzungsverzeichnis	128
B Literaturverzeichnis	131
C Danksagung	143
D Lebenslauf	145

1 Einleitung

1.1 Nucleosidphosphat-Stoffwechsel

1.1.1 Menschlicher Nucleosid-Metabolismus

Die Synthesewege des Nucleosidphosphat-Stoffwechsels sind, bis auf einige wichtige Ausnahmen, in allen Organismen weitgehend konserviert (Neuhard und Kelln, 1996; Zalkin und Nygaard; Hatse et al., 1999; Van Rompay et al., 2000). Den Stoffwechsel der Nucleoside kann man allgemein in zwei Bereiche aufteilen, für die getrennte Synthesewege vorhanden sind. Der erste Bereich dient der Bereitstellung von Desoxyribonucleosiden für die DNA-Synthese, der zweite Bereich liefert Ribonucleoside für die RNA-Synthese. Jeder Bereich läßt sich dabei noch einmal in die Pyrimidin- und die Purin-Synthese unterteilen. In den meisten Organismen gibt es darüber hinaus jeweils für die Pyrimidine und Purine zwei verschiedene, teilweise überlappende Wege: den *de novo*-Syntheseweg (Neu-Synthese) und den „Salvage“-Syntheseweg (Wiederverwertungsweg).

Bei der *de novo*-Synthese werden die Bausteine von Grund auf neu aufgebaut. Das Schlüsselenzym des *de novo*-Syntheseweges ist die Ribonucleotid-Reduktase, die die Reduktion der 2'-OH-Gruppe des Nucleosiddiphosphates katalysiert (Reichard, 1988; Reichard und Ehrenberg, 1983).

Die Funktion des „Salvage“-Syntheseweges ist es, bereits vorhandene Nucleobasen und Nucleoside zum Aufbau von Nucleotiden wiederzuverwerten. Diese Vorläufermoleküle können aus intrazellulärem DNA- und RNA-Abbau oder aus extrazellulär aufgenommenen Quellen (z. B. Nahrung) stammen. Durch das Wiederverwerten wird Energie bei der Synthese von Nucleosiden gespart. Die Schlüsselenzyme des „Salvage“-Syntheseweges sind die Desoxyribonucleosid-Kinasen, die die Phosphorylierung der Desoxyribonucleo-

side zu den Desoxyribonucleosidmonophosphaten katalysieren (Arner und Eriksson, 1995).

Die Nucleosid-Kinasen spielen eine wesentliche Rolle in einer Vielzahl intrazellulärer Prozesse. Sie sind an der Synthese, dem Abbau und der Umwandlung des Phosphorylierungszustandes von Nucleosiden beteiligt. Die Hauptaufgabe des Nucleosidphosphat-Stoffwechsels ist die Bereitstellung von Nucleosidtriphosphaten (NTPs). Diese werden z. B. für die Energiebereitstellung, die chemische Aktivierung von Substraten durch Phosphorylierung, die Signaltransduktion, die RNA- und DNA-Synthese und für den Stoffwechsel von Fetten und Lipiden benötigt (Berg et al., 2003). Anhand des Phosphorylierungsschrittes, der katalysiert wird, lassen sich die Kinasen des Nucleosidphosphat-Stoffwechsels in drei Klassen einteilen: Die Nucleosid-Kinasen (NKs) katalysieren den Übergang vom unphosphorylierten Nucleosid zum Nucleosidmonophosphat, die Nucleosidmonophosphat-Kinasen (NMP-Kinasen) katalysieren den Übergang zum Diphosphat und die Nucleosiddiphosphat-Kinasen (NDP-Kinasen) katalysieren den letzten Phosphorylierungsschritt, den Übergang zum Triphosphat.

Bei der Entwicklung von antiviral, antibakteriell oder antitumoral wirkenden Substanzen sind die Nucleosid-Kinasen äußerst interessante Zielproteine. Die Synthese von Analoga natürlicher Desoxyribonucleoside ist eine weit verbreitete Strategie bei der Suche nach Inhibitoren viraler und zellulärer DNA-Replikation. Da zur Aktivierung dieser Analoga eine intrazelluläre Phosphorylierung durch die Nucleosid- und Nucleotid-Kinasen zu den entsprechenden Triphosphaten notwendig ist (siehe Abb. 1.2 auf Seite 7), bietet die Charakterisierung dieser Enzyme weitere Ansatzpunkte zur Verbesserung der Wirksamkeit der verwendeten Analoga. Die Phosphorylierung von Nucleosidanaloga zu den entsprechenden Nucleosidmono- und Nucleosiddiphosphaten (NMPs und NDPs) ist dabei in vielen Fällen der begrenzende Schritt zur pharmakologischen Aktivierung verschiedener Nucleosidanaloga (Mansson et al., 2003; Van Rompay et al., 2003).

1.1.2 Unterschiede zwischen *E. coli*- und Säugetierzellen

In Prokaryonten gibt es kein einheitliches Bild der Desoxyribonucleosid-Kinasen. *E. coli* besitzt als einzige Desoxyribonucleosid-Kinase die Thymidin-Kinase (Tdk), die phylogenetisch mit der Thymidin-Kinase 1 (TK1) von Säugetieren verwandt ist (Piskur

et al., 2004). Die Fähigkeit, Desoxycytidin (dCyt), Desoxyadenosin (dAde) und Desoxyguanosin (dGuo) direkt zu phosphorylieren, scheint bei *E. coli* zu fehlen (Ives und Ikeda, 1998). *E. coli* verstoffwechselt dCyt durch Desaminierung mit Hilfe der induzierbaren Cytidin-Desaminase zu dUrd, welches dann von der Thymidin-Kinase oder der Thymidin-Phosphorylase weiter verwertet wird. Dies erklärt das Unvermögen von *E. coli* dCyt, im Gegensatz zu Thd, direkt für den Aufbau von DNA zu verwenden (Karlstrom, 1970). In *Lactobacillus acidophilus*, der keine Ribonucleotid-Reduktase besitzt, werden die vier Desoxyribonucleoside von drei verschiedenen Enzymen phosphoryliert (Ives und Ikeda, 1998). Neben der *E. coli* ähnlichen Thymidin-Kinase gibt es zwei Komplexe aus Kinasen (Heterodimere), die dCyt, dAde und dGuo phosphorylieren können (Ikeda et al., 1994).

Menschliche Zellen besitzen im Gegensatz zu Prokaryonten einen regulierten Zellzyklus. Durch diesen Umstand unterscheiden sich die verwendeten Synthesewege je nach Phase des Zellzyklus. Während der Replikation der Zelle besteht ein hoher Bedarf an dNTPs, der hauptsächlich durch den *de novo*-Syntheseweg bedient wird. In nicht-proliferierenden Zellen hingegen wird der größte Teil des Bedarfes an Nucleosiden durch den „Salvage“-Syntheseweg zur Verfügung gestellt. Da hier ein geringer Bedarf an dNTPs besteht, ist dies ausreichend.

1.2 Nucleosid-Kinasen

Desoxyribonucleosid-Kinasen (dNK) katalysieren die Phosphorylierung von Desoxyribonucleosiden zu den entsprechenden Desoxyribonucleosidmonophosphaten (dNMP). Sie sind daher die Schlüsselenzyme für die Wiederverwertung von Desoxyribonucleosiden, die extrazellulär aus Nahrung und Medium oder intrazellulär aus dem Abbau von DNA stammen (Arner und Eriksson, 1995).

In Säugetierzellen und Gewebe findet man insgesamt vier verschiedene Desoxyribonucleosid-Kinasen, die für den ersten Phosphorylierungsschritt vom unphosphorylierten Substrat zuständig sind. Zwei dieser Nucleosid-Kinasen sind cytosolisch lokalisiert: Desoxycytidin-Kinase (dCK) und Thymidin-Kinase 1 (TK1). Thymidin-Kinase 2 (TK2) und Desoxyguanosin-Kinase (dGK) sind dagegen in

	1	„P-Loop“										50
hdCK	MATPPKRSCP	SFSASSE	EGTR	IKKISI	EGNI	AAGKSTFVNI	LKQLCEDWEV					
hdGK	MAKSELEGVS	SSRGLH	AGRG	PRRLSI	EGNI	AVGKSTFVKL	LTKTYPEWHV					
hdTK2	~~~~VQRYAW	PPDKQE	KEK	KSVICV	EGNI	ASGKTTCL	LEF	FSNA	.	TI	VEV	
	51	„Insert“-Region										100
hdCK	VPEPVARWCN	VQSTQDEF	EE	LTMSQK	NGGN	VLQMMYEKPE	RWSFTFQTYA					
hdGK	ATEPVATWQN	IQAAG...	KQ	KACTAQ	SLGN	LLDMMYREPA	RWSYTFQTF					
hdTK2	LTEPVSKWRN	VR.....		GHN	PLGLMYHDAS	RWGLTLQTY.					
	101	„ERS“										150
hdCK	CLSRIRAQLA	SLNGK	LKDAE	KPVLFF	FERSV	YSDRYIFASN	LYSEECMNET					
hdGK	FLSRLKVLQLE	PFPEKL	LQAR	KPVQIF	FERSV	YSDRYIFAKN	LFENGSLSDI					
hdTK2VQLT	MLDRHT	HPQV	SSVRLM	ERSI	HSARYIFVEN	LYRSGKMPEV					
	151	„Lid“-Region										200
hdCK	EWTLIYQD	WMNNQ	FGQSL	ELDGII	YLQA	TPETCLHRIY	LRGRNEEQGI					
hdGK	EWHLIYQD	FWLW	EFASRI	TLHGFI	YLQA	SPQVCLKRLY	QFAREEEKGI					
hdTK2	DYVVLSEW	FD	WILRNMDVSV	DL..IV	YLRT	NPETCYQRIK	KRCREEEKVI					
	201											247
hdCK	FLYLEK	LHY	KHESW	LLHRT	LKTNFD	YLQE	VPILTLDVNE	DFKD...	KYE			
hdGK	ELAYLE	QLHG	QHEAW	LIHKT	TKLHFE	ALMN	IPVLVLDVND	DFSEEV	TKQE			
hdTK2	FLYLEA	AIHH	LHEEW	LIGS	I.....	FPMA	APVLVIEADH	HMERML	LELFE			
	248		260									
hdCK	SLVEKVK	EFL	STL	*~~								
hdGK	DLMREV	NTEFV	KNL	*~~								
hdTK2	QNRDR	ILTPE	NRKH	CP								

Abbildung 1.1: Sequenzvergleich der menschlichen Desoxyribonucleosid-Kinasen dCK, dGK und TK2 (Swiss-Prot: P27707, Q16854, O00142). Konservierte Reste in allen drei Nucleosid-Kinasen sind in Blau eingefärbt. Rote und orangene Färbung zeigen Aminosäuren mit starker und geringer Ähnlichkeit innerhalb der drei Kinasen.

den Mitochondrien lokalisiert (Arner und Eriksson, 1995; Eriksson et al., 2002). Die Nucleosid-Kinasen dCK, dGK und TK2 zeigen hohe Sequenzähnlichkeit (siehe Abb. 1.1).

Von diesen drei Nucleosid-Kinasen unterscheidet sich die menschliche TK1 auf der Sequenzebene wesentlich. Sie ist darüber hinaus, im Gegensatz zu den anderen drei Nucleosid-Kinasen, durch den Zellzyklus reguliert. Zusätzlich gibt es zwei Nucleosid-Kinasen, die hauptsächlich oder ausschließlich Ribonucleoside phosphorylieren: Uridin/Cytidin-Kinase (UCK) und Adenosin-Kinase (AK). Die AK spielt eine wichtige Rolle im ATP-Haushalt und zeigt eine Funktion als Regulator der extrazellulären und der intrazellulären Konzentrationen von Adenosin-Nucleotiden (Spychala et al., 1996). Die Uridin/Cytidin-Kinase, von der es die zwei Formen UCK 1 und UCK 2

mit einer Sequenzidentität von 69 % gibt, kann ausschließlich Ribonucleoside (Uridin und Cytidin) und deren Analoga phosphorylieren (Suzuki et al., 2004).

Die herausragende physiologische Bedeutung der Desoxyribonucleosid-Kinasen zeigt sich auch in den schweren Krankheiten, die durch eine Fehlfunktion der dNKs ausgelöst werden können. Neuere Untersuchungen belegen, daß mutierte oder defiziente mitochondriale Desoxyribonucleosid-Kinasen zu einem „Mitochondrial DNA-Depletion“-Syndrom führen (Saada-Reisch, 2004). Die betroffenen Patienten leiden an einer extremen Myopathie oder an hepatozerebralen Fehlfunktionen, die zu einer Lebenserwartung von weniger als vier Jahren führen (Mandel et al., 2001; Saada et al., 2001). Desweiteren sind die dNKs des „Salvage“-Syntheseweges von großer Bedeutung in der Behandlung von Virus- und Krebserkrankungen durch die Phosphorylierung wichtiger antiviraler und Anti-Krebs-Wirkstoffe.

1.2.1 Die menschliche Desoxycytidin-Kinase

Die menschliche Desoxycytidin-Kinase (dCK) katalysiert die Phosphorylierung von dCyt zu dCMP unter Verwendung von ATP oder UTP als Phosphatdonor (Chotiner et al., 1991; Johansson und Karlsson, 1995). Das Enzym hat ein breites Substratspektrum und kann neben dCyt auch dAde und dGuo phosphorylieren. Die dCK spielt dadurch eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung eines normalen Desoxyribonucleosid-Pools für die DNA-Synthese und die DNA-Reparatur in den Zellen. Zusätzlich ist die dCK an der Aktivierung von antiviralen und Anti-Krebs-Wirkstoffen beteiligt, wie z. B. AraC (Cytarabin), dFdC (Gemcitabin) und 5-Aza-Desoxycytidin (Decitabin) (siehe Abb. 1.3 auf Seite 8).

Das Nucleosidanalogen AraC ist einer der effektivsten Wirkstoffe bei der Behandlung von Leukämie (Grant, 1998). Gemcitabin wird häufig bei der Behandlung von Tumoren eingesetzt (van Moorsel et al., 1997). Für die Bildung von pharmakologisch aktivem AraCTP wird der limitierende Phosphorylierungsschritt von der dCK katalysiert (Plunkett et al., 1987; Jamieson et al., 1990). Die dCK wird im Gegensatz zur menschlichen TK1 konstant exprimiert und ist nicht durch den Zellzyklus reguliert (Arner und Eriksson, 1995).

1.2.2 Die menschliche UMP/CMP-Kinase

Die menschliche UMP/CMP-Kinase gehört zur Gruppe der Nucleosidmonophosphat-Kinasen (NMP-Kinasen). Diese Gruppe katalysiert die reversible Übertragung einer Phosphorylgruppe von NTPs (meist ATP) auf NMPs. Die entstehenden Nucleosiddiphosphate (NDPs) werden dann von Nucleosiddiphosphat-Kinasen (NDP-Kinasen) zu der Triphosphatform phosphoryliert.

In menschlichen Zellen gibt es zwei Pyrimidin-spezifische NMP-Kinasen: die Thymidylat-Kinase (TMPK) und die UMP/CMP-Kinase (UMPK). Die Thymidylat-Kinase phosphoryliert dTMP und dUMP, wohingegen die UMP/CMP-Kinase sowohl CMP und UMP als auch die Desoxyformen dCMP und dUMP phosphorylieren kann (Arima et al., 1977). Dadurch stellt sie Substrate für die NDP-Kinasen zur Verfügung, die dann in der triphosphorylierten Form sowohl für die DNA- als auch die RNA-Synthese verwendet werden können.

Zu den Purin-spezifischen NMP-Kinasen zählen die Adenylat-Kinasen (ADKs) und die Guanylat-Kinase (GUK). In der Aktivierungskaskade von Nucleosidanaloga vollzieht die menschliche UMP/CMP-Kinase den zweiten Phosphorylierungsschritt nach der dCK (siehe Abb. 1.5 auf Seite 11). Sie ist dadurch ein wichtiger Faktor für die Aktivierung vieler klinisch relevanter Nucleosidanaloga, wie z. B. AraC und dFdC (Gemcitabin). Zusätzlich hat sie die bemerkenswerte Eigenschaft, L-Nucleotide im Vergleich zu den natürlichen D-Nucleotiden phosphorylieren zu können (Liou et al., 2002). Zu diesen L-Nucleotiden zählt z. B. 3TC (β -L-2',3'-Didesoxy-3'-Thiacytidin) (siehe Abb. 5.1 auf Seite 100), das in der Behandlung von HIV- und Hepatitis-B-Infektionen eingesetzt wird (Gumina et al., 2002).

1.3 Limitierende Faktoren in der Chemotherapie

Zur Behandlung zahlreicher Krebserkrankungen und auch viraler Infektionen wird häufig die Chemotherapie eingesetzt. Bei dieser Behandlungsmethode werden Wirkstoffe verabreicht, die die weitere Vermehrung von Krebszellen und Viren hemmen sollen. Angriffspunkte dieser Medikamente sind dabei die DNA- oder RNA-Synthese in den Zellen. Die hierfür eingesetzten Wirkstoffe gehören zu der Klasse der Nucleosidanaloga (NA).

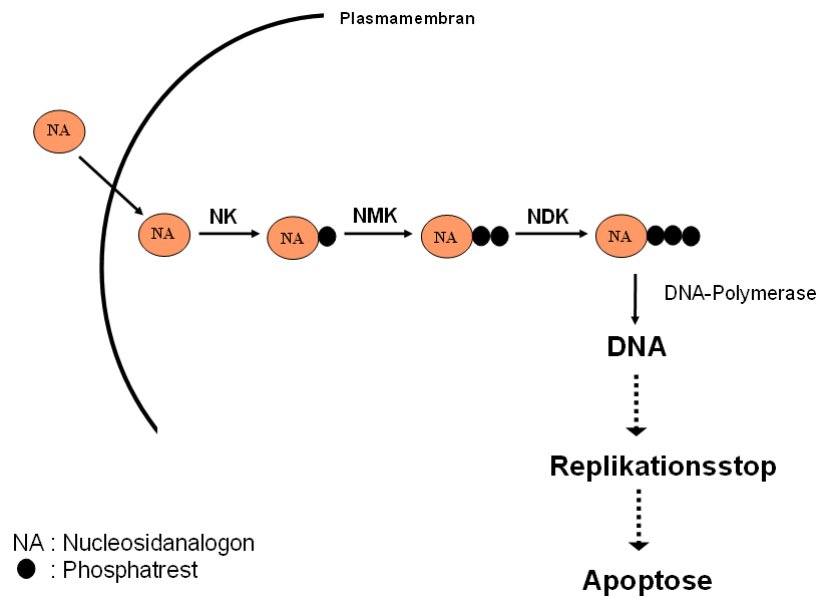


Abbildung 1.2: Vereinfachte Darstellung der Aktivierungskaskade von Nucleosidanaloga (NA) in der Zelle. Das NA wird über Transporter in die Zelle transportiert. Danach erfolgt die schrittweise Aktivierung des NA bis zum NA-Triphosphat: Nucleosid-Kinase (NK), Nucleosidmonophosphat-Kinase (NMK), Nucleosiddiphosphat-Kinase (NDK).

Das heißt, sie sind den natürlichen Nucleosiden ähnlich, aber an entscheidenden Stellen an der Ribose oder an der Base modifiziert. Diese modifizierten Nucleoside werden von den zelleigenen oder viralen DNA- und RNA-Polymerasen in vielen Fällen als relativ gute Substrate erkannt und somit in die DNA oder RNA eingebaut. Die eigentliche Wirkung dieser Nucleosidanaloga kann sich dann je nach Substanz auf verschiedene Weise zeigen. Nucleosidanaloga, die keine reaktive 3'-Hydroxylgruppe haben (z. B. Didoxycytidin, ddC), führen zum Kettenabbruch der DNA-Synthese, da es nicht zur Strangverlängerung kommen kann. Andere Nucleosidanaloga (z. B. AraC, dFdC) erlauben zwar eine Strangverlängerung während der DNA-Synthese, führen aber dann durch ihren modifizierten Ribose-Anteil zu instabilen DNA-Strukturen. Die Auswirkungen davon, z. B. Strangbrüche oder Replikationsstopp, führen letztendlich zur Apoptose der Zelle (siehe Abb. 1.2). Desoxycytidinanaloga müssen erst in der Zelle phosphoryliert werden, um als Medikament aktiv wirken zu können. Beispiele von Nucleosidanaloga, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind AraC (Cytarabin), dFdC (Gemcitabin) und 5-Aza-Desoxycytidin (Decitabin) (siehe Abb. 1.3 auf der nächsten Seite).

AraC unterscheidet sich von dem physiologischen Nucleosid Desoxycytidin nur im Ribose-Anteil durch eine Hydroxylgruppe an der 2'-Arabinose Position (siehe Abb.

1.3). Durch die geringen Unterschiede verhält sich das Nucleosidanalogen wie das physiologische Substrat bis zur Ebene des Triphosphates. Erst nach dem Einbau des AraC-Triphosphates in die DNA kommt es zu Veränderungen während der DNA-Replikation (Dumontet et al., 1999). Gemcitabin (dFdC) ist ebenfalls ein Ribose-modifiziertes Nucleosidanalogen mit unveränderter Base. Dieser deutlich zytotoxische Wirkstoff besitzt an der 2'-Position der Ribose zwei Fluoratome.

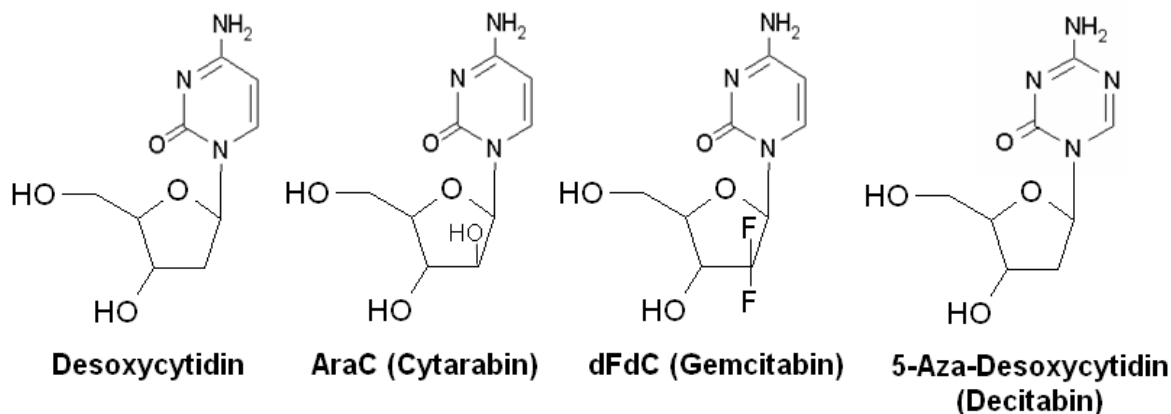


Abbildung 1.3: Vergleich der Nucleosidanaloga AraC, dFdC und 5-Aza-Desoxycytidin mit dem natürlichen Substrat Desoxycytidin.

Gemcitabin (dFdC) wird durch Nucleosid-Kinasen intrazellulär zu den wirksamen Diphosphat- und Triphosphatformen (dFdCDP und dFdCTP) metabolisiert. Die zytotoxische Wirkung von Gemcitabin scheint auf drei Mechanismen zu beruhen: dFdCDP hemmt die Ribonucleotid-Reduktase, die die Ribonucleosiddiphosphate zu den Desoxyribonucleosiddiphosphaten reduziert, dFdCTP konkurriert mit dCTP um den Einbau in die DNA und hemmt die Desoxycytidylat-Desaminase (siehe Kap. 1.3.2 auf der nächsten Seite) (Abbruzzese, 2002). Die Hemmung der Ribonucleotid-Reduktase durch dFdCDP bewirkt eine Verminderung oder Unterbrechung der *de novo*-Synthese von dNTPs und speziell von dCTP. Durch die Reduktion an intrazellulärem dCTP wird dadurch der Einbau von dFdCTP in die DNA verstärkt. Als falsches Nucleotid inhibiert dFdCTP die DNA-Elongation, was zum Replikationsstopp und letztendlich zur Apoptose der Zelle führt. Im Gegensatz zu Ara-C lagert sich hinter dem dFdC-Baustein eine weitere, nicht veränderte Base an. Diese sogenannte „Masked Chain Termination“ bewirkt, daß Reparaturenzyme der DNA gehemmt und Reparaturmechanismen behindert werden (Huang et al., 1991).

1.3.1 Wirkstoffresistenzen

Ein sehr großes Problem in der heutigen Krebsbehandlung ist die Entwicklung von Resistenzen verschiedener Krebszellen gegenüber den in der Chemotherapie eingesetzten Wirkstoffen. Obwohl die sehr effiziente Chemotherapie den größten Teil der Krebszellen zerstören kann, besteht immer die Gefahr, daß wenige resistente Zellen überleben und sich weiter teilen und verbreiten können.

Bei den Resistenzen kann man zwei Formen unterscheiden, zum einen die Resistenz, die sich erst während der Therapie entwickelt, zum anderen eine Resistenz, die bereits vor der Behandlung existent ist (Simon und Schindler, 1994; Kobayashi et al., 1993).

Eine Ursache, die zu Wirkstoffresistenzen bei der Chemotherapie führen kann, ist eine verminderte oder limitierende Menge an Enzym für die Umwandlung der Wirkstoffe in der Zelle. Im Fall der menschlichen dCK kann der Erwerb einer Wirkstoffresistenz unter anderem auf den Mangel an Aktivität der dCK in den Zellen zurückgeführt werden (Veuger et al., 2000).

In einem Xenograft-Modellsystem menschlicher Tumore konnte ein Zusammenhang zwischen der Aktivität der dCK und dem Anti-Tumor-Effekt gezeigt werden (Kroep et al., 2002). Bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML), die eine Resistenz gegenüber der AraC-Behandlung entwickelt haben, wurde das Auftreten von alternativen Spleiß-Varianten der dCK-Transkripte beobachtet (Veuger et al., 2002). Dies scheint ein weiterer Mechanismus zur Reduzierung der aktiven Menge an dCK in menschlichen Zellen zu sein. Weitere Faktoren, die zur Bildung von Wirkstoffresistenzen beitragen können, sind der Transport des Wirkstoffes aus der Zelle oder die verminderte Aufnahme.

1.3.2 Desaminierung von Nucleosiden

Cytidin-Desaminasen spielen eine wichtige Rolle im Metabolismus einer Vielzahl antiviraler und Anti-Krebs-Wirkstoffe, da sie zu ihrer pharmakologischen Inaktivierung führen (Muller und Zahn, 1979; Bouffard et al., 1993). So führt die Desaminierung von AraC zu einer signifikanten Verschlechterung des Therapieerfolges (Steuart und Burke, 1971). In menschlichen Zellen sind zwei verschiedene Desaminasen bei der Inaktivie-

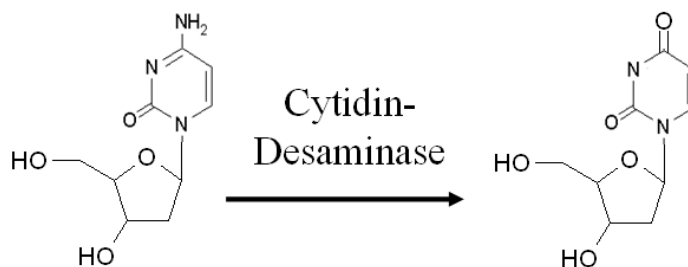


Abbildung 1.4: Desaminierung von Cytidin zu Uracil durch die Cytidin-Desaminase.

Die Desaminierung von Pyrimidin-basierten Analoga beteiligt: die Cytidin-Desaminase (CDA) und die Desoxycytidylat-Desaminase (dCMP-DA). Diese Enzyme katalysieren normalerweise die irreversible hydrolytische Desaminierung von Cytidin, Desoxycytidin und dCMP zu den entsprechenden Uridinformen (siehe Abb. 1.4).

Sie sind jedoch, wie bereits erwähnt, auch in der Lage, verschiedene Nucleosidanaloga als Substrate zu verwenden. Im Fall von AraC findet eine Desaminierung zu AraU statt (siehe Abb. 1.5 auf der nächsten Seite), das dann im Folgenden mit dem Urin ausgeschieden wird (Muller und Zahn, 1979). So ist die hohe Aktivität der Cytidin-Desaminase in der Leber und in der Milz für die geringe Halbwertszeit verschiedener Cytidin-Nucleosidanaloga, von nur 15-20 Min. im Patienten, verantwortlich (Ho, 1973).

Bei einigen Patienten wurden z. B. Resistenzen von Leukämiezellen gegenüber Cytidinanaloga beobachtet, die von einer erhöhten Aktivität der Cytidin-Desaminase verursacht wurden (Onetto et al., 1987; Steuart und Burke, 1971). Die dCMP-DA ist in der Lage, die Monophosphatformen AraCMP (Jamieson et al., 1987) und dFdCMP (Heinemann et al., 1992) zu desaminieren und trägt somit, auf dieser Ebene, zur Inaktivierung der Nucleosidanaloga bei (siehe Abb. 1.5 auf der nächsten Seite).

Auch in anderen Bereichen spielt die Desaminierung von Nucleosiden eine wichtige Rolle. So ist die sogenannte „Activation-induced Deaminase“ (AID) von zentraler Bedeutung in der Regulation der Immunantwort. Die Vielfalt der Antikörper wird während der Entwicklung der B-Lymphocyten durch Klassenwechsel-Rekombination (Manis et al., 2002), somatische Hypermutation und Genkonversion erzeugt (Flajnik, 2002). Für alle drei Prozesse ist die Expression der AID notwendig (Muramatsu et al., 2000;

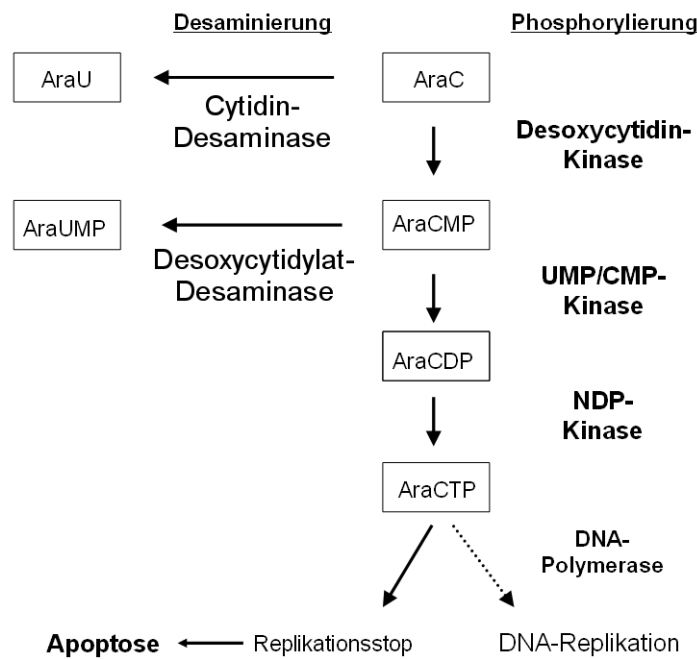


Abbildung 1.5: Vereinfachte Darstellung der Phosphorylierung und der Desaminierung von Nucleosidanaloga am Beispiel von AraC.

Harris et al., 2002; Arakawa et al., 2002).

Die APOBEC-Familie ist eine weitere interessante Enzymfamilie, die Aktivitäten als Desaminase zeigt. Die Enzyme dieser Familie sind an der Editierung von mRNA beteiligt und enthalten charakteristische Strukturelemente einfacher Cytidin-Desaminasen (Wedekind et al., 2003). Große Aufmerksamkeit ist in den letzten Jahren dem Enzym Apobec3G und dessen Verwandten zugekommen, da es eine Rolle bei der Infektion mit HIV und anderen Retroviren spielt (Vartanian et al., 2003). Apobec3G ist, sozusagen, ein natürlicher Schutzmechanismus in menschlichen Zellen gegenüber retroviralen Infektionen (Pham et al., 2005).

1.4 Gen- und proteintherapeutische Strategien

1.4.1 Gentherapeutische Ansätze

Das Ziel von Gentherapien ist das Einschleusen von Genen und die folgende Expression von Genprodukten, die entweder eine therapeutische Aktivität haben oder eine Änderung des zellulären Phänotyps induzieren. Viele gentherapeutische Ansätze, die das Beseitigen eines Gendefektes, wie z. B. einer Enzym-Defizienz oder Krankheiten

wie der Mukoviszidose (cystische Fibrose), verfolgen, benötigen eine auf lange Zeit angelegte und angemessen regulierte Expression eines Transgens in den Zellen.

Dafür ist es notwendig, entsprechende Expressionssysteme, z. B. virale Vektoren, zu verwenden. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Zielgerichtetheit bei der Anwendung, d. h. auf einen bestimmten Zelltyp oder eine Zellpopulation (Tumorzellen) begrenzt. In den meisten derzeitigen gentherapeutischen Ansätzen, speziell in der Gentherapie von Krebs, ist keine regulierte und dauerhafte Expression des Transgens notwendig.

1.4.2 Proteintransduktion

Im Rahmen der Gentherapie von Krebserkrankungen, die auf ein direktes Töten der Tumorzellen abzielt, wird nur eine kurzfristige Anwesenheit des therapeutischen Gens in den Krebszellen verlangt. Dies eröffnet die Möglichkeit, das gleiche Ziel mit einem anderen Ansatz zu erreichen. Statt das therapeutische Gen in die Zelle einzubringen, wird direkt das Genprodukt, das Protein, eingesetzt.

Mit Hilfe der Proteintransduktion soll das komplette, biologisch aktive Protein in die Zelle eingebracht werden. Die Entwicklung von Medikamenten auf Basis von Peptiden oder therapeutischer Proteine wird jedoch durch die geringe Durchlässigkeit und Selektivität der Zellmembranen begrenzt. Um diese Probleme zu umgehen, wurden neue Strategien entwickelt, die sich zum Ziel gesetzt haben, ganze Proteine in die Zellen zu bringen (Schwarze und Dowdy, 2000; Ford et al., 2001; Prochiantz, 2000). Es hat sich gezeigt, daß eine Anzahl von kleinen Proteindomänen, sogenannte Proteintransduktionsdomänen (PTDs), in der Lage sind, biologische Membranen effizient und unabhängig von Transportern oder Rezeptoren zu passieren. Dabei ermöglichen diese PTDs den Transport von Peptiden oder Proteinen in die Zelle.

Ein natürlich vorkommendes Beispiel einer Proteindomäne, die den Transport über eine biologische Membran ermöglicht, ist von dem von HIV-1 stammenden TAT-Protein („Transactivator of Transcription“) abgeleitet (Frankel und Pabo, 1988). Diese Proteindomäne umfaßt die Aminosäuren 45-57 des TAT-Proteins und ist in der Lage, biologisch aktive Proteine, die mit dem TAT-Protein verbunden sind, *in vivo* in Zellen zu transportieren (Fawell et al., 1994). Ähnlich aktive Proteine sind das VP22-Protein des Herpes-Simplex-Virus (Elliott und O’Hare, 1997; Phelan et al., 1998) und die dritte

α -Helix der Antennapedia-Homeodomäne von *Drosophila melanogaster* (Derossi et al., 1994; Lindgren et al., 2000). Auf der Basis des TAT-Proteins wurden viele Varianten erstellt, die einen Transport über die Zellmembran ermöglichen, unter anderem auch Polyarginin-Sequenzen (Futaki et al., 2001; Futaki, 2002).

Die Verwendung von PTDs, um Peptide oder Proteine in Zellen zu transportieren, unterliegt jedoch auch einigen Limitierungen. So muß in allen Fällen die PTD mit dem Protein oder Peptid verbunden sein, und in einigen Fällen ist auch eine Denaturierung des PTD-Fusionsproteins vor der Proteintransduktion notwendig. Dies führt zu einer weiteren Verzögerung zwischen Aufnahme und Aktivierung des Proteins in der Zelle.

Eine neue Strategie für den Transport von Proteinen in Säugetierzellen basiert auf kurzen amphipatischen Peptiden, die als sogenannte Peptid-„Carrier“ (z. B. Pep-1) eingesetzt werden. Die Pep-1-Peptide erlauben den Transport von Peptiden und Proteinen in einer biologisch aktiven Form in verschiedene Zell-Linien (Morris et al., 2001), wobei ein Denaturierungs-Schritt und eine Fusion von Peptid-„Carrier“ und Protein nicht mehr nötig sind.

Das Pep-1-Peptid besteht aus 21 Aminosäuren und besitzt drei Domänen mit spezifischen Funktionen: eine hydrophobe Tryptophan-reiche Domäne (KETWWETWW-TEW), eine hydrophile Lysin-reiche Domäne (KKKRKV) und eine „Spacer“-Domäne (SQP). Die hydrophobe Domäne ist an den Interaktionen mit den Makromolekülen beteiligt und notwendig für eine effiziente Bindung an die Zellmembran. Die hydrophile Domäne verbessert den Transport in die Zelle und ist für die Löslichkeit des Komplexes wichtig. Die „Spacer“-Domäne verbessert die Flexibilität und Integrität zwischen der hydrophoben und hydrophilen Domäne.

Dieses auf Peptiden basierende Protein-Transportsystem hat viele Vorteile: Es erlaubt einen sehr schnellen und effizienten Transport der Proteine in die Zellen, ist stabil in physiologischen Puffern, zeigt bis zu sehr hohen Konzentrationen keine Toxizität gegenüber den verwendeten Zellen und ist unempfindlich gegenüber Serum (Morris et al., 2001).

1.5 Zielsetzung

Die menschlichen Nucleosid-Kinasen sind essentielle Enzyme für die Aktivierung zahlreicher Nucleosidanaloga, die heutzutage routinemäßig in Krebs- und antiviralen Chemotherapien eingesetzt werden. Ziel dieser Arbeit war es daher, im ersten Schritt, die für die Aktivierung von klinisch relevanten Pyrimidin-Nucleosidanaloga verantwortlichen Enzyme näher zu charakterisieren. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf die Enzyme gelegt werden, die für eine effiziente Aktivierung der Wirkstoffe limitierend sind. Ausgehend von der Klonierung und Expression der relevanten Enzyme, sollten weitergehend die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Überexpression für Kristallisationsexperimente geschaffen werden.

Mit Hilfe der gemessenen kinetischen Daten und der strukturellen Informationen aus der Kristallstruktur sollte im zweiten Schritt die Funktionsweise der Enzyme besser verstanden werden. Diese Informationen sollten dann in einem strukturbasierten Design dazu verwendet werden, die Aktivität der Enzyme durch gezielte Mutagenese zu verbessern.

Im dritten Schritt der Arbeit sollten dann diese Mutanten erzeugt und kinetisch charakterisiert werden. Dabei ist das Ziel, Mutanten zu erhalten, die eine höhere Effizienz bei der Aktivierung relevanter Nucleosidanaloga im Vergleich zu den Wildtyp-Enzymen zeigen.

2 Material

2.1 *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Merkmale	Quelle
XL1-Blue	F ⁻ :: <i>Tn10/proA⁺B⁺lacI^q</i> $\Delta(lacZ)M15/recA1$ <i>en-</i> <i>dA1 gyrA96(Nal^r) thi-1, hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>supE44 relA1 lac</i>	Bullock et al. (1987)
DH5 α	F ⁻ / <i>endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁻) <i>supE44, thi-1, re-</i> <i>cA1, gyrA(Nal^r), relA1, $\Delta(lacZYA-argF)U169$</i> <i>(Φ80lacZΔM15)</i>	Gibco BRL (Eggenstein)
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT [Ion] hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻ ; ein <i>E. coli</i> B- Stamm) mit DE3, ein α -Prophage, der das T7-RNA- Polymerasegen trägt	Studier et al. (1990)
C41(DE3)	Gleicher Genotyp wie BL21(DE3), mit reduzierter Aktivität der T7-RNA-Polymerase, 10fach geringe Menge an mRNA-Transkript	Miroux und Walker (1996)
BL21(DE3)- Codon+	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm⁺ Tet^r galλ(DE3)</i> <i>endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]</i>	Stratagene (La Jolla)

2.2 Plasmide

Für diese Arbeit übernommene Vektoren:

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pJC20	Expressionsvektor	Clos et al. (1990)
pBlueIP	Klonierungsvektor	I. Paarmann, Göttingen
pET14b	Expressionsvektor	Novagen, Madison, USA
pET15b	Expressionsvektor	Novagen, Madison, USA
pGEX-RB	Expressionsvektor	R. Brundiers, Göttingen
pMAL-K4	Expressionsvektor	C. Monnerjahn, Göttingen

In dieser Arbeit erstellte Vektoren:

Plasmid	Beschreibung
pET14b-dCK	N-terminaler „His-tag“-Expressionsvektor für die menschliche Desoxycytidin-Kinase, Wildtyp
pET14b-dCK1	N-terminaler „His-tag“-Expressionsvektor für die dCK Δ 1
pET14b-dCK2	N-terminaler „His-tag“-Expressionsvektor für die dCK Δ 2
pET14b-dCK3	N-terminaler „His-tag“-Expressionsvektor für die dCK Δ 3
pET14b-dCK-triple	N-terminaler „His-tag“-Expressionsvektor für die dCK-Dreifachmutante: A ₁₀₀ V R ₁₀₄ M D ₁₃₃ A
pGEX-RB-UMPK1	N-terminaler „GST-tag“-Expressionsvektor für die menschliche UMP/CMP-Kinase
pGEX-RB-UMPK2	N-terminaler „GST-tag“-Expressionsvektor für die N-terminal verkürzte Version der menschlichen UMP/CMP-Kinase (Δ 32N)
pET14b-hCDA	N-terminaler „His-tag“-Expressionsvektor für die menschliche CDA
pGEX-RB-dCMP-DA	N-terminaler „GST-tag“-Expressionsvektor für die menschliche dCMP-DA

2.3 Oligonucleotide

Die verwendeten Oligonucleotide wurden bei der Firma NAPS in Göttingen in Auftrag gegeben. Es wurde in aller Regel ein Synthesemaßstab von 0,01–0,05 μ mol gewählt.

Bez.	Sequenz des Oligonucleotids 5'-3'	Zweck
SO10	CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCA TG	pBlueIP Sequenzierprimer-5'
SO11	GGG GTT ATG CTA GTT ATT GCT C	pBlueIP Sequenzierprimer-3'
SO75	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	T7-Primer
3'pET	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA	pET14b Sequenzierprimer-3'
5'pGEX	GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG	pGEX-5'-Sequenzierprimer
3'pGEX	CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG	pGEX-3'-Sequenzierprimer
SO162	CAA GAC TAA CAT ATG GCC ACC CCG CCC AAG AGA AG	dCK-NdeI-5'
SO163	GCC TGT AGG ATC CTC ACA AAG TAC TCA AAA ACT C	dCK-BamHI-3'
CM5	GTC TTT TAC CTT CCA AAC CTA CGC CTG TCT CAG TC	dCK(Δ NdeI)-5'
CM6	GAC TGA GAC AGG CGT AGG TTT GGA AGG TAA AAG AC	dCK(Δ NdeI)-3'
SO38	GCA CCA TCT GGC AAC AGG TCC	dCK Δ „Insert“-3' konst. Teil

Bez.	Sequenz des Oligonucleotids 5'-3'	Zweck
SO39	GTT GCC AGA TGG TGC AAT GTT CAA AGT ACT AAT GTT CTT CAG ATG ATG	dCK1 Δ,,Insert“-5'
SO40	GTT GCC AGA TGG TGC AAT GTT CTT CAG ATG ATG	dCK2 Δ,,Insert“-5'
SO41	GTT GCC AGA TGG TGC GTT CTT CAG ATG ATG TAT	dCK3 Δ,,Insert“-5'
SO49	CGG GAT CCC AAA GTA CTC AAA AAC TC	dCK-3' ohne Stop
SO67	CCT TCC AAA CCT ACG TGT GTC TCA	dCK A100V-5'
SO68	CTG AGA CAC ACG TAG GTT TGG AAG G	dCK A100V-3'
SO69	TGT CTC AGT ATG ATA AGA GCT CAG	dCK R104M-5'
SO70	CTG AGC TCT TAT CAT ACT GAG ACA	dCK R104M-3'
SO71	GTG TAT AGT GCG AGG TAT ATT TTT G	dCK D133A-5'
SO72	CAA AAA TAT ACC TCG CAC TAT ACA C	dCK D133A-3'
SO73	CCT TCC AAA CCT ACG TGT GTC TCA GTA TGA TAA GAG CTC AGC	dCK A100V+R104M-5'
SO74	GCT GAG CTC TTA TCA TAC TGA GAC ACA CGT AGG TTT GGA AGG	dCK A100V+R104M-3'
SO01	GGA ATT CCA TAT GCT GAG CCG CTG CCG CAG	hUMP-CMPK-NdeI-5'
SO02	CGG GAT CCT TAG CCT TCC TTG TCA AAA ATC TG	hUMP-CMPK-BamHI-3'
SO05	GGA ATT CCA TAT GCT GAG CCG CTG CCG CAG	hUMP-CMPK-NdeI-5' (Δ32N)
SO135	GGA ATT CCA TAT GGC CCA GAA GCG TCC TGC CTG	hCDA-5'
SO136	CGC GGA TCC TCA CTG AGT CTT CTG CAG GTC CTC	hCDA-3'
WC103	GGG AAT TCC ATA TGA GTG AAG TTT CCT GC	dCMP-DA 5'
WC104	CGC GGA TCC TCA CTG AAG CTT TTG ACT CGG	dCMP-DA 3'
CM124b	GGG AAT TCC ATA TGG CCC GCA CGT GCC TGG CGGGCT GCC GCG CGC GCA TAC TCG AGC GAT CCA CGC GGA ACC AGA CCA C	Einführung PTD4 in pGEX- RB, N-terminal
CM142	TAT GGC CAT GGG CCG GGA TCC GGC TAT GCG CGC GCG GCA GCC CGC CAG GCA CGT GCG TGC TAA GAA TTC A	PTD4, C-terminal 5'
CM143	AGC TTG AAT TCT TAG CAC GCA CGT GCC TGG CGG GCT GCC GCG CGC GCA TAG CCG GAT CCC GGC CCA TGG CCA	PTD4, C-terminal 3'

2.4 Enzyme

Invitrogen, Carlsbad, USA: „TA Cloning Kit“, *Pfx*-DNA-Polymerase, Protein-Molekulargewichtsstandard („Benchmark Protein Ladder“, GibcoBRL)

MBI Fermentas, Vilnius, Litauen: Restriktionsendonucleasen, Rinderserumalbumin (BSA), T4-DNA-Ligase, T4-DNA-Polymerase, DNA-Längenstandards

New England Biolabs, Bad Schwalbach: Restriktionsendonucleasen, Rinderserumalbumin (BSA), Alkalische Phosphatase (CIAP), „Quick Ligation Kit“

Promega, Madison, USA: *Tfl*-Polymerase

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim: T4-DNA-Ligase, Pyruvat-Kinase und Lactatdehydrogenase, AmpliTaq-DNA-Polymerase

Serva, Heidelberg: Lysozym

Stratagen, La Jolla, USA: *Pfu*-DNA-Polymerase

2.5 Chemikalien und Medienzusätze

Es wurden handelsübliche Chemikalien der Qualitätsstufe p. A. der Firmen J. T. Baker (Deventer, Holland), Serva (Heidelberg), Merck AG (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen) verwendet.

Zusätzlich wurden spezielle Chemikalien von folgenden Firmen bezogen:

Appli Chem, Biolith Diagnostica, Göttingen: Ampicillin Natriumsalz

Biomol, Ilvesheim: Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)

Bio-Rad, Richmond, USA: Proteinfärbelösung

Eurogentec, Seraing, Belgien: Desoxyribonucleosidtriphosphate

Jena Bioscience GmbH, Jena: Bisubstratanalogon UP₅A

Messer/Griesheim, Kassel: Flüssiger Stickstoff

New England Biolabs, Schwalbach: Amylose-Matrix

Pharmacia Biotech, Freiburg: Glutathion-Sepharose-4B

Qiagen, Hilden: Nickel-NTA-Agarose

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim: Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (NADH), Phosphoenolpyruvat (PEP)

Sigma, Deisenhofen: Adenosin-5'-Triphosphat (ATP), Nucleosidmonophosphate, Desoxy- und Ribonucleotide, reduziertes Glutathion, Nucleosidanaloga: 1- β -D-Arabinofuranosylcytosin (AraC), Didesoxycytidin (ddC)

Elli Lilly, Indianapolis, USA: 2'-Desoxy-2',2'-Difluorocytidin (dFdC, Gemcitabin)

2.6 Verbrauchsmaterialien

Becton Dickinson, Heidelberg: Polypropylen- und Falconröhrchen

Eppendorf, Hamburg: Reaktionsgefäße

Genomed, Bad Oeynhausen: „JetStar 2.0 Midiprep Kit“

Nunc, Wiesbaden: Kulturschalen

Qiagen, Hilden: „QIAprep Spin Miniprep Kit“, „QIAquick PCR Purification Kit“, „QIAquick Gel Extraction Kit“

Schleicher und Schuell, Dassel: Nitrocellulose-Membranfilter (2,5 cm, 0,45µm), Nylon-Membranfilter Nytran und Bio-Trap-Membranen BT1 und BT2

Schütt, Göttingen: Allgemeine Glaswaren

Serva, Heidelberg: Dialyseschläuche Visking

Vivascience, Hannover: Konzentratoren

2.7 Geräte

Bachofer, Reutlingen: Transilluminatoren (302 und 366nm)

Bio-Rad, Richmond, USA: Elektroporationsgerät, AGE-Gel-Elektrophoresekammer, Mini-PROTEAN 3 Cell

BIO-TEK, Neufahrn: Uvikon 810 und 943 UV/VIS-Spektrophotometer

DuPont Instruments, Bad Homburg: Zentrifugen Sorvall RC-5B, RC-3B und Rotoren

Heinemann, Schwäb.-Gmünd: Ultraschallgerät, Branson Sonifier Modell 250

Heraeus, Hanau Brutschränke, Sterilbank

MicroCal, Northampton, MA, USA: Omega isothermes Titrationskalorimeter

Schütt, Göttingen: Eppendorf-Thermomixer und Eppendorf-Tischzentrifuge 5415

New Brunswick, Edison, USA: Inkubationsschüttler

Whatman Biometra, Göttingen: PCR-Gerät Tpersonal

Wolf, Geislingen: Autoklav

Zeiss, Göttingen: Mikroskope

2.8 Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer, die nicht fertig gekauft wurden, wurden wie untenstehend hergestellt. Die Lagerung erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur. Feststoffe wurden, wenn nicht anders angegeben, in Wasser gelöst.

Ampicillin-Stammlösung: 100 mg/ml Ampicillin (Na-Salz) in Wasser, sterilfiltriert

Ammoniumacetat-Stammlösung: 7 M Ammoniumacetat

APS-Stammlösung: 25 % APS in Wasser

Chloramphenicol-Stammlösung: 25 mg/ml Chloramphenicol in 96 % Ethanol

dNTP-Stammlösung: je 100 mM dNTP (N = A, C, G, T), mit 1 M Tris-Base auf pH 7,0 eingestellt

E1 (Jetstar®): 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA

E2 (Jetstar®): 200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS

E3 (Jetstar®): 3,2 M Kaliumacetat-Essigsäure (pH 5,5)

E4 (Jetstar®): 600 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat-Essigsäure (pH 5,0)

E5 (Jetstar®): 800 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat-Essigsäure (pH 5,0)

E6 (Jetstar®): 1,25 M NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,5)

EDTA-Stammlösung: 0,5 M Na-EDTA wurde unter Zugabe von NaOH gelöst und der pH auf 8,0 eingestellt

Entfärbelösung (SDS): 5 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure, 88 % (v/v) H₂O

Ethidiumbromid-Stammlösung (10x): 10 mg/ml Ethidiumbromid

Färbelösung (SDS): 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) H₂O, 0,05 % (w/v) Coomassie-Blau R250

Hepes-Lysepuffer: 50 mM Hepes (pH 7,2), 0,5 M NaCl, 0,5 mM PMSF und je nach Anwendung evtl. 0,5-1,0 % Triton, 8 mM β-Mercaptoethanol, 5-10 % Glycerin

Hepes-Waschpuffer: 50 mM Hepes (pH 7,2), 0,5 M NaCl, 20 mM Imidazol und je nach Anwendung 0,5-1,0 % Triton, 8 mM β-Mercaptoethanol, 5-10 % Glycerin

Hepes-Elutionspuffer: 50 mM Hepes (pH 7,2), 0,3 M NaCl, 250 mM Imidazol und je nach Anwendung 0,5-1,0 % Triton, 8 mM β-Mercaptoethanol, 5-10 % Glycerin

IPTG-Stammlösung: 1M IPTG in Wasser, sterilfiltriert

KAc-Lösung: 3 M Kaliumacetat/ Eisessig (pH 5,5)

Kanamycin-Stammlösung: 75 mg/ml Kanamycin-Sulfat in Wasser, sterilfiltriert, bei -20°C gelagert

- Klenowpuffer (10x):** 500 mM Tris (pH 7,5), 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 500 µg/ml BSA
- Laemmli-Auftragspuffer (2x):** 0,1 M Tris/HCl (pH 6,8), 2 % (w/v) SDS, 2 % β-Mercaptoethanol, 20 % (v/v) Glycerin, 0,002 % (w/v) Bromphenolblau
- NaPO₄ Puffer, 0,1 M (pH 7,0):** 57,7 ml Na₂HPO₄ (1 M), 42,3 ml NaH₂PO₄ (1 M), die 1 M Stammlösung wurde auf 1000 ml mit Wasser verdünnt.
- Nativer PAGE-Laufpuffer:** 5 mM Tris, 38 mM Glycin. Durch das Glycin wird ein pH-Wert von 8,3 eingestellt.
- Nativer PAGE-Probenpuffer (2x):** 55 % (v/v) nativer PAGE-Sammelgelpuffer, 40 % (w/v) Saccharose, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
- Nativer PAGE-Sammelgelpuffer:** 0,5 M Tris, pH-Wert mit HCl auf 6,8 eingestellt
- Nativer PAGE-Trenngelpuffer:** 1,5 M Tris, pH-Wert mit HCl auf 8,8 eingestellt
- PBS-Puffer (1x):** 140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄
- PBS/N-Laurylsarcosin:** 140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 2 mM KH₂PO₄, 1 % N-Laurylsarcosin
- PBS-Tween-Puffer:** 140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0,05 % (v/v) TWEEN 20
- PE- und QG-Puffer:** von Firma Qiagen nicht veröffentlicht
- SDS-NaOH-Lösung:** 1 % (w/v) SDS, 0,2 N NaOH, die Lösung wurde jeweils vor Verwendung frisch angesetzt
- SDS-Stammlösung:** 10 % (w/v) SDS
- SDS-PAGE-Laufpuffer:** 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
- SDS-PAGE-Sammelgelpuffer:** 0,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS, pH-Wert mit HCl auf 6,8 einstellen
- SDS-PAGE-Trenngelpuffer:** 1,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS, pH-Wert mit HCl auf 8,8 einstellen
- T4-DNA-Ligasepuffer (10x):** 400 mM Tris-HCl (pH 7,8), 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP
- Taq-Polymerasepuffer (10x):** 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9,0), 15 mM MgCl₂, 1 % (w/v) Triton X-100
- TAE-Puffer:** 40 mM Tris-Acetat, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA (pH 7,4)
- TBE-Puffer:** 89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA
- TE-Puffer:** 10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA (pH 8,0), aus Stammlösungen zusammengestellt

Testpuffer Nucleosid-Kinasen (2x): 200 mM Tris-HCl (pH 7,5), 200 mM KCl und 20 mM MgCl₂

Tetracyclin-Stammlösung: 10 mg/ml Tetracyclin in 70 % (v/v) Ethanol, sterilfiltriert

Tris-Puffer: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (z. B. Sigma 7-9) wurde in Wasser aufgelöst und der pH-Wert mit Säure eingestellt. Für Tris-HCl wurde Salzsäure, für Tris-Acetat Essigsäure verwendet.

Tris-Lysepuffer: 50 mM Tris (pH 8,0), 0,5 M NaCl, 0,5 mM PMSF und je nach Anwendung 0,5-1,0 % Triton, 8 mM β -Mercaptoethanol, 5-10 % Glycerin

Tris-Waschpuffer: 50 mM Tris (pH 8,0), 0,5 M NaCl, 20 mM Imidazol und je nach Anwendung 0,5-1,0 % Triton, 8 mM β -Mercaptoethanol, 5-10 % Glycerin

Tris-Elutionspuffer: 50 mM Tris (pH 8,0), 0,3 M NaCl, 250 mM Imidazol und je nach Anwendung 0,5-1,0 % Triton, 8 mM β -Mercaptoethanol, 5-10 % Glycerin

2.9 Wissenschaftliche Computerprogramme

GCG Wisconsin Package: Mit dem „GCG Sequence Analysis Software Package“ wurden Klonierungen geplant und Sequenzvergleiche durchgeführt (Wisconsin Package Version 10.1, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA).

DS Viewer Pro 5.0: Dieses Programm wurde zur Darstellung der 3D Molekülstrukturen auf Basis der PDB-Dateien und zur Anfertigung von Bildern verwendet (Accelrys, San Diego, USA).

Origin™ITC Software: Dieses Programm wurde zur Auswertung der Messergebnisse der isothermen Titrationskalorimetrie verwendet (OriginLab, Northampton, USA)

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Nährmedien für *E. coli*

LB (Luria-Bertani-Medium (Sambrook et al., 1989))	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	Trypton
	10 g/l	NaCl
LB-Platten	1,5 %	Bacto-Agar zusätzlich

Die Medien wurden 20 Min. bei 120°C autoklaviert und bei 4°C gelagert. Für Agarplatten wurde dem Medium 20 g/l Agar zugesetzt. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 40°C wurde ggf. Ampicillin (100 µg/ml) zugegeben, Platten gegossen und nach dem Erstarren bei 4°C gelagert.

3.1.2 Anzucht von *E. coli*-Kulturen

Die Anzucht von *E. coli*-Kulturen erfolgte durch Ausstreichen von Bakterien aus einer Dauerkultur auf Agarplatten. Zur Anreicherung von *E. coli*-Stämmen in Flüssigkultur wurden Zellen einer Einzelkolonie mit einer sterilen Impföse von einer Platte aufgenommen und in 5 ml LB-Medium inokuliert. Zur Kultivierung von Transformanden enthielt das Medium ein geeignetes Antibiotikum (z. B. Ampicillin). Die Platten wurden bei 37°C inkubiert, Flüssigkulturen zusätzlich mit mindestens 200 rpm geschüttelt. Für das Anlegen einer *E. coli*-Dauerkultur wurden 5 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert, das Zellpellet in 600 µl Medium resuspendiert und anschließend mit 400 µl sterilem Glycerin vermischt. Dauerkulturen wurden bei -80°C gelagert.

3.1.3 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung von kompetenten Zellen nach Nishimura et al. (1990) wurden 50 ml Medium A mit 0,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,3-0,5$ inkubiert. Danach wurden die Zellen 10 Min. auf Eis gestellt und durch 10-minütige Zentrifugation bei 1500g und 4°C geerntet. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 0,5 ml eiskaltem Medium A resuspendiert und nach Zugabe von 2,5 ml Lösung B vorsichtig gemischt. Die Zellsuspension wurde in Aliquots von 100 µl aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

Medium A: 10 mM $MgSO_4$, 0,2 % Glucose in LB-Medium

Lösung B: 36 % (w/v) Glycerin, 12 % (w/v) PEG 8000, 12 mM $MgSO_4$ in LB-Medium (steril filtriert)

3.1.4 DNA-Präparationen

Analytische Plasmidisolierung aus *E. coli*-Zellen

Zur Isolierung kleiner Mengen bakterieller Plasmid-DNA („Miniprep“) wurde das „QIA-prep Spin Miniprep Kit“ verwendet. Diese Methode wurde hauptsächlich zur qualitativen Analyse mehrerer Einzelklone nach einer Transformation benutzt. Einzelkolonien wurden in 1,5 ml LB-Amp-Medium in einem 2 ml Eppendorfgefäß angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Gleichzeitig wurde die Einzelkolonie auf LB-Amp-Agarplatten überimpft, ebenfalls über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert. Die in Flüssigkultur herangewachsenen Bakterien wurden für eine Min. in einer Tischzentrifuge bei 16.000 g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Die alkalische Lyse und Aufreinigung der DNA über die „Miniprep“-Säulen erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die DNA wird in diesem Verfahren an eine Silica-Gel-Membran unter Verwendung eines Hochsalzpuffers gebunden. Die Elution erfolgt mit 50 µl Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) oder H_2O . Die DNA wurde bei -20°C eingefroren und gelagert.

Präparative Plasmidisolierung aus *E. coli*-Zellen

Zur Isolierung von Plasmid-DNA in größeren Mengen („Midiprep“) wurde das „JetStar 2.0 Midiprep Kit“ nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. 50-500 ml einer Übernachtskultur mit *E. coli*-Transformanten wurden geerntet, in Puffer E1 aufgenommen und die Zellen durch alkalische Lyse unter Verwendung der Puffer E2 aufgeschlossen. Zur Isolierung und Aufreinigung der Plasmid-DNA wurden Anionenaustauscher-Säulen, sowie Wasch- und Elutionspuffer (E5 und E6, siehe Kap. 2.8 auf Seite 20) verwendet. Durch diese präparative Plasmidisolierung konnten 100-500 µg DNA gewonnen werden. Die DNA wurde in 100 µl H₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.1.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen konnte über die Bandenintensität im Agarose-Gel im Vergleich zu den Banden einer DNA-Leiter abgeschätzt werden. Zur genauen Bestimmung wurde die Absorption bei 260 nm photometrisch gemessen und die Konzentration mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet. Dabei entspricht bei doppelsträngiger DNA (dsDNA) und einer Schichtdicke von 1 cm eine Absorption von 1,0 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Es gilt daher für doppelsträngige DNA folgender Zusammenhang:

$$c = \frac{A_{260} \cdot 50 \cdot v}{d} \quad (3.1)$$

- c = Konzentration (µg/ml)
- v = Verdünnungsfaktor
- d = Schichtdicke der Messküvette (cm)

Zusätzlich wurde die Reinheit einer Plasmidisolierung über ein Absorptionsspektrum geprüft. Dabei sollte der Quotient A_{260}/A_{280} mindestens 1,8 betragen. Ein Quotient kleiner als 1,8 zeigt, daß die Präparation mit Proteinen und aromatischen Substanzen (z. B. Phenol) verunreinigt ist. Ein Quotient größer als zwei deutet auf eine Verunreinigung mit RNA hin.

3.1.6 Enzymatische Behandlung von DNA

Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Spaltungen mit Restriktionsendonucleasen wurden unter den vom Hersteller beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Für analytische Zwecke wurden 300-500 ng DNA in einem Volumen von 20-25 μ l eingesetzt. Im Gesamtansatz lag maximal 10 % Enzymlösung vor, da das darin enthaltene Glycerin sich in höherer Konzentration negativ auf die Aktivität der Restriktionsendonucleasen auswirken kann. Bei Doppelverdau wurden Puffer eingesetzt, in denen beide Enzyme eine möglichst hohe Aktivität besaßen. Der Erfolg der Spaltung wurde gelelektrophoretisch überprüft.

Behandlung von linearisierter DNA mit alkalischer Phosphatase

Die alkalische Phosphatase katalysiert die Abspaltung der endständigen 5'-Phosphatgruppe von DNA- und RNA-Fragmenten. Das Enzym wurde bei einigen Klonierungen eingesetzt, um eine Religation des Vektors mit glatten oder kompatiblen kohäsiven Enden ohne ein eingefügtes DNA-Fragment zu verhindern und die Effizienz der Ligation zu erhöhen. Für die Abspaltung der Phosphatgruppe wurden etwa 2 μ g linearisierte Vektor-DNA in 45 μ l H₂O aufgenommen und mit 5 μ l 10x Dephosphorylierungspuffer versetzt. Nach der Zugabe von 0,05 Einheiten alkalischer Phosphatase wurde der Reaktionsansatz für 30 Min. bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von EDTA in einer Endkonzentration von 5 mM und 10-minütigem Erhitzen auf 75°C gestoppt. Die DNA wurde mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ von Qiagen oder durch präparative Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt (siehe Kap. 3.1.8 auf Seite 28).

Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden

Um nach der Behandlung von doppelsträngiger DNA den Gegenstrang an 5'-überhängenden Enden neu zu synthetisieren, und somit glatte DNA-Enden zu bilden, wurde das Klenow-Fragment verwendet. Nach Behandlung mit Klenow-Enzym konnten DNA-Fragmente ligiert werden, welche zunächst keine kompatiblen 5'-überhängenden DNA-Enden besaßen. Für die Auffüllreaktion wurden 1-2 μ g DNA in 20 μ l H₂O und

2,5 µl Klenowpuffer (10x) aufgenommen und nach Zugabe von 2,5 µl dNTP-Mix mit 1-2 Einheiten (U) des Klenow-Fragments 15 Min. bei 37°C inkubiert. Durch 10-minütiges Erhitzen auf 75°C wurde das Enzym inaktiviert. Die DNA wurde mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ von Qiagen oder durch präparative Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt (siehe Kap. 3.1.8 auf der nächsten Seite).

Ligation von DNA-Doppelstrang-Fragmenten

Linearisierte DNA-Moleküle können durch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden miteinander verbunden werden. Die T4-DNA-Ligase katalysiert diese Reaktion unter Hydrolyse von ATP. Der Ligationsansatz enthielt 50-100 ng linearisierte Vektor-DNA, einen 3-10fachen molaren Überschuß des zu integrierenden DNA-Fragments, 2 µl des vom Hersteller mitgelieferten 10x Ligasepuffers und eine Einheit (U) T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Ansätze wurden 1-20 Std. bei 16°C inkubiert und konnten dann direkt zur Transformation von kompetenten *E. coli* eingesetzt werden (siehe Kap. 3.1.9 auf Seite 29).

Alternativ wurde das „Quick Ligation Kit“ eingesetzt. Mit diesem „Kit“ ist eine Ligation innerhalb von 5 Min. möglich. In dem Ligationsansatz wurde 50 ng linearisierter Vektor mit einem 3fachen molaren Überschuß des zu integrierenden DNA-Fragmentes verwendet. Das Gesamtvolumen von Vektor und „Insert“ war 10 µl. Dieser Ansatz wurde mit 10 µl 2x „Quick“-Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase vollständig gemischt und für 5 Min. bei Raumtemperatur (25°C) inkubiert. Danach konnte der Ansatz direkt zur Transformation verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

3.1.7 Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese

Zur Reinigung von DNA aus PCR-Ansätzen oder Restriktionsspaltungen, sowie zur Analyse der Fragmentgröße nach DNA-Manipulationen, wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt, durch die eine Auftrennung von DNA-Fragmenten aufgrund ihrer Größe erfolgt. Die Wanderungsgeschwindigkeit von linearer und doppelsträngiger DNA in der Agarose-Gelmatrix ist bis zu einer Grenze von 10-20 kb umgekehrt proportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare.

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarose-Flachbettgele benutzt. In Abhängigkeit der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Agarosekonzentrationen von 0,7 % bis 2,0 % gewählt, wobei sich DNA-Fragmente mit einer Größe von 0,8 - 10,0 kb in 0,7 %iger Agarose trennen ließen, während in 2,0 %iger Agarose der optimale Trennbereich für DNA-Fragmente von 0,1 - 2,0 kb lag. Die Agarose wurde durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst und in eine entsprechende Gelkammer, die mit einem taschenbildenden Kamm versehen war, gegossen. Nach dem Abkühlen und der Verfestigung wurde das Gel in der Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Als Elektrophoresepuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 70 bis 150 Volt. Die aufgetrennten und mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Fragmente konnten anschließend durch Bestrahlung mit UV-Licht (302 nm) auf einem Transilluminator als Banden sichtbar gemacht werden. Präparative Gele wurden möglichst kurzzeitig in Ethidiumbromid angefärbt und nur längerwelligem UV-Licht (366 nm) ausgesetzt, um mutagene Schäden in der DNA zu vermeiden.

3.1.8 DNA-Isolierung aus präparativen Gelen

DNA kann aus Agarose-Gelen durch ihre Verflüssigung in Spezialpuffer gelöst und gereinigt werden. Hierfür wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Der im „Kit“ enthaltene Puffer QG enthält Salze, die die Struktur von Nucleinsäuren modifizieren. Der QG-Puffer ermöglicht das Schmelzen der Agarose bei relativ niedrigen Temperaturen (10 Min. bei 50°C) und die optimale Bindung an die Silicagel-Membran in den Qiagen-Säulen, die jeweils mittels kurzer Zentrifugation beladen, gewaschen und eluiert werden. Die DNA-Absorption ermöglicht die Reinigung von unerwünschten Oligonucleotiden und Verunreinigungen, wie Salze, Enzyme, nicht inkorporierte Nucleotide, Agarose und Ethidiumbromid, da diese nicht binden. Salze werden durch den PE-Puffer, der Ethanol enthält, quantitativ entfernt. Die Elution der DNA erfolgte unter basischen Bedingungen mit 30-50µl Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) oder H₂O.

3.1.9 Transformation von *E. coli*-Zellen (Hitzeschock-Methode)

Die tiefgefrorenen *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Pro Transformationsansatz wurden 100 µl Zellsuspension verwendet. Nach Zugabe von 10 µl des Ligationsansatzes oder 100-200 ng Plasmid-DNA wurden die Zellen zunächst 30 Min. auf Eis inkubiert, und anschließend eine Min. bei 42°C im Wasserbad erhitzt (Hitzeschock). Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium und Inkubation für 30-60 Min. bei 37°C unter leichtem Schütteln konnte davon ausgegangen werden, daß die transformierten Zellen das plasmidkodierte Resistenzgen exprimieren. Anschließend wurden 50-200 µl der Zell-Suspension auf LB-Amp-Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Klone wurden für analytische Plasmidisolation angeimpft (siehe Kap. 3.1.4 auf Seite 24) und anschließend durch Restriktionsanalyse auf Anwesenheit der rekombinanten Plasmid-DNA überprüft werden. Um eine größere Menge von Klonen zu untersuchen konnte alternativ eine Kolonie-PCR durchgeführt werden (siehe Kap. 3.1.11 auf der nächsten Seite).

3.1.10 DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion

Die Durchführung der PCR erfolgte entweder mit der *Pfx*-DNA-Polymerase oder mit der Ampli-Taq-Polymerase unter Verwendung der mitgelieferten 10x konzentrierten Puffer. In der Kolonie-PCR (siehe Kap. 3.1.11 auf der nächsten Seite) wurde die preiswertere Ampli-Taq-Polymerase eingesetzt, die im Gegensatz zur *Pfx*-Polymerase keine „proof reading“-Aktivität aufweist. Die *Pfx*-Polymerase besitzt eine 3'-Exonucleaseaktivität und weist daher eine höhere Genauigkeit während der Reaktion auf. Es wurden 20-50 ng der entsprechenden Vektor-DNA und jeweils 50 pmol der beiden Oligonucleotide pro 100 µl Reaktionsansatz eingesetzt. Nach der PCR-Amplifikation wurden 4 µl des Reaktionsansatzes durch Agarose-Gelelektrophorese getestet. Die Rest des Reaktionsansatzes konnte für weitere Klonierungen eingesetzt werden.

Standard PCR:

Reaktionsansatz (100 µl):	20-50 ng	Vektor-DNA
	50 pmol	Oligonucleotid 1
	50 pmol	Oligonucleotid 2
	5 µl	dNTP-Mix (je 2,5 mM)
	10 µl	10x PCR-Reaktionspuffer
	1 Einheit	DNA-Polymerase
		ad 100 µl H ₂ O

Reaktionsbedingungen (Für die *Pfx*- und *Ampli-Taq*-DNA-Polymerase wurden unterschiedliche Polymerisations-Temperaturen nach Herstellerempfehlung verwendet, 68°C bzw. 72°C.)

1 Zyklus	Denaturierung	3 min	94°C
25 Zyklen	Denaturierung	1 min	94°C
	Hybridisierung	30 sec	50-65°C
	Polymerisation	1 min/1000 bp	68°C/72°C
1 Zyklus	Polymerisation	10 min	68°C/72°C

3.1.11 Kolonie-PCR

Um eine größere Menge von Klonen nach einer Transformation untersuchen zu können, wurde die Kolonie-PCR verwendet. Hierdurch konnten die Klone identifiziert werden, welche die gewünschte rekombinierte DNA besaßen. Dazu wurden Einzelkolonien mit einem sterilen Zahnstocher zunächst in ein PCR-Gefäß mit 50 µl PCR-Reaktionsansatz und von dort in ein PCR-Gefäß mit 100 µl LB-Amp-Medium überführt. Zum Schluß wurden die Zellen der jeweiligen Einzelkolonie auf einer LB-Amp-Platte ausgestrichen. Der LB-Ansatz und die LB-Platten wurden bei 37°C inkubiert. Der PCR-Reaktionsansatz enthielt die zur integrierten DNA-Sequenz spezifischen Oligonucleotide. In Transformanden, welche die gesuchte rekombinierte DNA besaßen, konnte die integrierte Zielsequenz amplifiziert und die entstandenen DNA-Fragmente über Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Mit Hilfe dieser zeitsparenden Kontroll-PCR konnte die gewünschte rekombinierte DNA schnell gefunden werden. Von den positiven Klonen konnte dann direkt von dem 100 µl LB-Ansatz eine Übernachtskultur für einen DNA-“Midiprep“ (50-200 ml) oder DNA-“Miniprep“ (1-5 ml) angesetzt werden (siehe Kap. 3.1.4 auf Seite 24).

3.1.12 Gerichtete Mutagenese mit der PCR

Einführung von Punktmutationen

Zur Erzeugung von einfachen Punktmutationen wurden zwei verschiedene, auf PCR basierende, Verfahren angewandt. Lagen die zu verändernden Nucleotide nahe am 5'- oder 3'-Ende des zu klonierenden Gens, wurden spezifische Oligonucleotide, die die geänderte Nucleotidsequenz besaßen, definiert und in einer PCR mit *Taq*- oder *Pfx*-Polymerase eingesetzt. Diese Methode ist nur sinnvoll bei Mutationen der ersten bzw. letzten 20 Aminosäuren, da Oligonucleotide von über 60 Nucleotiden Länge nur schwer zu synthetisieren sind.

Weiter vom N- bzw. C-Terminus entfernt liegende Mutationen wurden über die PCR-Fusionsmethode („Overlap Extension PCR“) (Ho et al., 1989) oder die ähnliche „Megaprimer“-Methode (Sarkar und Sommer, 1990) erzeugt. Bei der PCR-Fusionsmethode wurden zunächst mit Hilfe von komplementären Mutagenese-Oligonucleotiden, sowie den spezifischen 5'- und 3'-Oligonucleotiden, zwei PCR-Fragmente produziert, welche überlappende Enden von etwa 30 Nucleotiden Länge mit der gewünschten Mutation besaßen. Zusammen mit den spezifischen 5'- und 3'-Oligonucleotiden wurden diese beiden Fragmente in einer darauffolgenden zweiten PCR-Reaktion zu dem vollständigen Gen fusioniert, wobei die überlappenden Enden der beiden Fragmente als „Megaprimer“ für den komplementären Strang dienten. Das amplifizierte PCR-Fusionsprodukt wurde danach in den gewünschten Vektor kloniert. Zur Vermeidung von 3'-überhängenden Nucleotiden (zumeist Adenin) wurde zur Konstruktion der beiden überlappenden Fragmente eine DNA-Polymerase mit 3'-5'-Exonucleaseaktivität benutzt (*Pfu*- oder *Pfx*-DNA-Polymerase). Zusätzlich mussten die im ersten Schritt hergestellten Fragmente vor Beginn der zweiten PCR durch Aufreinigung über ein präparatives Agarose-Gel von restlicher Wildtyp-DNA getrennt werden, um eine unerwünschte Amplifizierung des Wildtyp-Gens mit Hilfe der 5'- und 3'-terminalen Oligonucleotide zu verhindern.

Bei der „Megaprimer“-Methode (Sarkar und Sommer, 1990) werden in einer ersten PCR mit *Pfu*- oder *Pfx*-Polymerase ein unverändertes, flankierendes Oligonucleotid und ein den gewünschten Basenaustausch tragendes, internes Oligonucleotid eingesetzt. Das

erhaltene PCR-Produkt wird als „Megaprimer“ zusammen mit dem zweiten flankierenden Oligonucleotid in einer zweiten PCR-Runde eingesetzt, wodurch das gesamte Gen mit der Punktmutation amplifiziert wird. Die empirisch ermittelte optimale Menge an „Megaprimer“ in der zweiten PCR-Runde betrug ca. 150-200 ng.

In der Regel wurden neben den für die Veränderung der DNA-Sequenz notwendigen Mutationen an der betreffenden Stelle zusätzlich noch weitere Mutationen eingeführt, welche eine Erkennungssequenz für Restriktionsenzyme bilden. Diese Mutationen waren sogenannte „stille“ Mutationen, die nicht die Aminosäuresequenz verändern. Durch die Einführung einer Erkennungssequenz konnten Mutanten auch ohne aufwendige Sequenzierung schnell identifiziert werden.

Einführung von Deletionen

Zur Deletion von Abschnitten innerhalb eines Gens wurde auch die PCR-Fusionsmethode eingesetzt. Dafür wurden insgesamt vier Oligonucleotide verwendet: zwei Oligonucleotide für das 5'- bzw. 3'-Ende des Gens, sowie zwei Oligonucleotide für die Deletion. Zur Erläuterung der Methode dient die Klonierung der „Insert“-Deletionen dCK Δ 1-3, siehe Abb. 3.1.

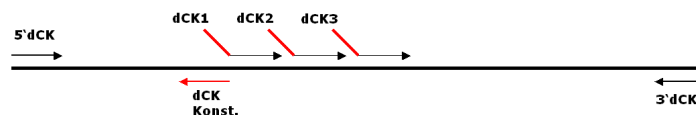


Abbildung 3.1: Darstellung der PCR-Strategie zur Klonierung der „Insert“-Deletionen dCK Δ 1-3.

Für jede Deletion wurde ein Oligonucleotidpaar entworfen. Das erste Oligonucleotid dieses Paares besaß nur einen konstanten, überlappenden Teil (dCK Konst.), welcher der 5'-Region neben der gewünschten Deletion entspricht. Das zweite Oligonucleotid (dCK1, dCK2 oder dCK3) besaß den konstanten Teil vom ersten Oligonucleotid und zusätzlich einen variablen Teil, der der 3'-Region neben der gewünschten Deletion entspricht. In der ersten PCR-Runde wurden so mit jeweils einem äußerem Oligonucleotid und einem Oligonucleotid für die Deletion zwei Teilfragmente hergestellt. Auf das Beispiel der „Insert“-Deletionen bezogen, wären das ein PCR-Fragment mit den Oligonucleotiden 5'dCK und dCK Konst. und ein PCR-Fragment mit den Oligonucleotiden dCK1 und

3'dCK (siehe Abb. 3.1 auf der vorherigen Seite). In einer zweiten PCR-Runde wurden dann die zwei PCR-Fragmente unter Verwendung der beiden äußeren Oligonucleotide (5'dCK und 3'dCK) zu dem vollständigen Gen fusioniert, wobei der konstante Teil der beiden Fragmente als Überlappungsbereich diente.

3.2 Isolierung von Proteinen aus *E. coli*

3.2.1 Expression im analytischen Maßstab

Vor Beginn der Proteinreinigung in einem größeren Maßstab wurde die Proteinexpression zunächst in einem kleineren Kulturvolumen überprüft. Dazu wurde 1 ml einer Übernachtskultur von transformierten *E. coli*-Zellen (BL21(DE3)) in 5 ml LB-Amp-Medium verdünnt und die Zellen bis zu einer $OD_{600} = 0,7-0,9$ bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zur Induktion der Expression des Gens wurde der Kultur IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt und die Kultur weiter bei 37°C (bzw. 30°C oder 25°C) inkubiert. Sowohl vor der Induktion als auch nach dem Wachstum von 2, 4 und 6 Std., sowie nach einer Nacht, wurden der Kultur jeweils ein Volumen an Zellen entnommen, welches der $OD_{600} = 1,0$ entsprach. Die einzelnen Proben wurden 3 Min. bei 4000 g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 µl Laemmlipuffer resuspendiert. Nach 5- bis 10-minütigem Erhitzen auf 95°C (zur Denaturierung der Proteine) wurden 10 µl der Proben durch analytische SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf einem 12 %igen Gel überprüft oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.2.2 Expression von His₆-Fusionsproteinen in *E. coli*

Rekombinante Proteine mit mindestens 6 Histidinresten am N- oder C-Terminus können über Ni-NTA-Agarose aus einem Bakterienlysat aufgereinigt werden (Hochuli, 1990). Die Histidinreste binden bei der Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose an immobilisierte Nickel-Ionen, die von den Nitrilotriacetat-Gruppen des Harzes komplexiert werden. Die Elution erfolgt mit Imidazol, das anstelle von Histidin an die Nickel-Ionen bindet und so das Fusionsprotein verdrängt. Diese Methode der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie ist zur Reinigung sowohl von nativen als auch von denatu-

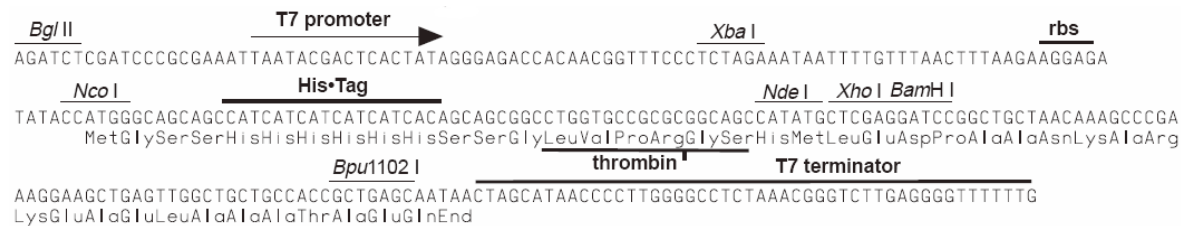


Abbildung 3.2: Schema der Klonierungs- und Expressions-Region des pET14b Vektors (Novagen, Madison, USA).

rierten Proteinen anwendbar. Für die Expression von Histidin-Fusionsproteinen in *E. coli*-Zellen (BL21(DE3)) wurde das Gen, welches für das entsprechende Protein kodiert, über die Restriktionsschnittstellen *NdeI/BamHI* in die Plasmid- Vektoren pET14b (HisN) integriert (siehe Abb. 3.2).

Für die Proteinaufreinigung im größeren Kultur-Maßstab von 250 ml bis 1 l wurden 50 ml LB-Amp-Medium mit *E. coli*-Zellen (BL21(DE3)) einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur mit frischem LB-Amp-Medium verdünnt und die Zellen bis zu einer $OD_{600} = 0,7-0,9$ bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Induktion der Expression durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,1–1 mM wurde die Kultur für weitere 4 bis 6 Std. bei 37°C (bzw. über Nacht bei 30°C oder 25°C) inkubiert.

Der Aufschluß der Bakterienzellen erfolgte bereits durch das Auftauen der Zellen bei RT und durch zusätzliche Behandlung mit Ultraschall (3 Schritte, jeweils 30 - 60 Sek., 50 % Pulse, 200 Watt) und abwechselnder Kühlung auf Eis (30 - 60 Sek.). Dafür wurde das Bakterienpellet in 5–50 ml Lysepuffer resuspendiert. Je nach Protein und Anwendung wurde dabei ein Tris- oder Hepespuffer verwendet (siehe Kap. 2.8 auf Seite 20). Die Freisetzung der Nucleinsäuren, ein Kriterium für den Zellaufschluß, konnte durch Messung der Absorption bei 260 nm verfolgt werden. Die Zelltrümmer wurden durch 20-minütige Zentrifugation bei > 10000 g pelletiert, der Überstand mit dem löslichen Protein über eine zuvor mit Waschpuffer äquilibrierte Säule mit 1 ml (für ein 250 ml-Kulturvolumen) bzw. 4 ml (für ein 1 l-Kulturvolumen) Ni^{2+} -NTA-Agarose (50 %ige Suspension, äquilibriert in Waschpuffer) gegeben und der gesamte Durchlauf aufgefangen (Durchflußrate 0,5 ml/Min). Danach wurde die Ni^{2+} -Agarose mit 100 bzw. 200 ml Tris- oder Hepes-Waschpuffer gewaschen (Durchflußrate 0,5 ml/Min), bis der A_{280} -

Wert des Durchlaufs unter 0,01 lag. Das an die Matrix aus Ni²⁺-Agarose gebundene Protein wurde mit 10 ml (bei einem 250 ml-Kulturvolumen) bis 20 ml (bei einem 1 l-Kulturvolumen) Tris- oder Hepes-Elutionspuffer eluiert. Gereinigte Proteine wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Kontrolle der Proteinaufreinigung wurden Proben vor und nach der Induktion, von den einzelnen Fraktionen mit eluiertem Protein und von dem Zell-Lysat genommen. Diese Proben wurden nach Zugabe von Laemmlipuffer 5 bis 10 Min. auf 95°C erhitzt. Um weitere Informationen zur Effizienz der Aufreinigung zu erhalten, wurde zudem in einigen Fällen auch der Durchlauf mit der Gesamtheit des nicht an die Ni²⁺-NTA-Agarose gebundenen Proteins (sowie evtl. einigen Waschschritten) entsprechend den obigen Angaben präpariert. Durch Analyse der entnommenen Proben von der nichtinduzierten Kultur bis zu den einzelnen Fraktionen des gereinigten Proteins auf 12 %-igem Polyacrylamid-Gel konnte der gesamte Prozeß von der Proteinexpression in *E. coli* bis zur vollständigen Reinigung verfolgt und hinsichtlich der Qualität und Quantität des gereinigten Proteins beurteilt werden.

3.2.3 Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli*

Eine zweite Methode der affinitätschromatographischen Reinigung von Proteinen aus Bakterienlysaten bietet das System mit der Glutathion-S-Transferase (GST) (Smith und Johnson, 1988; Guan und Dixon, 1991). Bestandteile dieses Systems sind die pGEX-Plasmidvektoren, welche die für die Glutathion-S-Transferase kodierende cDNA enthalten, und die Bindungsmatrix aus Glutathion-Sepharose-4B.

In dieser Arbeit wurde standardmäßig der Vektor pGEX-RB (siehe Abb. 3.3 auf der nächsten Seite) verwendet (Brundiers, 1999). Er basiert auf dem Vektor pGEX-TT (Smith und Johnson, 1988), besitzt jedoch eine modifizierte Klonierungs-Region. Der Vektor besitzt nach dem GST eine Sequenz, welche für eine Thrombin-Schnittstelle kodiert. Die Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli* unterliegt der Kontrolle des *tac*-Promoters, welcher durch das Thiogalactosid IPTG induziert wird. Die Bildung des GST-Fusionsproteins erfolgt wenige Std. nach der Induktion. Nach mechanischem Aufschluß der Bakterienzellen kann das GST-Fusionsprotein durch Bindung an die

Glutathion-Sepharose-4B und anschließender Elution mit 10 mM Glutathion aus dem Lysat affinitätschromatographisch gereinigt werden.

Bevor mit der Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli*-Kulturen in größerem Maßstab begonnen wurde, erfolgte als erstes eine Überprüfung der Expression in kleinerem Kulturmaßstab. Dazu wurden mit dem Plasmidvektor pGEX-RB transformierte *E. coli*-Zellen (BL21(DE3)) wie in Kap. 3.2.1 auf Seite 33 beschrieben behandelt. Abweichend von dem Protokoll wurden die Zellen erst bei einer $OD_{600} = 0,8-1,0$ mit IPTG in einer Endkonzentration von 0,1 mM induziert. Die Expression von GST-Fusionsproteinen in 1 Liter Kulturvolumen erfolgte wie in Kap. 3.2.2 auf Seite 33 beschrieben. Das Zellpellet wurde zum Schluß in 50 ml eiskaltem PBS-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Zur Erhöhung der Effizienz des Zellaufschlusses sowie der Löslichkeit des GST-Fusionsproteins wurde das Bakterienlysate nach Zugabe von Triton X-100 (Endkonzentration 0,5-1 %) 30-60 Min. vorsichtig bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch 10-minütige Zentrifugation bei 12000 g und 4°C pelletiert und der Überstand von 50 ml mit dem löslichen Protein in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Überstand wurden 2 ml 50 %ige Glutathion-Sepharose-4B-Lösung, die mit PBS-Puffer äquilibriert wurde, hinzugefügt und der gesamte Ansatz 30 Min. bei RT unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Die gesamte Matrix mit absorbiertem Fusionsprotein wurde nun in eine 10 ml-Säule überführt und der Durchlauf mit dem ungebundenen Protein aufgefangen. Die Glutathion-Sepharose-Matrix wurde danach

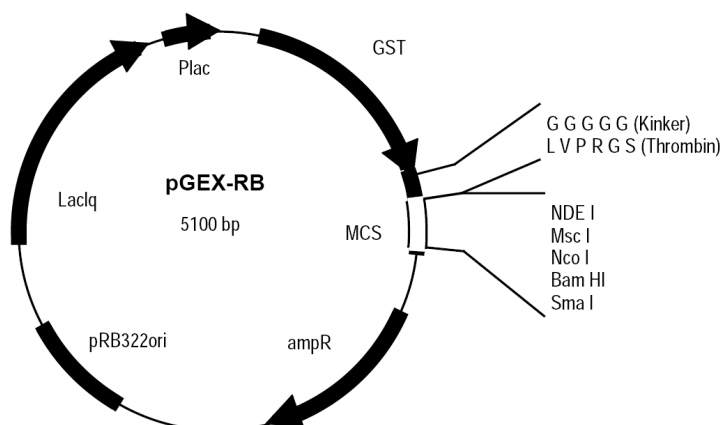


Abbildung 3.3: Schema des *E. coli*-Expressionsvektors pGEX-RB (Brundiers, 1999).

mindestens dreimal mit 10 ml PBS-Puffer gewaschen. Die exprimierten Proteine wurden auf zwei unterschiedliche Arten eluiert:

(A) Elution als GST-Fusionsprotein

Das gebundene Fusionsprotein wurde in 3 Schritten durch das Zufügen von jeweils 1 ml Glutathion-Elutionspuffer und daran anschließender mindestens 10-minütiger Inkubation bei RT eluiert. Die drei Fraktionen mit gereinigtem Fusionsprotein wurden zum Schluß vereinigt und nach Bedarf konzentriert. Die Konzentrierung erfolgte mit „Vivaspin-20“-Konzentratoren mit einer molekularen Ausschlußgröße von 10 kDa. Laut Protokoll wurde für 30-90 Min. bei 3000 g und 4°C bis zur gewünschten Konzentration zentrifugiert.

(B) Thrombinverdau zur Freisetzung des Proteins ohne GST

Durch Einwirkung der Protease Thrombin auf das noch an die Glutathion-Sepharose-Matrix gebundene Fusionsprotein war es möglich, das Protein von dem N-terminalen GST, das an der Matrix gebunden bleibt, abzuspalten und direkt zu eluieren. Dazu wurde die Matrix mit einem Volumen Thrombinlösung (50 U Thrombin in 1 ml PBS-Puffer) 2-12 Std. bei 4°C inkubiert. Eine Einheit der Thrombinlösung spaltet 100 µg eines Test-Proteins in 16 Std. bei 22°C. Dieser Schritt wurde mindestens zweimal wiederholt. Die Kontrolle der Menge an eluiertem Protein erfolgte durch den Bradford-Test (siehe Kap. 3.3.1 auf der nächsten Seite) oder durch Messung der Absorption bei 280 nm (siehe Kap. 3.3.2 auf der nächsten Seite). Zur Kontrolle der Proteinaufreinigung wurden jeweils Proben der einzelnen Aufreinigungsschritte entnommen, nach Zugabe von Laemmli-Puffer 5 bis 10 Min. auf 95°C erhitzt und durch Gelelektrophorese auf einem 12 %-igen Polyacrylamidgel qualitativ und quantitativ analysiert. Das Thrombin wurde mit Hilfe von Benzamidin-Sepharose entfernt. Dazu wurde das Eluat mit der entsprechenden Menge Benzamidin-Sepharose für 10 Min. bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Benzamidin-Sepharose durch Zentrifugation sedimentiert und der Proteinüberstand abgenommen. Gereinigte Proteine wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Zur Stabilisierung der Proteine enthielten die Elutionspuffer mindestens 10 % Glycerin.

3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

3.3.1 Bradford-Test

Zur schnellen Abschätzung des Proteingehalts einer Proteinlösung wurde die Quantifizierungsmethode nach Bradford (Bradford, 1976) verwendet. Der in der Färbelösung enthaltene Farbstoff Coomassie-Brillantblau bindet unspezifisch an Proteine, besonders an kationische, nichtpolare und hydrophobe Reste, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm verschiebt. Die Absorption hängt in einem Bereich von ca. 0,2-1,4 mg ml⁻¹ (20-140 µg Gesamtprotein) linear vom Proteingehalt der Lösung ab. Es wurden 800 µl Proteinlösung mit 200 µl Bio-Rad Proteinfärbelösung versetzt und gemischt. Innerhalb weniger Min. bildete sich ein blauer Komplex aus Protein und Farbstoff, der nach ca. 5 Min. durch Absorptionsmessung bei 595 nm gegen eine Referenz mit gleichem Puffer im Spektrophotometer gemessen wurde. Die Proteinkonzentration der Probe wurde durch Vergleich mit einer Kalibrierungskurve mit BSA festgestellt.

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration durch UV-Absorption

Zur Berechnung der Proteinkonzentration durch UV-Absorption wurde der molare Extinktionskoeffizient (ϵ_M) eines Proteins mit bekannter Aminosäuresequenz aus der Anzahl an aromatischen Aminosäuren berechnet (Gill und Hippel, 1989). Dazu wurde die folgende Formel verwendet:

$$\epsilon_{280} (M^{-1}cm^{-1}) = (\text{Anzahl Trp}) \times 5500 + (\text{Anzahl Tyr}) \times 1490 + (\text{Anzahl Cys}) \times 125$$

Durch Einsetzen des berechneten molaren Absorptionskoeffizienten in das Lambert-Beersche Gesetz ($E = \epsilon \cdot c \cdot d$ mit $d = 1$ cm) konnte aus der Absorption bei 280 nm die Konzentration eines Proteins berechnet werden.

3.4 Analyse von Proteinen durch SDS-PAGE

Durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Anwesenheit des Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) nach Laemmli (Laemmli, 1970) können Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht getrennt werden. Da die negative Oberfläche des Protein-SDS-Komplexes

proportional zur Masse des jeweiligen Proteins ist, kann die Laufgeschwindigkeit in etwa als umgekehrt proportional zur Masse des wandernden Proteins angesehen werden. Durch Vergleich mit mitgeführten Proteinstandards kann so das Molekulargewicht einer Probe abgeschätzt werden.

Die Denaturierung der Proteine erfolgt durch das in dem Laemmlipuffer vorhandene anionische Detergenz SDS, welches von Proteinen in großen Mengen gebunden wird, sowie durch β -Mercaptoethanol, welches die Disulfidbindungen in Proteinen reduziert. Durch die negative Ladung der Sulfatgruppe des SDS ist der gebildete SDS-Proteinkomplex stark negativ geladen, sodaß die native Ladung des Proteins vernachlässigbar ist. Die Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen in der SDS-PAGE wird daher hauptsächlich durch den Siebeffekt der Gelmatrix und von der angelegten Stromstärke bestimmt und korreliert mit dem Molekulargewicht der Proteine. Die Porengröße der Gelmatrix kann durch Veränderung des Gehalts an Acrylamid-N,N'-Methylenbisacrylamid variiert werden. Mit 12 %igen Polyacrylamidgelen (siehe Tab. 3.5) konnten Proteine mit einer Größe von 15 bis 60 kDa aufgetrennt werden; für größere Proteine wurden entsprechend geringer konzentrierte Gele hergestellt.

	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid	5 %	12 %
Volumen (ml)	10,0	25,0
30 % Acrylamid/N,N'-Methylen-Bis-acrylamid (ml)	1,3	10,0
4 x Tris-HCl/SDS, pH 6,8 (ml)	2,5	-
4 x Tris-HCl/SDS, pH 8,8 (ml)	-	6,25
H ₂ O (ml)	6,1	8,65
10 % (w/v) APS (μ l)	50	83
TEMED (μ l)	10	17

Tabelle 3.5: Zusammensetzung für ein 12 %iges Tris-Polyacrylamidgel.

Die SDS-PAGE wurde als diskontinuierliche Gelelektrophorese, d. h. mit Sammel- und Trenngel in unterschiedlichen Konzentrationen, in Mini-Elektrophoresekammern „Protean 3“ von Bio-Rad durchgeführt. Die Herstellung der SDS-PAGE-Gele erfolgte mit den Komponenten des „Protean 3“-Systems nach Angaben des Herstellers. Die Elek-

trophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 30 bis 45 mA und war beendet, sobald der untere Farbmarker Bromphenolblau die untere Kante des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde bei RT unter leichtem Schütteln 10-20 Min. in der Färbelösung (siehe Kap. 2.8 auf Seite 20) inkubiert und zum Schluß entfärbt. Zum Entfärben standen zwei Methoden zur Verfügung, entweder wurde das Gel für 1-3 Std. in Entfärbelösung gelegt oder für schnellere Ergebnisse durch zwei- bis dreimaliges Aufkochen in Wasser in einer Mikrowelle entfärbt.

3.5 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die Kalorimetrie allgemein ist eine experimentelle Methode, die es ermöglicht, die bei Zustandsänderungen auftretenden Enthalpieänderungen quantitativ zu bestimmen. Die isotherme Titrationskalorimetrie (ITK) ist eine Titration mit gleichzeitiger kalorimetrischer Detektion bei gleichbleibender Temperatur. Mit dieser Methode läßt sich die Bindungswärme, die Wärme (Enthalpie) die bei der Bindung umgesetzt wird, messen. Dadurch läßt sich die Bindung eines Liganden an das Enzym direkt über die Bindungswärme messen und erlaubt die Bestimmung von Reaktionsenthalpie, Bindungskonstanten, Stöchiometrie und Reaktionsentropie.

Das Kernstück des Titrationskalorimeters bilden zwei identischen Zellen, die Mess- und die Referenzzelle, mit einem Volumen von je ca. 1,3 ml. Beide Zellen besitzen zur vollständigen Befüllung eine enge Kapillare und sind von einem adiabatischen Mantel aus Aluminium umgeben, der den Druck- und Temperatureaustausch der Zellen mit ihrer Umgebung verhindert.

Die Referenzzelle enthält das Lösungsmittel der Probe. Die Messzelle wird mit einer Lösung des einen Reaktionspartners, in der Regel das Enzym, befüllt. Der zweite Reaktionspartner, in der Regel der Ligand, befindet sich in der Hamilton-Spritze. Diese besitzt ein Volumen von 250 µl und ist mit einer langen Edelstahl-nadel versehen. Das abgeflachte Nadelende dient als Rührer und ermöglicht die gleichzeitige Applikation und Durchmischung des Inhaltes der Messzelle. Aus der Injektionsspritze wird in festgelegten Zeitintervallen ein definiertes Volumen von einigen µl computergesteuert in die Messzelle injiziert. Durch einen Motor angetrieben, rotiert die Spritze während des

Experiments mit einer konstanten Geschwindigkeit von 400 Umdrehungen/Min. Die Temperatur ist nicht absolut konstant, sondern steigt während einer Messung um ca. $0,002-0,04 \text{ K}\cdot\text{h}^{-1}$, da die Referenzzelle mit einer geringen Heizleistung von wenigen μW beheizt wird. Dieses Heizsystem wird als „Reference Offset“ (RO) bezeichnet.

Ein zweites Heizsystem, der „Cell Feedback“ (CFB), dient der Ermittlung der Temperaturdifferenz ΔT_1 zwischen der Mess- und der Referenzzelle, und ein drittes, der „Jacket Feedback“ (JFB), misst die Temperaturdifferenz ΔT_2 zwischen den Zellen und dem Mantel. Die Temperatur der Messzelle und des Mantels werden jeweils auf die der Referenzzelle abgestimmt. Der Vergleich der Temperaturen der beiden Zellen erfolgt 30 Mal pro Sek. und ergibt für beide ΔT -Werte Null.

Wird aufgrund einer Reaktion in der Messzelle Wärme freigesetzt bzw. absorbiert, kommt es zu einer messbaren Temperaturänderung. Im Fall einer exothermen Reaktion wird der CFB verringert und im Fall einer endothermen Reaktion verstärkt, bis ΔT auf Null zurückreguliert ist. Dieses elektrische Signal wird als Funktion der Zeit mit Hilfe eines Computers aufgezeichnet und mit der ORIGIN™ITCSoftware ausgewertet. Das Kalorimeter erlaubt Messungen zwischen 0 und 85°C und erfasst Temperaturänderungen bis 10^{-6} K . Die Wärmemengen werden im $\mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$ -Bereich detektiert.

Versuchsdurchführung

Alle Puffer und Probelösungen wurden vor der Messung mindestens 10 Min. entgast. Entscheidend für das Experiment ist, daß der Puffer für das Bindungsprotein und die Ligandenlösung identisch ist. Daher wurden entweder Bindungsprotein- und Ligandenlösung gegeneinander dialysiert, oder für das Ansetzen der Ligandenlösung der Durchfluß von der Einkonzentrierung des Bindungsproteins verwendet. Standardmäßig wurden 20 mM Hepespuffer (pH 7,5) für die Experimente verwendet.

Zuerst wurde die Probelösung in der Messzelle zur Temperierung vorgegeben und danach die Hamilton-Spritze befüllt und eingesetzt. Nachdem sich eine Basislinie eingestellt hat, wurde das Experiment gestartet. Dabei wurden in der Regel 14 Injektionen mit je 8 μl Substratlösung durchgeführt. Alle Messungen wurden bei 25°C vorgenommen.

Aus den Rohdaten wurde ein integraler Plot erstellt, bei dem die Summe der Wärmeabgabe und -aufnahme bei Injektion gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen wurde.

Mit Hilfe der Software ließen sich drei Größen aus der Kurve berechnen: Die Anzahl der Bindungsstellen n , die Dissoziationskonstante K_d und ΔH . ΔH ist die pro Mol Bindungspartner freigesetzte Wärme, die Enthalpie.

Für jede Reaktion, also auch für eine Bindungsreaktion gilt:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3.2)$$

Dabei ist ΔG die freie Energie, die Energie, die zur Bindung treibt. ΔG ergibt sich aus der Dissoziationskonstanten nach:

$$\Delta G = -RT \cdot \ln K_d \quad (3.3)$$

ΔH ist die Wärmeabgabe bzw. -aufnahme einer Bindungsreaktion bei einer bestimmten Temperatur, also die Größe, die vom Kalorimeter bestimmt wird. Aus ΔH und ΔG läßt sich ΔS berechnen.

3.6 Proteintransduktion

Herstellung des Pep-1/Protein-Komplexes (modifiziert nach Morris et al. (2001))

Für die Experimente wurde eine frische Pep-1-Stammlösung hergestellt. Das Peptid wurde für eine Konzentration von 2 mg/ml (0,68 mM) in Wasser durch Vortexen gelöst. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Peptid Lösung kann zu Aggregationen führen, deswegen wurde die Stammlösung aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für jede Reaktion wurde die entsprechende Menge Peptid in 100 µl PBS verdünnt. Für eine optimale Transduktion wurde ein molares Verhältnis von Pep-1 zu Protein von 15:1 bis 20:1 angestrebt. Pro Transduktionsreaktion wurden 0,5–1 µg Protein verwendet. 100 µl des verdünnten Proteins wurden zu 100 µl der verdünnten Pep-1-Lösung gegeben und vorsichtig durch Antippen gemischt. Die Pep-1/Protein-Mischung wurde für 30 Min. bei RT inkubiert, um die Bildung des Pep-1/Protein-Komplexes zu ermöglichen. Danach wurde die Mischung direkt für die Proteintransduktion eingesetzt.

PTD- und Pep-1-basierte Proteintransduktion

Für die Proteintransduktion wurden menschliche adhärenente Fibroblastenzellen der Zell-Linie HS-63 verwendet. Alle Versuche wurden in 35 mm Zellkulturplatten durchgeführt. Die Zellen wurden in DMEM-Medium („Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium“) mit 2 mM Glutamin, 1 % Antibiotikum (Streptomycin 10.000 µg/ml, Penicillin 10.000 IU/ml) und 10 % (w/v) fetales Kälberserum bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Pro Ansatz wurden ungefähr 0,3 x 10⁶ Zellen in 2 ml Medium aufgenommen und bei 37°C inkubiert, bis die Zellen eine Dichte von 50-70 % hatten.

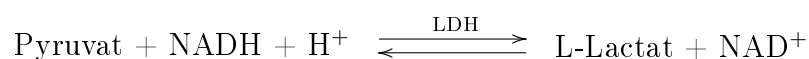
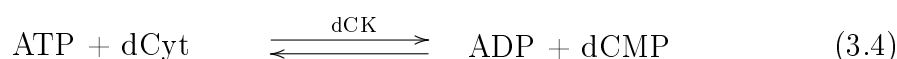
Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 200 µl des Pep-1/Protein-Komplexes bzw. 200 µl der PTD-Proteinlösung überschichtet. Zusätzlich wurden die Zellen dann mit 400 µl ml DMEM-Medium überschichtet, um ein Endvolumen von 600 µl pro Transduktionsansatz zu erhalten. Die Zellen wurden für eine Std. bei 37°C inkubiert, bevor 1 ml DMEM-Medium mit den zu testenden Konzentrationen von Nucleosidanalogen hinzugegeben wurde. Nach 24 Std. wurde die Gabe des Nucleosidanalogs wiederholt. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium und Nucleosidanalogen überschichtet. Nach 48 Std. wurden die Effekte der Proteintransduktion und der Behandlung mit Nucleosidanalogen beobachtet.

3.7 Kinetische Methoden

3.7.1 Messung der Enzymaktivität

Die Messungen der katalytischen Parameter K_M und k_{cat} (Michaelis-Menten-Parameter, siehe Kap. 3.7.2 auf Seite 46) und der spezifischen Aktivität der Desoxyribonucleosid- und Nucleosidmonophosphat-Kinasen (dNK und NMP-Kinasen) wurden ausschließlich unter Fließgleichgewichtsbedingungen („steady-state“) durchgeführt. Dafür wurde ein gekoppelter, spektrophotometrischer Enzymtest mit den Enzymen Lactatdehydrogenase (LDH) und Pyruvat-Kinase (PK) verwendet (Agarwal et al., 1978a,b). Das Enzym Pyruvat-Kinase katalysiert in diesem Enzym-System die Übertragung von einem Phosphatrest des Substrats Phosphoenolpyruvat (PEP) auf ADP, das Reaktionsprodukt der Nucleosid-Kinase. Neben ATP wird bei dieser Reaktion ein Molekül Pyruvat gebildet,

das in einer darauffolgenden, durch das Enzym Lactatdehydrogenase katalysierten Reaktion unter Verbrauch von einem Molekül $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu einem Molekül Lactat reduziert wird (siehe Reaktionsschema 3.4). Im Gegensatz zu NADH absorbiert das während dieser Reaktion gebildete NAD^+ bei einer Wellenlänge von 340 nm fast nicht mehr. Deshalb kann der Verbrauch von NADH spektrophotometrisch nachgewiesen werden. Eine Einheit ist definiert als die Menge an Nucleosid-Kinase, die notwendig ist, um 1 μmol Phosphat in 1 Min. bei 25°C und pH 7,6 von ATP auf das Substrat zu übertragen.



Zu 1 ml an Testlösung (100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 2 mM ATP, 0,5 mM PEP, 0,25 mM NADH, 5 U Lactatdehydrogenase, 4 U Pyruvat-Kinase) wurde gereinigtes Protein in nanomolarer (NMP-Kinasen) oder in mikromolarer (dNK-Kinasen) Konzentration gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrats gestartet. Die Änderung der Absorption bei 340 nm (Absorptionsmaximum von NADH) und 25°C wurde über einen Zeitraum von 5 bis 10 Min. mit einem Photometer (Uvikon 943) gemessen (siehe Abb. 3.4).

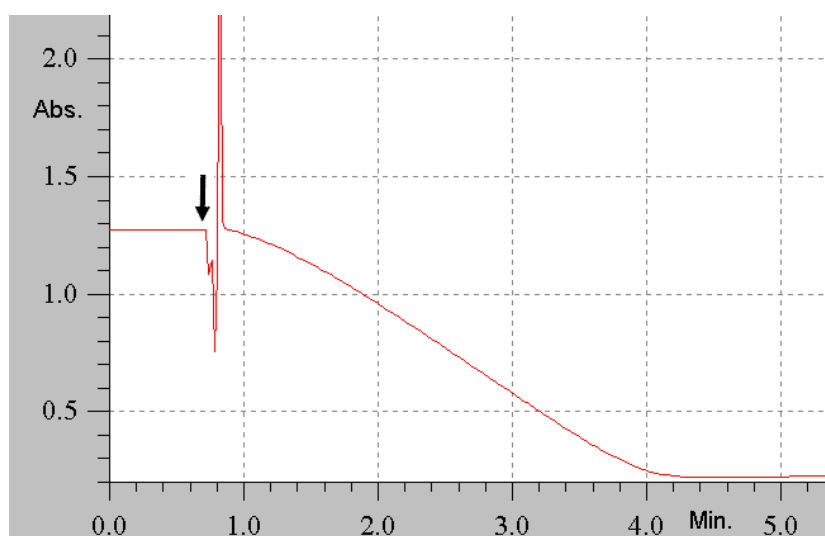


Abbildung 3.4: Beispiel einer Enzymmessung bei 340 nm. Die Änderung der Absorption wurde nach Zugabe des Substrats (Pfeil) verfolgt.

Die Messungen wurden unter sättigenden Bedingungen durchgeführt, d. h. im Test waren alle Substrate im Überschuß vorhanden. Dadurch war eine lineare Abnahme der Absorption bei 340 nm im Anfangsbereich gewährleistet. Mit Hilfe einer eingebauten Software zur Berechnung von zeitabhängigen Kinetiken war es dann möglich, aus dem linearen Bereich des Reaktionsablaufes die Steigung zu berechnen, die der Abnahme der Absorption pro Min. entsprach ($\Delta A_{340}/\text{min}$). Die spezifische Aktivität wurde nach den folgenden Formeln 3.5-3.7 berechnet:

$$\text{Volumen-Aktivität (in der Testlösung)} = \frac{\Delta A_{340}/\Delta t}{\epsilon \cdot d} \quad [\text{U/ml}] \quad (3.5)$$

$$\text{Volumen-Aktivität (in der Proteinprobe)} = \frac{\Delta A_{340}/\Delta t \cdot V}{\epsilon \cdot d \cdot v} \quad [\text{U/ml}] \quad (3.6)$$

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\text{Volumen-Aktivität}}{c} \quad [\text{U/mg}] \quad (3.7)$$

$\Delta A_{340}/\Delta t$	=	Absorptionsänderung pro Zeiteinheit
ϵ	=	molarer Absorptionskoeffizient von NADH (6,2 mM ⁻¹ cm ⁻¹ bzw. 6,2 cm ² μmol ⁻¹)
d	=	Lichtweg (Schichtdicke der Messküvette) (cm)
V	=	Reaktionsvolumen (ml)
v	=	Enzym-Probevolumen (ml)
c	=	Proteinkonzentration (mg/ml)
U	=	Enzymeinheit, definiert als die Menge Enzym, welche die Umwandlung von 1 μmol Substrat in Produkt pro Min. unter den vorgegebenen Reaktionsbedingungen katalysiert

Die gebräuchlichste Einheit für die Aktivität von Enzymen unter Fließgleichgewichtsbedingungen ist die sogenannte Umsatzrate. Sie gibt die maximale Anzahl an Substratmolekülen an, welche bei vollständiger Substratsättigung von einem Molekül des Enzyms (bzw. seines aktiven Zentrums) pro Sek. umgesetzt werden kann. Die Umsatzrate wird mit k_{cat} (katalytische Konstante) abgekürzt und hat die Einheit s⁻¹:

$$k_{cat} = \frac{\mu\text{mol (Substrat)}}{\mu\text{mol (Enzym)} \cdot s} \quad [\text{s}^{-1}] \quad (3.8)$$

3.7.2 Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter

Die Michaelis-Menten-Kinetik ist das einfachste Modell, mit der sich enzymatische Reaktionen beschreiben lassen. Die Michaelis-Menten-Gleichung setzt die Katalysegeschwindigkeit mit der Substrat- und der Enzymkonzentration in Beziehung. Die enzymatische Umsetzung eines Substrats S zum Produkt P läßt sich folgendermaßen beschreiben:



Diese Reaktionsfolge beinhaltet die Substratbindung, die eigentliche Reaktion und die Produktdissoziation. ES bezeichnet den Enzym-Substrat-Komplex, EP den Enzym-Produkt-Komplex. Die Änderung der Konzentration des freien Enzyms ergibt sich aus Bindung und Freisetzung des Enzyms in den einzelnen Teilprozessen. Entsprechendes gilt für die Änderungen der anderen Konzentrationen:

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[ES] + k_3[EP] - k_{-3}[E][P] \quad (3.10)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[ES] \quad (3.11)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] + k_{-2}[EP] \quad (3.12)$$

$$\frac{d[EP]}{dt} = k_2[ES] - k_{-2}[EP] - k_3[EP] + k_{-3}[E][P] \quad (3.13)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_3[EP] - k_{-3}[E][P] \quad (3.14)$$

Zur Untersuchung der Reaktion werden die experimentellen Rahmenbedingungen so gewählt, daß vereinfachende Annahmen gemacht werden können:

1. Durch die Bedingungen in dem gekoppelten, spektrophotometrischen Test (siehe Kap. 3.7.1 auf Seite 43) wird gewährleistet, daß das Produkt der Reaktion immer wieder aus dem Gleichgewicht entfernt wird. Daher kann angenommen werden, daß das Produkt nicht wieder an das Enzym bindet, d. h. die mit k_{-3} beschriftete Reaktion findet nicht statt und der Term $k_{-3}[E][P]$ entfällt in den Gleichungen (3.10), (3.13) und (3.14).

2. Die Enzymmessungen werden unter Fließgleichgewichtsbedingungen durchgeführt, bei denen das Substrat in großem Überschuß vorliegt, d. h. $[S] \gg [E]$. Unter diesen Bedingungen bleiben die Konzentrationen von ES, EP und E konstant:

$$\frac{d[E]}{dt} = \frac{d[ES]}{dt} = \frac{d[EP]}{dt} = 0 \quad (3.15)$$

Zur Berechnung von V_{max} nehmen wir zusätzlich an, daß alle Enzyme Substrat oder Produkt gebunden haben, d. h. $[EP] + [ES] = [E]_0$ und $[E] = 0$. Unter Verwendung der Gleichungen (3.13) und (3.15) erhalten wir die folgende Beziehung:

$$0 = \frac{d[EP]}{dt} = k_2[ES] - k_{-2}[EP] - k_3[EP] \quad (3.16)$$

$$= k_2([E]_0 - [EP]) - k_{-2}[EP] - k_3[EP] \quad (3.17)$$

$$k_2[E]_0 = (k_2 + k_{-2} + k_3)[EP] \quad (3.18)$$

Auflösen nach $[EP]$ ergibt:

$$[EP] = \frac{k_2}{k_2 + k_{-2} + k_3} [E]_0 \quad (3.19)$$

$$V_{max} = k_3[EP] = \frac{k_3 k_2}{\underbrace{k_2 + k_{-2} + k_3}_{k_{cat}}} [E]_0 \quad (3.20)$$

$$V_{max} = k_{cat}[E]_0 \quad (3.21)$$

Nun berechnen wir unter den Annahmen 1 und 2 die tatsächliche Reaktionsgeschwindigkeit v . Die Änderung der Konzentrationen in den Gleichungen (3.10), (3.12) und (3.13) können wegen Annahme 2 auf der linken Seite jeweils 0 gesetzt werden. Zunächst wird $[EP]$ aus dem folgenden linearen Gleichungssystem mit den Unbekannten $[E]$, $[ES]$ und $[EP]$ bestimmt:

$$[E] + [ES] + [EP] = [E]_0 \quad (3.22)$$

$$-k_1[S][E] + k_{-1}[ES] + k_3[EP] = 0 \quad (3.23)$$

$$k_2[ES] - (k_{-2} + k_3)[EP] = 0 \quad (3.24)$$

Dabei ergibt sich Gleichung (3.23) aus Gleichung (3.10) unter Berücksichtigung der 2. Annahme. Entsprechend ergibt sich Gleichung (3.24) aus Gleichung (3.13). Die aus den

Gleichungen (3.10), (3.12) und (3.13) unter Berücksichtigung von Annahme 2 entstehenden Gleichungen ergeben nur zwei unabhängige Bedingungen zur Bestimmung der Unbekannten [E], [ES] und [EP]. Als dritte Bedingung nehmen wir deshalb Gleichung (3.22) hinzu. Aus dem Gleichungssystem erhalten wir als Lösung für [EP] (z.B. durch Anwendung des Gaußschen Eliminationsverfahren):

$$[\text{EP}] = \frac{k_1 k_2 [\text{S}][\text{E}]_0}{(k_1 k_2 + k_1 k_{-2} + k_1 k_3)[\text{S}] + (k_2 k_3 + k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3)} \quad (3.25)$$

Für die Reaktionsgeschwindigkeit v erhalten wir:

$$v = k_3 [\text{EP}] = \frac{k_1 k_2 k_3 [\text{S}][\text{E}]_0}{(k_1(k_2 + k_{-2} + k_3))[\text{S}] + (k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3)} \quad (3.26)$$

$$= \frac{k_2 k_3 [\text{S}][\text{E}]_0}{(k_2 + k_{-2} + k_3)[\text{S}] + (k_2 + k_{-2} + k_3) \underbrace{\frac{k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3}{k_1(k_2 + k_{-2} + k_3)}}_{K_M}} \quad (3.27)$$

$$= \frac{k_3 k_2}{\underbrace{k_2 + k_{-2} + k_3}_{k_{cat}}} \frac{[\text{S}][\text{E}]_0}{[\text{S}] + K_M} \quad (3.28)$$

Zusammen mit (3.21) ergibt dies die Michaelis-Menten-Gleichung:

$$v = \frac{V_{max}[\text{S}]}{[\text{S}] + K_M} \quad (3.29)$$

Die Konstante K_M hat die Dimension einer Konzentration (M). Setzt man $[\text{S}] = K_M$ in Gleichung (3.29) ein, dann ist $v = V_{max}/2$. Ein niedriger K_M -Wert zeigt demnach eine hohe Affinität des Enzyms zum Substrat an.

Die Michaelis-Menten-Parameter können experimentell bestimmt werden, indem unter Fließgleichgewichtsbedingungen die Substratkonzentrationen variiert werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit v ist dann, wie Gleichung (3.29) zeigt, hyperbolisch von [S] abhängig.

Die Michaelis-Menten-Parameter K_M und V_{max} verschiedener Desoxyribonucleosid- und Nucleosidmonophosphat-Kinasen wurden mit Hilfe des gekoppelten, spektrophotometrischen Tests (siehe Kap. 3.7.1 auf Seite 43) bestimmt. Zur Ermittlung des K_M des Substrats wurde die Konzentration von ATP konstant im Überschuß von 2 mM gehalten, während das Substrat in mindestens 5 Ansätzen in verschiedenen Konzentrationen (dCyt: 2 μM – 1 mM) hinzutitriert wurde. Die Reaktionsgeschwindigkeiten

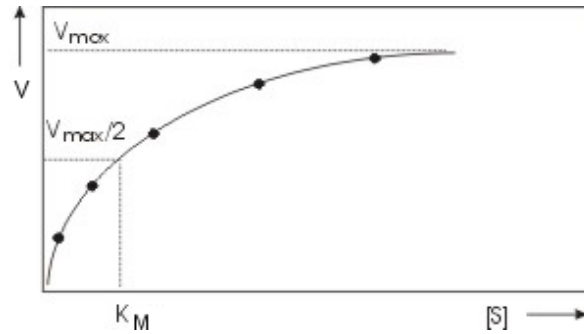


Abbildung 3.5: Diagramm der Reaktionsgeschwindigkeit v in Abhängigkeit der Substratkonzentration $[S]$.

wurden für jeden Ansatz bestimmt und graphisch gegen die eingesetzten Substratkonzentrationen aufgetragen. Die Michaelis-Menten-Parameter konnten dann mittels der Software Origin aus der hyperbolischen Auftragung bestimmt werden (siehe Abb. 3.5). Alle Messungen wurden mindestens zweimal wiederholt.

Berechnung von Inhibierungskonstanten

Die Inhibierungskonstante K_i für das Bisubstratanalogon UP₅A wurde mit Hilfe des gekoppelten, spektrophotometrischen Tests bestimmt (siehe Kap. 3.7.1 auf Seite 43). Die Messungen wurden bei konstanter ATP- und Substratkonzentration durchgeführt. Zur Bestimmung der I₅₀-Konzentration wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Konzentrationen des Bisubstratanalogons gemessen. Der I₅₀-Wert ist die Konzentration von Inhibitor, der zu einer Erniedrigung der Reaktionsgeschwindigkeit von 50 % führt. Für den Fall der kompetitiven Hemmung läßt sich mit Hilfe des I₅₀-Wertes die Inhibierungskonstante K_i bestimmen:

$$K_i = K_M \frac{[I]}{(K_M + [S])\left(\frac{v}{v_i} - 1\right)}$$

Bei I₅₀ ist $\frac{v}{v_i} = 2$

$$K_i = K_M \frac{[I_{50}]}{K_M + [S]}$$

3.7.3 Desaminase-Test

Die Aktivitäten der Cytidin-Desaminasen wurden spektrophotometrisch bestimmt. Die Testlösung enthielt: 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM KCl und 10 mM MgCl₂. Für

die Messungen mit der menschlichen dCMP-DA enthielt der Puffer zusätzlich 2 mM β -Mercaptoethanol und 10 μ M dCTP zur Stabilisierung des Enzyms (Liou et al., 2003). Für die Messung wurde das Substrat in einer Küvette mit dem Puffer gemischt und die Desaminierung durch Zugabe des Enzyms gestartet. Die Aktivität des Enzyms wurde bei verschiedenen Substratkonzentrationen im Bereich 0,05-1 mM getestet. Für die Messungen mit der menschlichen Cytidin-Desaminase wurden 5 μ g Enzym eingesetzt, für die menschliche dCMP-DA lag die eingesetzte Enzymmenge zwischen 0,5-2,0 μ g. Die Abnahme der Absorption wurde bei der entsprechenden Wellenlänge und 25°C über einen Zeitraum von 5 bis 10 Min. mit einem Photometer (Uvikon 943) gemessen. Für Cytidin ($\epsilon = 3,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) wurde die Messung bei einer Wellenlänge von 282 nm, für 5-Aza-Desoxycytidin ($\epsilon = 1,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bei 270 nm und für Desoxycytidin ($\epsilon = 2,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), AraC ($\epsilon = 2,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), Gemcitabin ($\epsilon = 2,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), dCMP ($\epsilon = 2,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und AraCMP ($\epsilon = 2,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bei 290 nm durchgeführt (Vincenzetti et al., 1996, 1999). Eine Enzymeinheit ist dabei definiert als die Menge an Enzym, welche die Desaminierung von 1 μ mol Substrat pro Min. bei 25°C katalysiert. Zur Berechnung der kinetischen Parameter wurden die Formeln 3.5-3.8 verwendet (siehe Kap. 3.7.1 auf Seite 43).

4 Ergebnisse

4.1 Die menschliche Desoxycytidin-Kinase

Die menschliche Desoxycytidin-Kinase (dCK; E.C. 2.7.1.74) ist im Zellkern lokalisiert und verantwortlich für die Phosphorylierung von Desoxyribonucleotiden im „Salvage“-Syntheseweg für die DNA-Synthese (Johansson et al., 1997). Die erste Klonierung und rekombinante Expression der dCK erfolgte 1991 (Chottiner et al., 1991). Die dCK hat eine breite Substratspezifität und kann neben dem namensgebenden Substrat Desoxycytidin auch Desoxyadenosin und Desoxyguanosin phosphorylieren. Das allgemeine Reaktionsschema der dCK ist in der folgenden Gleichung 4.1 zu sehen:



Die menschliche dCK wurde aus einer cDNA-Bibliothek (Invitrogen) mit spezifischen Oligonucleotiden (siehe Kap. 2.3 auf Seite 16) amplifiziert. Mit Hilfe der PCR wurden dabei die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI* für die Klonierung in den Vektor pET14b eingeführt. Mit diesem Vektor ist es möglich, das Fusionsprotein mit N-terminalem Polyhistidinrest zu exprimieren. Das dCK-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI* in den Expressionsvektor pET14b kloniert und zur Überexpression in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) transformiert. Die Kulturen wurden bei 37°C angezogen und bei einer OD₆₀₀ ~0,7 mit 0,1 mM IPTG induziert. Nach einem Wachstum von 8 Std. bei 37°C wurden die Zellen geerntet. Die Produktion der Proteine wurde auf einem SDS-PAGE-Gel überprüft. Die Histidin-Fusionsproteine wurden anschließend affinitätschromatographisch mit Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt (siehe Kap. 3.2.2 auf Seite 33).

4.1.1 Enzymatische Aktivitäten

Das gereinigte Protein wurde kinetisch charakterisiert. Die Aktivitätsmessungen erfolgten mit Hilfe des spektrophotometrischen Enzymtests (siehe Kap. 3.7.1 auf Seite 43). Durch die Messung der Reaktionsgeschwindigkeit bei konstanter Konzentration von Phosphatdonor (2 mM ATP) und Titration des zweiten Substrats wurden die Michaelis-Menten-Parameter der dCK bestimmt (siehe Kap. 3.7.2 auf Seite 46). Die dCK wurde in einer Konzentration von 3 μM im Enzymtest eingesetzt. In Abb. 4.1 sind die Aktivitätskurven für die Substrate AraC und Gemcitabin gezeigt. Die Ergebnisse aller Messungen für die natürlichen Substrate der dCK sind in Tab. 4.1 zusammengefaßt.

Tabelle 4.1: Kinetische Parameter der menschlichen dCK mit den Substraten dCyt, dAde, dGuo, Thd und Cyt.

Substrat	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
dCyt	6	0,025	$4,2 \times 10^3$
Thd	> 5000	0,130	$< 0,026 \times 10^3$
dAde	315	0,816	$2,6 \times 10^3$
dGuo	117	0,326	$2,8 \times 10^3$
Cyt	309	0,555	$1,8 \times 10^3$

Die dCK besitzt eine weitaus geringere Enzymaktivität im Vergleich zu den Nucleosidmonophosphat-Kinasen. Die menschliche UMP/CMP-Kinase z. B. hat einen über 500fach höheren k_{cat} -Wert für die CMP-Phosphorylierung im Vergleich zu der dCyt-Phosphorylierung der menschlichen dCK (siehe Kap. 4.4.1 auf Seite 75). Für das namensgebende Substrat Desoxycytidin liegt die Enzymaktivität k_{cat} der dCK unter den Aktivitäten der anderen Substrate. Die niedrige Enzymaktivität wird durch den vielfach besseren K_M -Wert dieses Substrats ausgeglichen. Zum Vergleich der einzelnen Substrate ist deswegen das Verhältnis von k_{cat}/K_M wichtig, das auch als Effizienz des Enzyms bezeichnet wird. Unter diesem Gesichtspunkt zeigt die dCK die höchste Effizienz mit dem Substrat Desoxycytidin. Für die medizinisch relevanten Nucleosidanaloga AraC, dFdC (Gemcitabin) und 5-Aza-dCyt (Decitabin) wurden die kinetischen Daten bestimmt (siehe Tab. 4.2 und Abb. 4.1). Hier zeigt sich, daß die dCK für alle drei getesteten Nucleosidanaloga eine höhere Effizienz im Vergleich zu den natürlichen Sub-

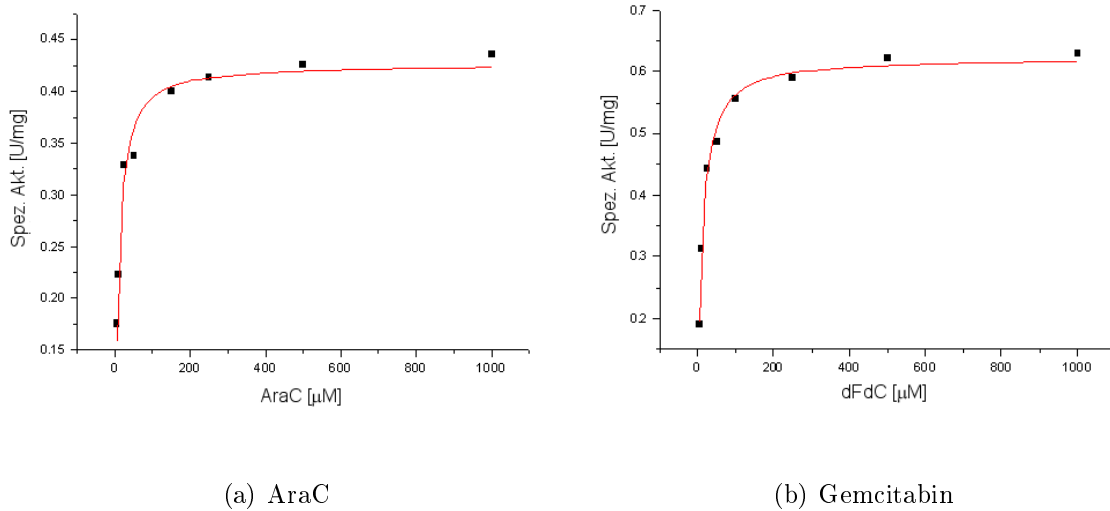


Abbildung 4.1: Aktivitätskurven der menschlichen dCK zur Bestimmung der K_M - und V_{max} -Werte mit den Substraten (a) AraC und (b) Gemcitabin.

straten hat. Im Vergleich zu dem Substrat dCyt liegen die Effizienzen um den Faktor 6-7 höher. In allen Fällen wird die bessere Effizienz durch den bis zu 13fach (dFdC) höheren k_{cat} -Wert verursacht.

Tabelle 4.2: Kinetische Parameter der menschlichen dCK mit ausgewählten Nucleosidanaloga.

Substrat	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
AraC	8	0,229	$28,6 \times 10^3$
dFdC	11	0,335	$30,5 \times 10^3$
5-Aza-dCyt	3	0,082	$27,3 \times 10^3$

4.1.2 Kalorimetrische Bindungsmessungen

Zur Untersuchung der Nucleosidbindung an die menschliche dCK wurde die isotherme Titrationskalorimetrie (ITK) eingesetzt (siehe Kap. 3.5 auf Seite 40). Im Gegensatz zu dem spektrophotometrischen Enzymtest, bei dem die Michaelis-Menten-Parameter K_M und V_{max} bestimmt werden, können hier Bindungsgrößen direkt gemessen werden. Mit Hilfe der Experimente lassen sich drei Größen berechnen: die Anzahl der Bindungsstellen n , K_d und ΔH .

Besonders nützlich ist diese Methode, um Aussagen über inaktive Mutanten machen

zu können, die im Enzymtest keine Aktivität zeigen. Mit Hilfe der ITK läßt sich dann feststellen, ob das Nucleotid noch an das Enzym bindet oder ob der Substratumsatz an einem späteren Schritt beeinträchtigt ist. Nachteil der isothermen Titrationskalorimetrie ist der hohe Bedarf an Enzymmenge pro Messung.

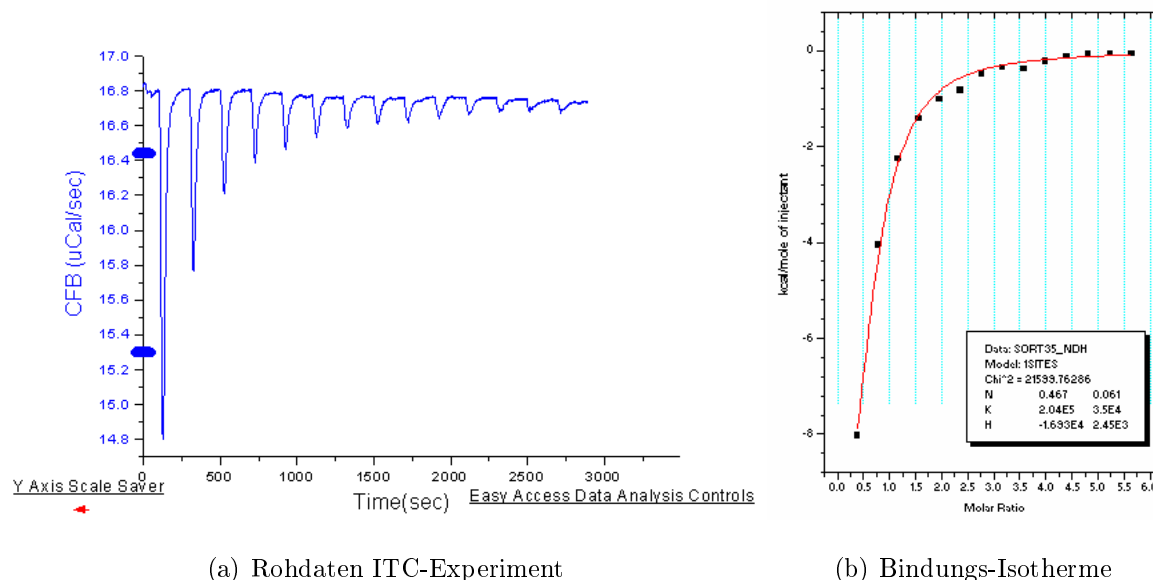


Abbildung 4.2: Isotherme Titrationskalorimetrie (a) Titrationskurve 0.035 mM dCK wt, 14 Injektionen, 8 µl 1 mM Desoxycytidin pro Injektion, (b) Bindungs-Isotherme der Titrationskurve erstellt mit der Origin ITCSoftware.

Für die Titrationsexperimente wurden Enzymkonzentrationen von 10–100 µM eingesetzt. Die Substratkonzentrationen lagen um den Faktor 40–80 über den eingesetzten Enzymkonzentrationen. Bei jedem Experiment wurden in der Regel 14 Injektionen mit je 8 µl Substratlösung durchgeführt (siehe Abb. 4.2 und Abb. 4.3). Das Gesamtvolumen der Messzelle betrug dabei 1,3 ml. Jede Messung wurde mindestens dreimal wiederholt. Die Ergebnisse für die Messung mit dem dCK Wildtyp-Enzym und zwei verschiedenen Substraten sind in Tab. 4.3 zusammengefaßt.

Tabelle 4.3: Thermodynamische Daten für die Interaktion der menschlichen dCK mit verschiedenen Nucleosiden

Enzym	Ligand	K_a (M^{-1})	K_d (μM)	ΔH (kcal/mol)
dCK wt	dCyt	$4,2 \times 10^4$	24,9	-5,2
	AraC	$9,5 \times 10^4$	10,5	-0,8

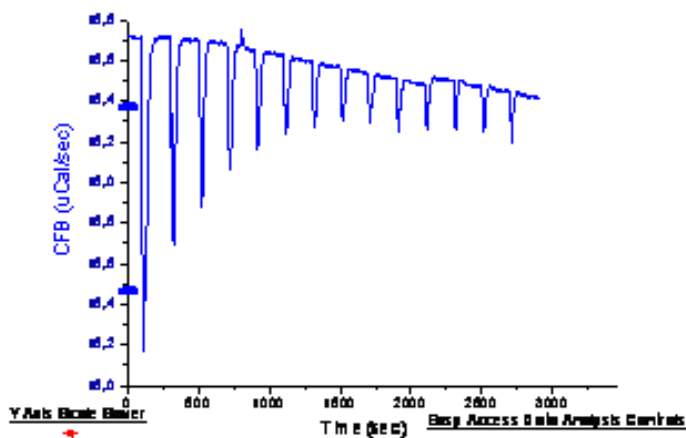


Abbildung 4.3: Isotherme Titrationskalorimetrie: Titrationskurve mit 90 μM dCK wt, 14 Injektionen, 8 μl 1 mM AraC pro Injektion.

4.1.3 Kristallstruktur

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Arnon Lavie, von der University of Illinois in Chicago, wurde die Kristallstruktur der menschlichen Desoxycytidin-Kinase gelöst. Bis zu diesem Zeitpunkt beschränkten sich die strukturellen Informationen über menschliche Nucleosid-Kinasen auf eine einzige Struktur von der menschlichen Desoxyguanosin-Kinase (dGK). Bei dieser Struktur war jedoch der Phosphatdonor ATP unerwartet an der Bindungsstelle des Desoxyguanosins gebunden (Johansson et al., 2001). Dies schränkte die Nützlichkeit dieser Information für Fragen der Bindung des Substrats und der Substratspezifität erheblich ein.

Elisabetta Sabini gelang es, Kristalle von dem Enzym in Komplex mit Phosphatdonor (ADP) und verschiedenen Substraten zu züchten. Von drei verschiedenen Komplexen aus Enzym und Substrat konnte dabei die Kristallstruktur gelöst werden: dCyt, AraC und dFdC jeweils mit ADP an der Phosphatdonorstelle.

Dabei ist in zwei Strukturen auch das für die katalytische Reaktion wichtige Magnesiumion enthalten. Die Röntgenstrukturanalyse ergab die in Abb. 4.4 auf der nächsten Seite zu sehende Quartärstruktur bis zu einer Auflösung von 1,6 Å. Die Strukturdaten wurden in der „Protein Data Bank“ (<http://www.pdb.org>) unter den PDB-Codes 1P60 (dCyt-ADP), 1P5Z (AraC-ADP-Mg), 1P62 (dFdC-ADP-Mg) und 1P61 (dCyt-ADP) hinterlegt und sind dort online abrufbar (Berman et al., 2000).

Die menschliche dCK ist ein homodimeres globuläres Protein und besteht aus 260 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 30,5 kDa. Jedes Monomer

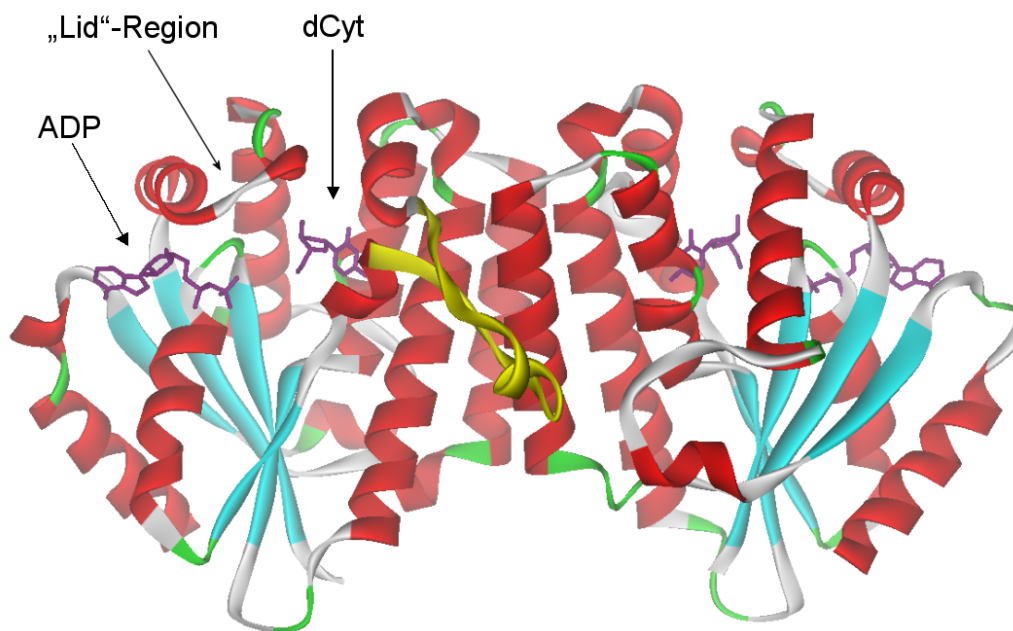


Abbildung 4.4: Quartärstruktur der menschlichen dCK mit gebundenem Desoxycytidin und ADP (PDB-Code 1P60). Die dCK bildet Dimere, hervorgehoben in Gelb ist die „Insert“-Region (siehe Kap. 4.2 auf Seite 60).

bildet einen Kern aus einem fünfgliedrigen β -Faltblatt, umgeben von zehn α -Helices. Die Dimer-Kontaktfläche besteht aus vier Helices, von jedem Monomer sind dabei die Helices α_4 und α_7 beteiligt.

In der Struktur der dCK gibt es drei hervorzuhebende Sequenzmotive, die eine wichtige Rolle für die Funktion des Enzyms spielen. In dem Sequenzvergleich in Abb. 1.1 auf Seite 4 sind diese drei Motive eingezeichnet. Das erste Motiv ist der hoch konservierte „P-Loop“, der von den Aminosäuren Gly28 bis Ser35 gebildet wird und die Konsensus-Sequenz GX_4GKS/T besitzt. Dieser „P-Loop“ bindet und koordiniert die α - und β -Phosphorylgruppen des Phosphatdonors mit Hilfe von Interaktionen zwischen dem Wasserstoff der Amidgruppe des Lys34 und den Sauerstoffatomen der Phosphatreste.

Das zweite Motiv wird von den Aminosäuren Glu127, Arg128 und Ser129 gebildet („ERS“-Sequenzmotiv). Dieses Sequenzmotiv ist bei den menschlichen Enzymen dCK, dGK und Thymidin-Kinase 2 (TK2) und der *Drosophila melanogaster* Desoxyribonucleosid-Kinase (*Dm*-dNK) stark konserviert (siehe Abb. 4.12 auf Seite 69). Bei der dCK findet eine direkte Interaktion des Glu127 des „ERS“-Sequenzmotivs mit dem katalytisch wichtigen Magnesiumion statt. In der Elektronendichtedarstellung des

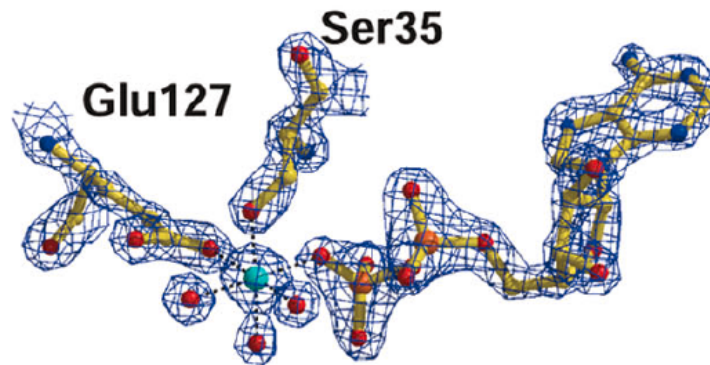


Abbildung 4.5: Elektronendichtedarstellung des gebundenen ADP-Moleküls mit dem oktaedrisch koordinierten Magnesiumion (in Cyan) (Sabini et al., 2003).

gebundenen Substrats (siehe Abb. 4.5) können die Interaktionen zwischen dem Glu127 des „ERS“-Sequenzmotivs und dem Magnesiumion sowie der Hydroxylgruppe des Ser35 im „P-Loop“ und dem Sauerstoff der β -Phosphorylgruppe des ADP sehr gut gesehen werden. Drei Wassermoleküle vervollständigen in dieser Darstellung die oktaedrische Koordination des Magnesiumions.

Das Arg128 des „ERS“-Sequenzmotivs übernimmt eine wichtige Ankerfunktion in der Substratbindungstasche durch drei Interaktionen (siehe Abb. 4.7 auf Seite 59). Die erste NH_2 -Gruppe des Arginins interagiert mit der 5'-Hydroxylgruppe des Desoxycytidins (Abstand 2,9 Å) und dem Glu53 (Abstand 3,0 Å), die zweite NH_2 -Gruppe des Arginins interagiert mit dem Gly28 (2,8 Å). Modelliert man in der Struktur an Stelle des ADP ein ATP, so kann man sehen, daß das γ -Phosphat des ATPs mit hoher Wahrscheinlichkeit die Position des Wassermoleküls einnehmen würde.

In diesem Fall würden das Arg128, die Aminosäuren Gly28 und Lys34 im „P-Loop“, und die 5'-Hydroxylgruppe des Desoxycytidins direkt mit dem γ -Phosphat interagieren. Diese Interaktionen würden das γ -Phosphat des ATPs in die katalytisch wichtige Nähe zu der nucleophilen 5'-Hydroxylgruppe des Desoxycytidins bringen (geschätzter Abstand 3,6 Å).

Das dritte Motiv ist die „Lid“-Region, die die Aminosäuren 188-195 (188-RIYLRGRN-195) umfaßt und drei unter den Nucleosid-Kinasen konservierte Arginin-Reste enthält. In Abb. 4.6 auf der nächsten Seite sind die Interaktionen der drei „Lid“-Arginine mit dem

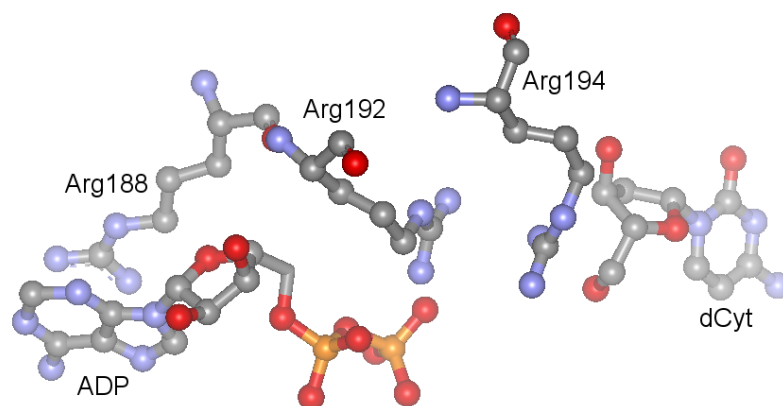


Abbildung 4.6: Ausschnitt aus der menschlichen dCK-Struktur mit gebundenem ADP und dCyt (PDB-Code 1P60). Gezeigt sind das Substrat dCyt und die Interaktionen der drei „Lid“-Arginine (Arg188, Arg192, Arg194) mit ADP.

Phosphatdonor dargestellt. Die flexible „Lid“-Region kann sich, wie eine Art Deckel, der Bindungstasche des Enzyms nähern (siehe Abb. 4.4 auf Seite 56) und essentielle Aminosäuren für die Bindung des Phosphatdonors und für die Katalysereaktion zur Verfügung stellen. Mit Hilfe von π -Interaktionen bildet das Arg188 eine Kontaktfläche zur Interaktion mit dem Adeninring des ADP. Das zweite Arginin Arg192 interagiert mit den α - und β -Phosphorylgruppen des ADP (siehe Abb. 4.6). Das Arg194 ist in der Struktur $5,5 \text{ \AA}$ von dem β -Phosphat des ADP entfernt. Extrapoliert man ein weiteres Schließen der „Lid“-Region in Gegenwart eines γ -Phosphates, würde das Arg194 mit der transferierten Phosphorylgruppe interagieren und so eine wichtige Aminosäure für die Stabilisierung des Übergangszustandes bilden.

4.1.4 Substratspezifität

Desoxyribonucleosid-Kinasen zeichnen sich generell durch die Fähigkeit aus, verschiedene Substrate zu phosphorylieren, die sich in der Base stark unterscheiden können. Eine Ausnahme bildet diesbezüglich die menschliche Thymidin-Kinase (TK1), die spezifisch nur Thymidin phosphoryliert.

Die Fähigkeit der menschlichen dCK, verschiedene Substrate trotz gegensätzlicher Eigenschaften der Wasserstoffbrückenbindungen zu verwerten, wird dem Enzym durch ein konserviertes Glutamin (Gln97) verliehen. Da die Glutamin-Seitenkette sowohl einen Wasserstoffbrückendonator als auch -akzeptor besitzt (die NH_2 - und die Carbonylgrup-

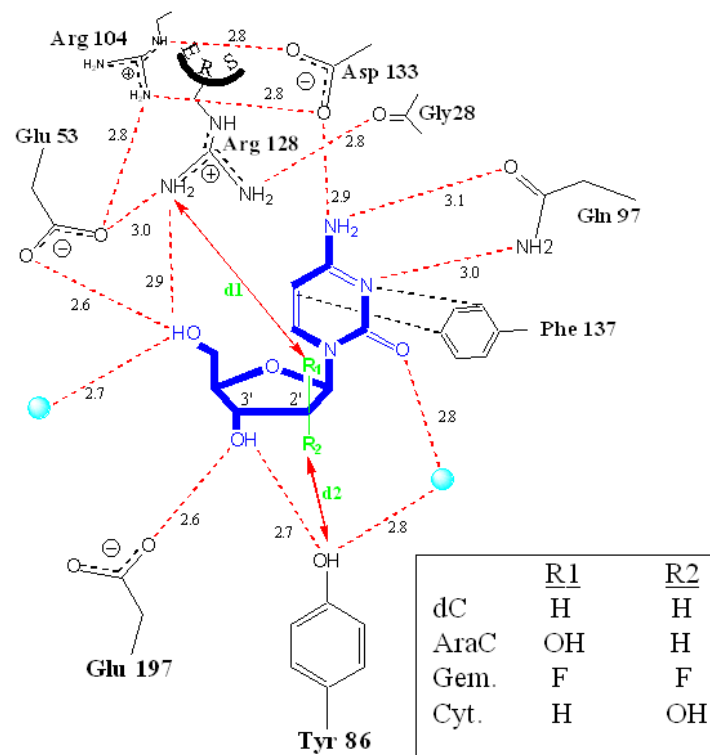


Abbildung 4.7: Zusammenfassende schematische Darstellung der Interaktionen zwischen gebundenem Nucleosid und dem Enzym. Die Interaktionen d1 und d2 finden nur mit den Nucleosidanaloga AraC und Gemcitabin statt. Alle Abstände sind in Å (Sabini et al., 2003).

pe), ergibt sich hierdurch eine Flexibilität, die durch Rotation und Neuausrichtung der Seitenkette zur Bindung verschiedener Basen benutzt werden kann.

In der Kristallstruktur mit dem Nucleosid Desoxycytidin kann man sehen, daß die Seitenkette des Gln97 über die Amidgruppe als Wasserstoffbrückendonator für das N3-Atom des Cytosins, und über die Carbonylgruppe als Wasserstoffbrückenakzeptor für die Aminogruppe des Cytosins fungiert (siehe Abb. 4.7). Zusätzlich interagiert die Aminogruppe des Cytosins mit der Seitenkette des Asp133. Die Diskriminierung der dCK gegenüber den Substraten Thymidin und Desoxyuridin wird durch das Asp133 erreicht. Diese Aminosäure ist nicht in der Lage, die gewünschten Wasserstoffbrücken-Interaktionen für die Basen Thymin und Uracil zur Verfügung zu stellen. Zusätzlich führt eine sterische Behinderung zwischen dem Arg104 und der Methyl-Seitengruppe des Thymins zum Ausschluß der Bindung von Thymidin.

Weitere Interaktionen zwischen der Cytosin-Base und der dCK sind eine hydrophobe Interaktion des Phe137 und eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Wassermolekül, das eine Brücke bildet zwischen der Base und dem Tyr86 (siehe Abb. 4.7). Die Inter-

aktion mit Tyr86 beeinflusst außerdem die Unterscheidung zwischen Desoxyribose- und Ribonucleotiden.

Eine gemeinsame Fähigkeit innerhalb der Gruppe der Nucleosid-Kinasen ist die Stabilisierung der 3'-Hydroxylgruppe des Zuckers durch ein konserviertes Tyr/Glu-Paar (dCK: Tyr86-Glu197; dGK: Tyr101-Glu211; dNK: Tyr70-Glu172). Durch die große Nähe der Tyrosin-Hydroxylgruppe zu der 2'-Zuckerposition kommt es zu einer Bevorzugung von Desoxyribonucleotiden gegenüber Ribonucleotiden. Ein Austausch der Protonen an der 2'-Zuckerposition mit Fluoratomen in dem Nucleosidanalogen Gemcitabin (dFdC) bringt eines dieser Fluoratome auf eine Entfernung, sodaß es mit der Tyrosin-Hydroxylgruppe interagieren kann. Ein Austausch der Protonen mit etwas größeren Substituenten würde zu einer sterischen Abstoßung führen, wie man deutlich an dem höheren K_M -Wert von Cytidin im Vergleich zu Desoxycytidin sehen kann (siehe Tab. 4.1 auf Seite 52).

4.2 Die Rolle der „Insert“-Region in der menschlichen dCK

Die dCK besitzt ein 15 Aminosäuren langes „Insert“ (Ser63-Asn77), das weder in der menschlichen Thymidin-Kinase 2 (TK2) noch in der *Dm*-dNK vorhanden ist (siehe Sequenzvergleich Abb. 4.9 auf Seite 62 und Abb. 1.1 auf Seite 4). Ein ähnliches „Insert“ gibt es in der menschlichen Desoxyguanosin-Kinase (dGK), das dort allerdings nur 12 Aminosäuren lang ist. Wie in der Kristallstruktur der dCK zu sehen ist (siehe Abb. 4.8 auf der nächsten Seite), bildet dieses „Insert“ einen flexiblen „Loop“, dessen Funktion unbekannt ist.

4.2.1 Deletionen der „Insert“-Region

Mit dem Ziel, die Funktion dieser „Insert“-Region und deren Einfluß auf die Enzymaktivität näher zu charakterisieren, wurden Deletionen dieser Region erstellt. Für die Planung der Deletionen wurden dazu die Ergebnisse der Kristallstruktur und ein Sequenzvergleich der menschlichen Nucleosid-Kinasen dCK, dGK, TK2 und der *Dm*-dNK verwendet (siehe Abb. 1.1 auf Seite 4).

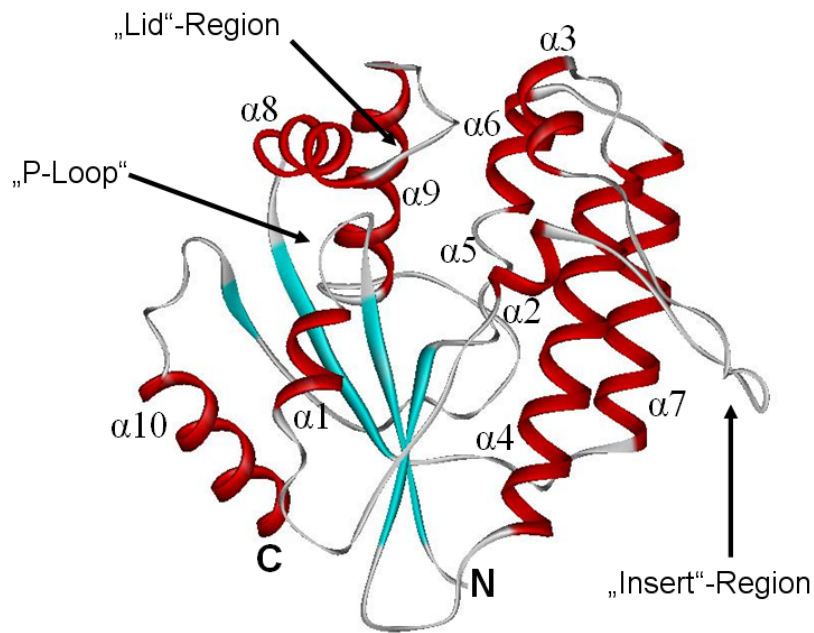


Abbildung 4.8: Monomer der menschlichen dCK. Hervorgehoben sind der „P-Loop“, die „Lid“- und „Insert“-Region.

In Abb. 4.9 ist die „Insert“-Region der dCK im Vergleich zu den Regionen der drei anderen Nucleosid-Kinasen zu sehen. Sie befindet sich zwischen den Helices $\alpha 2$ und $\alpha 3$ und wird begrenzt durch zwei konservierte Asparagine. In dem Sequenzvergleich in Abb. 4.9 auf der nächsten Seite sind die drei erstellten dCK-Varianten dCK $\Delta 1-3$ dargestellt.

Als erste Mutante wurde die dCK $\Delta 1$ erstellt. Bei diesem Konstrukt wurde die „Insert“-Region um 15 Aminosäuren gekürzt und auf die Länge gebracht, die dem „Insert“ der menschlichen TK2 und der *Dm*-dNK entspricht. In der dCK $\Delta 2$ -Mutante wurden vier weitere Aminosäuren aus der „Insert“-Region deletiert, sodaß nur noch ein konserviertes Asparagin übrig bleibt. In der dritten Mutante dCK $\Delta 3$ wurde die komplette „Insert“-Region deletiert. Die Deletionen wurden mit Hilfe der PCR-Fusionsmethode hergestellt. Zur Erläuterung siehe Kap. 3.1.12 auf Seite 31 und Abb. 3.1 auf Seite 32.

4.2.2 Veränderung der Substratspezifität

Die unterschiedlich langen Deletionen der „Insert“-Region des menschlichen dCK zeigen verschiedene Auswirkungen auf die gesamte Enzymaktivität. Alle Messungen wurden unter den gleichen Bedingungen wie bei dem Wildtyp-Enzym durchgeführt (siehe

	48	„Insert“-Region			87	
hdCK	WEVVPEPVAR	WC	NVQSTQDE	FEELTMSQKN	GG	NVLQMMYE
hdGK	WHVATEPVAT	WQ	NIQAAG..	.KQKACTAQS	LG	NLLDMMYR
hTK2	VEVLTEPVSK	WR	NVRGH...	NPLGLMYH
dNK	ICLLTEPVEK	WR	NVN	GV	NLLELMYK
dCKΔ1	WEVVPEPVAR	WC	NVQST...	NVLQMMYE
dCKΔ2	WEVVPEPVAR	WC	NVLQMMYE
dCKΔ3	WEVVPEPVAR	WC	VLQMMYE

Abbildung 4.9: Sequenzvergleich der „Insert“-Region der menschlichen Nucleosid-Kinasen dCK, dGK, TK2 und der *Dm*-dNK sowie der dCK Deletionsmutanten.

Kap. 4.1.1 auf Seite 52). In dem Konstrukt dCKΔ3 wurde die gesamte „Insert“-Region deletiert und dies führt dazu, daß das Enzym keine Aktivität mehr zeigt. Die Deletion ist somit zu groß und führt zu einem inaktiven Protein. Die beiden anderen Deletionen sind weiterhin aktive Proteine, sie zeigen jedoch insgesamt eine niedrigere Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Enzym. Das Konstrukt dCKΔ1 zeigt eine verringerte Aktivität bei den Substraten dCyt, dGuo und AraC. Auffallend ist ein stark erhöhter K_M -Wert für Desoxycytidin, er ist 60fach höher als bei dem Wildtyp-Enzym. Für das Substrat Desoxyguanosin ist der K_M -Wert nur 2fach und für AraC nur 3fach gestiegen. Die Verkürzung der „Insert“-Region im Konstrukt dCKΔ1 auf die Länge, die man in der menschlichen TK2 und in der *Dm*-dNK findet, führt in diesem Fall zu einem Enzym, das eine stark verringerte Effizienz für das Pyrimidin-Substrat Desoxycytidin hat. Auch für das Purin-Substrat Desoxyguanosin und für das Nucleosidanalogen AraC sinkt die Effizienz. Die kinetischen Daten der Deletionskonstrukte im Vergleich zum Wildtyp-Enzym sind in Tabelle 4.4 zu sehen.

Die Deletionsmutante dCKΔ2 zeigt im Vergleich zur dCKΔ1 ein anderes Ergebnis. Die um fünf Aminosäuren kürzere „Insert“-Region der dCKΔ2 führt zu einer fast unveränderten Effizienz des Enzyms für das natürliche Substrat Desoxycytidin. Das Substrat Desoxyguanosin wird dagegen nicht mehr von dieser Variante umgesetzt. Die Effizienz für die Phosphorylierung des Nucleosidanalogs AraC ist stark gesunken. Das heißt, die Substratspezifität der Desoxycytidin-Kinase, die sowohl Pyrimidin- als auch Purin-Substrate phosphorylieren kann, wurde bei der dCKΔ2-Variante zu den Pyrimidin-Substraten verschoben.

Enzym	Substrat	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
dCK wt	dCyt	6	0,025	$4,2 \times 10^3$
	dGuo	117	0,326	$2,8 \times 10^3$
	AraC	8	0,229	$28,6 \times 10^3$
dCK Δ 1	dCyt	394	0,065	$0,2 \times 10^3$
	dGuo	241	0,172	$0,7 \times 10^3$
	AraC	24	0,037	$1,5 \times 10^3$
dCK Δ 2	dCyt	12	0,049	$4,1 \times 10^3$
	dGuo	-	-	-
	AraC	221	0,077	$0,3 \times 10^3$

Tabelle 4.4: Vergleich der kinetischen Daten der Deletionskonstrukte dCK Δ 1 und dCK Δ 2 mit dem Wildtyp-Enzym. Die dCK Δ 3-Variante war inaktiv.

4.2.3 Kristallstruktur der Deletionsmutante dCK Δ 1

In der Regel wird davon ausgegangen, daß ATP der häufigste Phosphatdonor für Kinasereaktionen in menschlichen Zellen ist. Für die menschliche dCK wurde jedoch gezeigt, daß sie auch in der Lage ist, andere NTPs als Phosphatdonor zu benutzen (White und Capizzi, 1991). Messungen der NTP-Konzentrationen in Zellen zeigen, daß das Verhältnis von ATP zu UTP einen Wert von 2:1 erreichen kann (Shewach et al., 1992) und UTP in ausreichenden Konzentrationen vorhanden ist, um als alternativer Phosphatdonor zur Verfügung zu stehen. Insbesondere in Tumorzellen sind die Konzentrationen der NTPs erhöht und es kommt zu Verschiebungen der NTP-Verhältnisse (Traut, 1994).

Daher wurde versucht, Komplexe der dCK auch in Anwesenheit des alternativen Phosphatdonors UTP, in Form des Produkts UDP, zu erhalten. Durch die Charakterisierung der Fähigkeit der dCK, andere Phosphatdonoren zu benutzen, ergibt sich die Möglichkeit, diese Nutzung zu optimieren oder die Präferenz für einen Phosphatdonor zu verändern. Dies könnte sich in zukünftigen proteintherapeutischen Anwendungen als nützlich erweisen, da eine Anpassung an die z. B. in Krebszellen vorhandenen NTP-Verhältnisse möglich wäre. Im Falle der Wildtyp-dCK gelang es allerdings nicht, Komplexe mit UDP zu erhalten. Bei der Wildtyp-dCK konnten nur Komplexe von ADP in Kombination

mit einem der drei Phosphatakzeptoren (dCyt, AraC und Gemcitabin) erhalten werden (siehe Kap. 4.1.3 auf Seite 55).

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Arnon Lavie wurden Kristallisationsexperimente mit der dCK Δ 1-Mutante (siehe Kap. 4.2.1 auf Seite 60) unternommen. Mit dieser Mutante gelang es, Kristalle in Komplex sowohl mit ADP als auch mit UDP zu züchten. Zwei Kristallstrukturen mit einer Auflösung von bis zu 3.0 Å konnten gelöst werden, ein Komplex mit UDP und dCyt und ein Komplex mit dCyt allein. In Abb. 4.10 auf der nächsten Seite ist die Quartärstruktur der dCK Δ 1-Mutante in Komplex mit dCyt und UDP und mit dCyt alleine zu sehen.

Die Gesamtstruktur der dCK Δ 1-Mutante ist weitgehend identisch zu der Struktur der Wildtyp-dCK. Die Phosphate des UDP und ADP nehmen nahezu identische Positionen ein und auch die Uracil- und Adenin-Base zeigen eine ähnliche Position und Ausrichtung.

Einen funktionell wichtigen Unterschied zwischen der ADP- oder UDP-gebundenen Struktur bildet der flexible „Loop“ (240-EDFKDKYESLV-250) zwischen der α 10-Helix und dem β 5-Faltblatt (siehe Abb. 4.10). Dieser „Loop“ ist signifikant zwischen der ADP- und UDP-gebundenen Form verschoben. Die Flexibilität dieses „Loops“, der die Base des Phosphatdonors bindet, scheint sehr wichtig zu sein. Vergleicht man die Struktur mit gebundenem UDP und dCyt mit der Struktur mit dCyt alleine, so sieht man, daß der „Loop“ in der Struktur mit freier Phosphatdonor-Bindungsstelle keine feste Konformation einnimmt, sondern ungeordnet ist (siehe Abb. 4.10). Dies zeigt, daß erst nach Bindung eines Liganden diese Region eine für den Phosphatdonor spezifische Konformation einnimmt.

Vergleicht man die Bindung von ADP und UDP, so kann man mehrere Unterschiede erkennen. Die ADP-Erkennung erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Rückgrat des Enzyms. Im Gegensatz dazu sind für die Bindung des UDP die Seitenketten der Aminosäuren Asp241 und Phe242 entscheidend, da die Uracil-Base mit beiden Seitenketten dieser Aminosäuren interagiert. Dieses Asp/Phe-Paar ist innerhalb der dCKs und dGKs von Mensch, Maus und Ratte konserviert.

In der *Dm*-dNK ist dieses Paar konservativ durch ein Glu/Tyr-Paar ersetzt. In der Form mit gebundenem ADP ist die Phenylgruppe des Phe242 relativ im Vergleich zu der

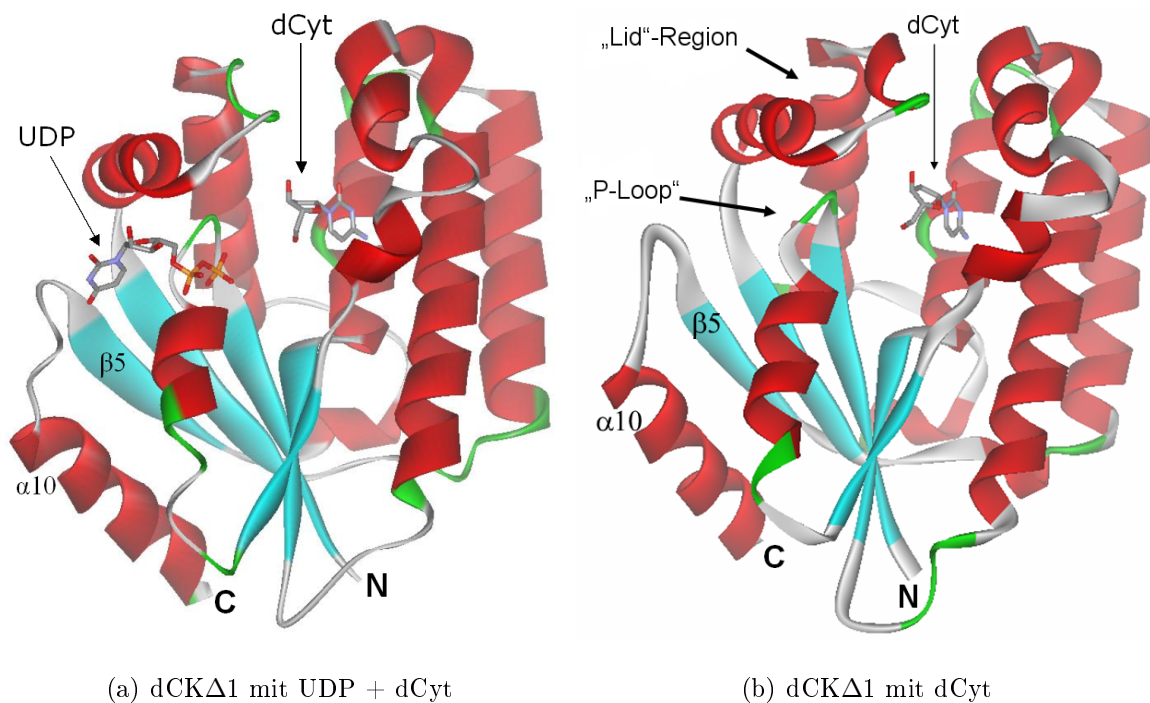


Abbildung 4.10: Tertiärstruktur der Deletionsmutante dCKΔ1 mit gebundenen (a) dCyt und UDP und (b) dCyt allein.

Form mit gebundenem UDP von der Base weggedreht. Durch die größere Adenin-Base kommt es auch zu einer Verschiebung des „Loops“ nach außen. Durch diese Flexibilität des „Loops“ ist die dCK in der Lage, sowohl ATP als auch UTP als Phosphatdonor zu binden.

Vergleichend wurden die Aktivitäten der Wildtyp-dCK und der dCKΔ1-Mutante mit ATP und UTP als Phosphatdonor gemessen. Die Ergebnisse sind in der Tab. 4.5 auf der nächsten Seite zusammengefaßt. Die Werte geben dabei den prozentualen V_{max} -Wert unter Verwendung von UTP als Phosphatdonor im Vergleich zu den Werten mit ATP an. Die Messungen zeigen, daß UTP von der Wildtyp-dCK und der dCKΔ1-Mutante gleichermaßen als Phosphatdonor angenommen wird. Durch die Verwendung von UTP kommt es allgemein zu einer Verringerung der Phosphorylierungsaktivität.

Die V_{max} -Werte für die getesteten Substrate dCyt, dGuo und dAde sinken dabei unterschiedlich stark. Am geringsten ist die Veränderung bei dem Pyrimidin-Substrat dCyt. Hier liegt der V_{max} -Wert bei Verwendung von UTP für das Wildtyp-Enzym bei 72 %. Im Vergleich dazu sinkt der V_{max} -Wert für die Purin-Substrate dGuo und dAde relativ stark auf 13 % bzw. 14 %.

Bei der dCK Δ 1-Mutante fällt die Verringerung der V_{max} -Werte im Vergleich zum Wildtyp-Enzym geringer aus. Für dCyt sinkt der V_{max} -Wert bei Verwendung von UTP nur auf 93 % und für dGuo und dAde auf 31 % bzw. 33 %. Aber auch hier sieht man, daß die Purin-Substrate stärker von der Verringerung betroffen sind.

Insgesamt scheint die dCK Δ 1-Mutante besser in der Lage zu sein, UTP als Phosphatdonor zu benutzen, da sich die V_{max} -Werte nur im geringeren Maße im Vergleich zum Wildtyp verändern.

Enzym	Substrat	% Aktivität mit UTP
dCK wt	dCyt	72
	dGuo	13
	dAde	14
dCK Δ 1	dCyt	93
	dGuo	31
	dAde	33

Tabelle 4.5: Vergleich der Aktivitäten der Wildtyp-dCK und der dCK Δ 1 unter Verwendung von UTP als Phosphatdonor. Gezeigt ist der V_{max} -Wert in Prozent im Vergleich zur Aktivität mit ATP als Phosphatdonor.

4.3 Mutationen zur Verbesserung der Kinaseaktivität

4.3.1 Die universelle Desoxyribonucleosid-Kinase dNK von *Drosophila melanogaster*

In der Familie der Desoxyribonucleosid-Kinasen nimmt die *Drosophila melanogaster* dNK (*Dm*-dNK, EC 2.7.1.145) eine Sonderstellung ein. Sie war zum Zeitpunkt der Entdeckung die einzig bekannte Multisubstrat-Nucleosid-Kinase, die alle vier natürlichen Desoxyribonucleoside phosphorylieren kann (Munch-Petersen et al., 1998). Man findet bei den Nucleosid-Kinasen von Säugetieren auch multifunktionale Nucleosid-Kinasen, jedoch zeigen diese nur Aktivitäten für zwei oder maximal drei der vier Desoxyribonucleoside.

Die Thymidin-Kinase 2 (TK2) ist z. B. auch eine Desoxycytidin-Kinase (Munch-Petersen et al., 1991) und die menschliche dCK kann auch Desoxyadenosin und Desoxyguanosin phosphorylieren, allerdings mit geringerer Effizienz (siehe Tab. 4.1 auf Seite 52). Die *Dm*-dNK übernimmt somit die Aufgabe des ersten Phosphorylierungsschrittes für alle Desoxyribonucleoside im „Salvage“-Syntheseweg, für den bei den Säugetierzellen vier verschiedene Desoxyribonucleosid-Kinasen zur Verfügung stehen (dCK, TK1, dGK und TK2).

Inzwischen sind weitere Beispiele von Multisubstrat-Kinasen bei dem Seidenspinner (*Bombyx mori*) und bei Mosquitos (*Anopheles gambiae*) gefunden worden (Knecht et al., 2002a, 2003). Dies läßt die Vermutung zu, daß Insekten in der Regel nur eine Desoxyribonucleosid-Kinase besitzen. Ein weiteres Merkmal, das die *Dm*-dNK von den in dieser Arbeit untersuchten Nucleosid-Kinasen unterscheidet, ist die stark erhöhte Kinaseaktivität. Im Vergleich zu den Enzymen von Säugetieren hat *Dm*-dNK eine vom Substrat abhängige 10-100fache höhere Umsatzrate k_{cat} und ist damit die schnellste derzeit bekannte Desoxyribonucleosid-Kinase (Munch-Petersen et al., 1998).

Ein direkter Vergleich der dCyt-Phosphorylierung von *Dm*-dNK und menschlicher dCK zeigt eine über 1500fach höhere Effizienz für das *Drosophila*-Enzym (Knecht et al., 2002b). Auf der Ebene der Monophosphat-Kinasen hat *D. melanogaster* wieder eine normale Ausstattung im Vergleich zu Säugetierzellen, man findet Adenylat-, Guanylat-

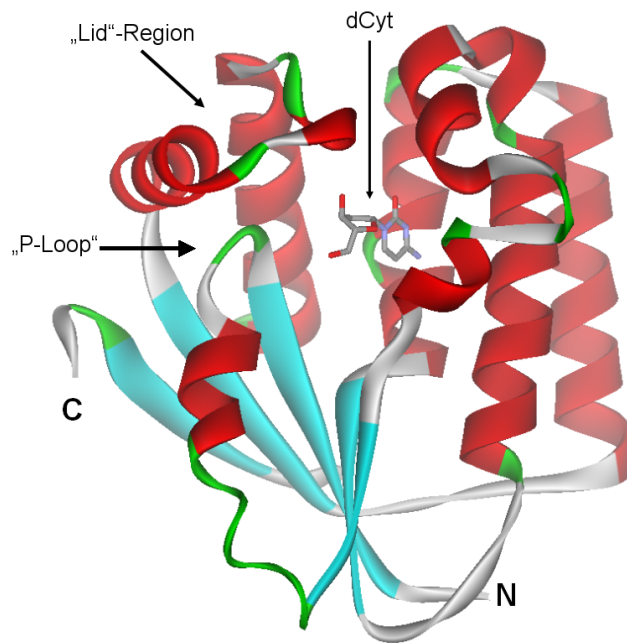


Abbildung 4.11: Tertiärstruktur der *Drosophila melanogaster* dNK mit gebundenem dCyt (PDB-Code 1J90). Hervorgehoben sind die „Lid“-Region und der „P-Loop“.

und Thymidylat-Kinasen. Trotz dieser herausragenden Eigenschaften zeigt die *Dm*-dNK eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu den Säugetier-Desoxyribonucleosid-Kinasen. Die *Dm*-dNK hat eine ähnliche Länge wie die menschlichen dNKs und besitzt auf Ebene der Aminosäuren eine Sequenzidentität von 38 % zu der menschlichen TK2 und 28 % zu der menschlichen dCK und dGK (siehe Sequenzvergleich Abb. 4.12 auf der nächsten Seite). Die räumliche Struktur der *Dm*-dNK wurde bereits im Jahr 2001 zusammen mit der Struktur für die menschliche dGK gelöst (Johansson et al., 2001) und steht somit zu Vergleichen mit der dCK-Struktur zur Verfügung (siehe Abb. 4.11).

4.3.2 Die Dreifachmutante der menschlichen dCK

Auf Basis der Vergleiche der 3D-Strukturen von *Dm*-dNK und menschlicher dCK ist es möglich, wichtige Aminosäuren zu identifizieren, die zum einen bestimmend für die Substratspezifität sind und zum anderen die katalytische Effizienz beeinflussen. Besonders interessant ist die Frage, wie die außerordentlich hohe Aktivität des *Drosophila*-Enzyms zustande kommt und warum im Vergleich dazu die Desoxyribonucleosid-Kinasen von Säugetieren relativ inaktiv sind. Ein Vergleich der Aminosäuren, die an der Substratbindung und Katalyse in den Bindungstaschen von *Dm*-dNK und menschlicher dCK

beteiligt sind, führte zur Identifizierung dreier wichtiger Aminosäuren: Ala100, Arg104 und Asp133 in der menschlichen dCK und entsprechend Val84, Met88 und Ala110 in der *Dm*-dNK (siehe Abb. 4.13 auf der nächsten Seite). Mit dem Ziel, die mensch-

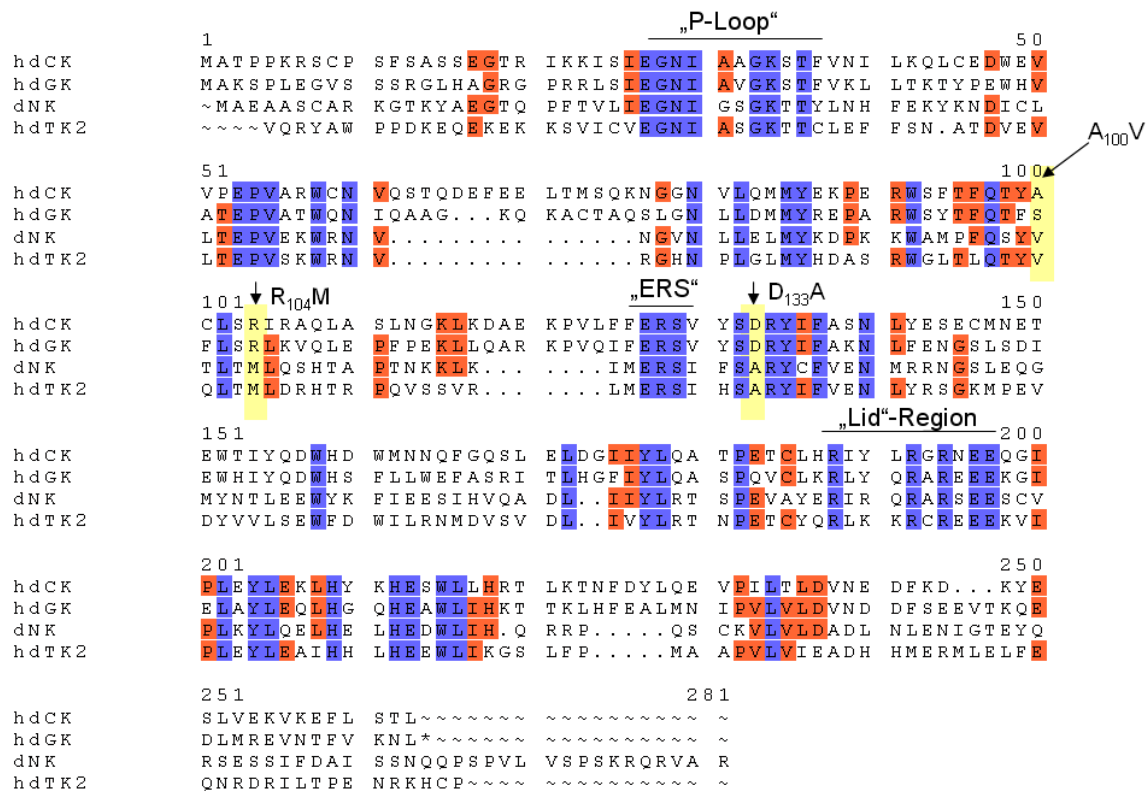


Abbildung 4.12: Sequenzvergleich der menschlichen Desoxyribonucleosid-Kinasen dCK, dGK und TK2 mit der *D. melanogaster* dNK. Blau hinterlegt sind Aminosäuren, die in allen vier, orange in drei von vier Enzymen identisch sind. Hervorgehoben in Gelb sind katalytisch kritische Aminosäuren. Zusätzlich eingezeichnet sind der „P-Loop“, das „ERS“-Sequenzmotiv und die „Lid“-Region.

liche dCK ähnlich der *Dm*-dNK aktiver zu machen, wurden die drei Aminosäuren der dCK zu den entsprechenden Aminosäuren des *Drosophila*-Enzyms mutiert. In der dCK-Struktur kann man sehen, daß das Arg104 eine von dem Substrat dCyt entfernte Konformation einnimmt, um eine andernfalls ungünstige Interaktion zwischen Arg104 und der Aminogruppe des dCyt zu minimieren (siehe Abb. 4.13 auf der nächsten Seite). Durch einen Austausch des Arginins zu einem Methionin, das man in der *Dm*-dNK findet, wird eine Erhöhung der Katalyserate erwartet. Da das Arg104 in ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen eingebunden ist (siehe Abb. 4.7 auf Seite 59) und eine Mutation zu dem ungeladenen Methionin negative Auswirkungen haben könnte, wurde

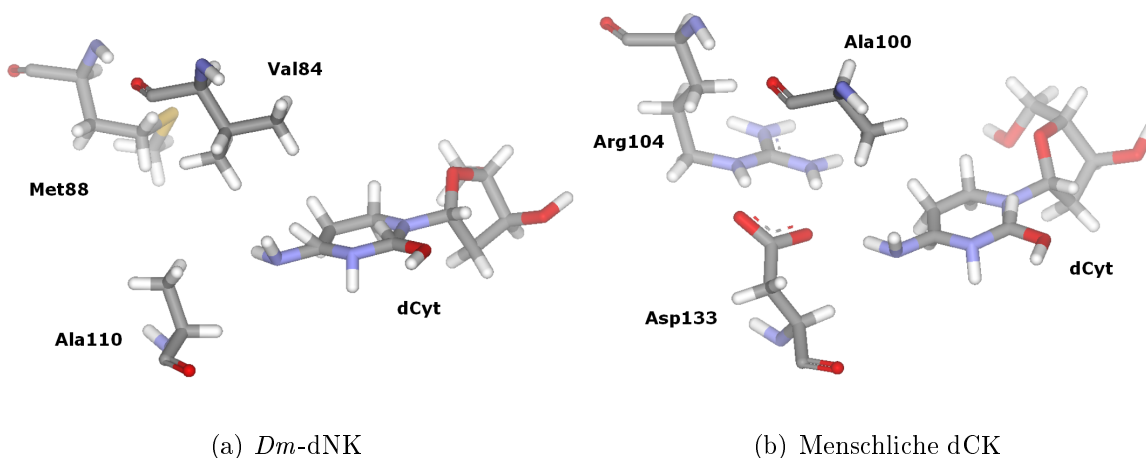


Abbildung 4.13: Vergleich der Interaktionen der drei kritischen Aminosäuren mit dem Substrat Desoxycytidin in den Bindungstaschen von (a) *D. melanogaster* dNK (PDB-Code 1J90) und (b) menschlicher dCK (PDB-Code 1P60).

zum Ausgleich das Asp133 zu einem Alanin entsprechend dem Vorbild von *D. melanogaster* mutiert. Zusätzlich wurde das Ala100 nach dem Vorbild zu einem Valin mutiert. Daraus entstand zusammenfassend die Dreifachmutante der dCK: A₁₀₀V R₁₀₄M D₁₃₃A.

Auch diese dCK-Variante wurde in einen „His-tag“-Vektor (pET14b) kloniert. Die Expression dieser dCK-Variante war durch die Mutationen nicht beeinträchtigt. Die Löslichkeit und die Ausbeute des Enzyms waren vergleichbar mit der Wildtyp-Variante. Das gereinigte Protein wurde zum Vergleich mit dem Wildtyp-Enzym kinetisch charakterisiert. Alle Messungen wurden unter den gleichen Bedingungen wie bei dem Wildtyp-Enzym durchgeführt (siehe Kap. 4.1.1 auf Seite 52). Die dCK-Dreifachmutante wurde in einer Konzentration von 0,5 μM im Enzymtest eingesetzt. In Abb. 4.14 sind die Aktivitätskurven für die Substrate 5-Aza-dCyt und dAde gezeigt. Die Ergebnisse aller Messungen für die natürlichen Substrate und Nucleosidanaloga sind in Tabelle 4.6 zusammengefasst.

Die Mutationen in der dCK-Dreifachmutante waren erfolgreich. Der außerordentlichste Wert ist die Phosphorylierung des natürlichen Substrats Desoxycytidin. Hier konnte eine über 10fache Steigerung des k_{cat} -Wertes von 0,025 auf 0,26 s^{-1} gemessen werden. Gleichzeitig ist für dieses Substrat der K_M -Wert gesunken, sodass insgesamt eine über 41fache Steigerung der Effizienz (k_{cat}/K_M) für die Phosphorylierung des Substrats Desoxycytidin erreicht werden konnte.

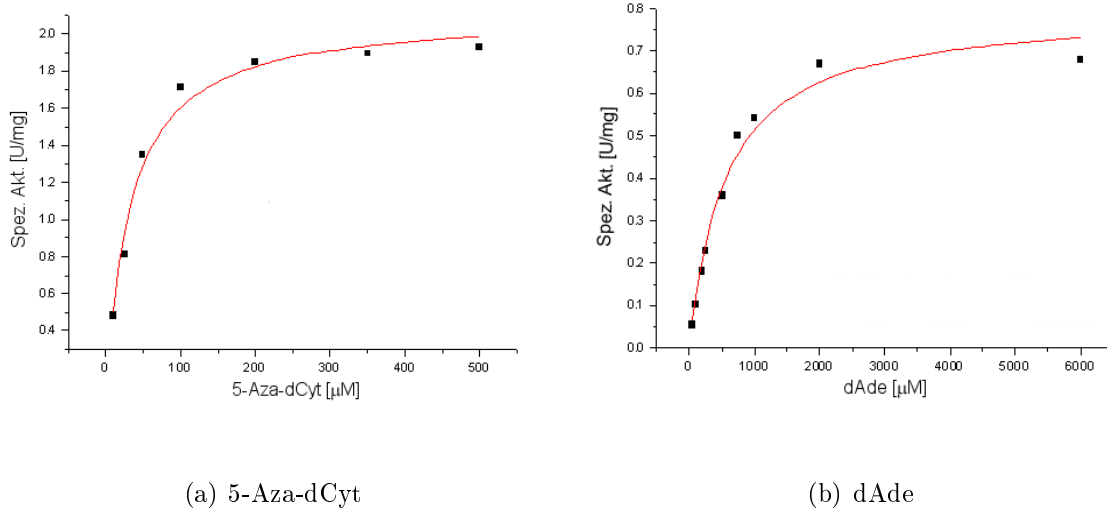


Abbildung 4.14: Aktivitätskurven der dCK-Dreifachmutante zur Bestimmung der K_M - und V_{max} -Werte mit den Substraten (a) 5-Aza-dCyt und (b) dAde.

Substrat	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	Veränderung
dCyt	1,5	0,26	$173,3 \times 10^3$	41
Thd	18	0,59	$32,8 \times 10^3$	> 1200
dAde	550	0,43	$0,8 \times 10^3$	0,3
dGuo	> 2000	< 0,05	$0,03 \times 10^3$	0,01
AraC	80	0,65	$8,1 \times 10^3$	0,3
dFdC	21	1,02	$48,6 \times 10^3$	1,6
5-Aza-dCyt	32	1,14	$35,6 \times 10^3$	1,3

Tabelle 4.6: Kinetische Parameter der dCK-Dreifachmutante. Die letzte Spalte zeigt die Veränderung der Effizienz der Mutante im Vergleich zum Wildtyp (X-fach).

Für die beiden anderen, vom Wildtyp phosphorylierten, natürlichen Substrate (dAde und dGuo) hat sich dagegen die Phosphorylierungseffizienz verringert, sie erreichen nur noch 0,5 % und 0,02 % der Effizienz der dCyt-Phosphorylierung (siehe Tab. 4.7 auf der nächsten Seite). Für das Substrat Desoxyadenosin ist die Phosphorylierungsgeschwindigkeit gesunken und gleichzeitig der K_M -Wert gestiegen, dies führt zu einer über dreifachen Verschlechterung der Effizienz. Das Substrat Desoxyguanosin, das mit ähnlicher Effizienz wie Desoxyadenosin vom Wildtyp-Enzym phosphoryliert wird, zeigt eine noch drastischere Verschlechterung. Der k_{cat} -Wert ist fast 7fach gesunken und der

K_M -Wert zeigt eine 17fache Erhöhung auf über 2 mM. So ergibt sich eine fast 100fache Verschlechterung der Phosphorylierungseffizienz für das Substrat Desoxyguanosin.

Substrat	Wildtyp-Enzym (%)	Dreifachmutante (%)	Dreifachmutante im Vergleich zu wt dCyt (%)
dCyt	100	100	4126
Thd	0,6	19	781
dAde	62	0,5	19
dGuo	67	0,02	0,7
AraC	681	5	193
dFdC	726	28	1157
5'-Aza-CdR	650	21	848

Tabelle 4.7: Vergleich der relativen Effizienzen in Prozent. Spalte eins und zwei zeigt die Effizienz der Phosphorylierung von Wildtyp-dCK und Dreifachmutante jeweils im Vergleich zur Effizienz der dCyt-Phosphorylierung des Enzyms. In Spalte drei sind die Effizienzen der Dreifachmutante im Vergleich zur dCyt-Phosphorylierung der Wildtyp-dCK zu sehen.

Überraschend dagegen ist, daß die dCK-Dreifachmutante eine neue Aktivität für Thyminid zeigt. Thyminid ist kein natürliches Substrat für das Wildtyp dCK-Enzym. Nur unter physiologisch irrelevant hohen Substratkonzentrationen im millimolaren Bereich sieht man im Enzymtest einen gewissen Substratumsatz ($K_M > 5$ mM). In der Mutante allerdings wird Thyminid zu einem sehr guten Substrat mit einer Effizienz in der Phosphorylierung, die über allen getesteten Substraten für das Wildtyp-Enzym liegt. Die Phosphorylierungsgeschwindigkeit (k_{cat}) ist fast so hoch wie für Desoxyadenosin im Wildtyp-Enzym, jedoch zeigt Thyminid einen über 17fach besseren K_M -Wert.

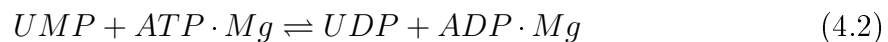
Für die Aktivität mit den Nucleosidanaloga AraC und Gemcitabin zeigen sich auch positive Veränderungen. Für beide Nucleosidanaloga konnte eine Steigerung der Phosphorylierungsgeschwindigkeit um den Faktor drei erreicht werden. Für Gemcitabin kommt es trotz des Anstiegs des K_M -Wertes zu einer höheren Effizienz im Vergleich zum Wildtyp. Bei dem Nucleosidanalogen AraC führt der gesteigerte K_M -Wert allerdings dazu, daß keine Effizienzsteigerung im Vergleich zum Wildtyp-Enzym erreicht werden kann.

Als drittes Nucleosidanalogen wurde 5-Aza-dCyt getestet, hier zeigt sich ein ähnlicher Effekt, d. h. eine Verschlechterung des K_M -Wertes, bei einer gleichzeitigen Steigerung der Phosphorylierungsrate. Die Steigerung der Phosphorylierungsrate für 5-Aza-dCyt ist mit dem Faktor vierzehn allerdings sehr hoch, sodaß hier eine höhere Effizienzsteigerung im Vergleich zu dem Substrat Gemcitabin erreicht wurde.

Insgesamt führten die Mutationen der drei katalytischen essentiellen Aminosäuren in der dCK bei allen auf Pyrimidin basierenden Substraten zu einer Steigerung der Phosphorylierungsrate (k_{cat}). Nur für die beiden Purin-Substrate (dAde, dGuo) kam es zu einer Verringerung der Aktivität (siehe Tab. 4.6 auf Seite 71). Die Mutationen haben die dCK aktiver und spezifischer für Pyrimidin-Substrate gemacht.

4.4 Die menschliche UMP/CMP-Kinase

Die menschliche UMP/CMP-Kinase (UMPK; E.C. 2.7.4.14) phosphoryliert die physiologischen Substrate UMP, CMP und dCMP reversibel zu den Diphosphatformen nach dem folgendem Reaktionsschema in Gleichung 4.2:



In dem Nucleosidphosphat-Stoffwechsel zur Bereitstellung von Bausteinen für die DNA- und RNA-Synthese vollzieht die UMP/CMP-Kinase den zweiten, nach der Desoxycytidin-Kinase (dCK) folgenden, Phosphorylierungsschritt. Zusätzlich spielt die UMP/CMP-Kinase eine wichtige Rolle bei der Aktivierung klinisch relevanter Nucleosidanaloga, die in Chemotherapien eingesetzt werden (siehe Abb. 1.5 auf Seite 11).

Wichtige Beispiele sind die Monophosphatformen von AraC und Gemcitabin (dFdC), die bei der Behandlung von Leukämie eingesetzt werden. Der erste Schritt bei der Aktivierung dieser Nucleosidanaloga zu der pharmakologisch wirksamen Triphosphatform wird von der Desoxycytidin-Kinase katalysiert (siehe Kap. 4.1 auf Seite 51). Der zweite Phosphorylierungsschritt erfolgt von der UMP/CMP-Kinase und die dritte Phosphorylgruppe wird dann von der basenunspezifischen Nucleosiddiphosphat-Kinase (NDP-Kinase) angehängt.

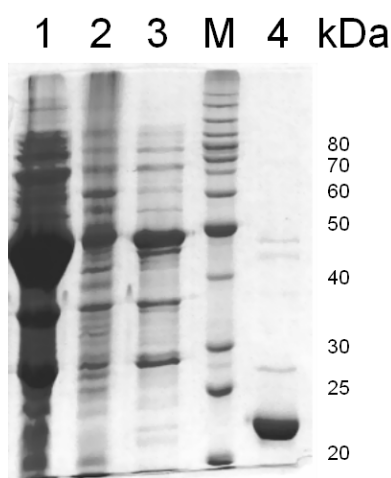


Abbildung 4.15: Aufreinigung der menschlichen UMP/CMP-Kinase als GST-Fusionsprotein nach Expression in *E. coli*. Proteinproben (jeweils 5-10 μ l) der einzelnen Reinigungsschritte wurden in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine durch Coomassie-Brilliantblau R250 angefärbt. Spur 1, Überstand des Zellysat; Spur 2, Pellet; Spur 3, Waschfraktion; Spur 4, nach Thrombinverdau aufgereinigte UMP/CMP-Kinase; M, Molekulargewichtsmarker (20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 160 kDa).

Die menschliche UMP/CMP-Kinase wurde zuerst 1977 identifiziert (Arima et al., 1977). Die erste Klonierung des Gens und eine rekombinante Produktion des Proteins erfolgte

erst 1999 (Van Rompay et al., 1999). Für diese Arbeit wurde ein 588 bp langes DNA-Fragment aus einer menschlichen cDNA-Bank (Invitrogen) isoliert. Dieses Fragment entspricht der kodierenden Region für die sogenannte kurze Form der menschlichen UMP/CMP-Kinase. Das daraus resultierende 196 Aminosäuren lange Protein wird als die physiologische Form des Enzyms in menschlichen Zellen angesehen (Liou et al., 2002).

Das DNA-Fragment wurde für die Proteinproduktion in *E. coli* in den Expressionsvektor pGEX-RB (Brundiers et al., 1999) über die Restriktionsschnittstellen *Nde*I und *Bam*HI kloniert. Zusätzlich wurde auch die längere Variante des Gens kloniert (228 Aminosäuren), die sich jedoch in Expressionsversuchen als unlöslich erwies.

Mit Hilfe dieses GST-Vektors ist es möglich, das Fusionsprotein mit N-terminaler Glutathion-S-Transferase (GST) (Smith und Johnson, 1988) zu exprimieren. Zur Überexpression wurde der Vektor in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) transformiert. Die Kulturen wurden bei 37°C angezogen, bei einer $OD_{600} \sim 0,7$ mit 0,1 mM IPTG induziert und nach 14 Std. bei 22°C geerntet. Die Produktion der Proteine wurde auf einem SDS-PAGE-Gel überprüft. Die GST-Fusionsproteine wurden anschließend affinitätschromatographisch mit Hilfe einer Glutathion-Sepharose-Säule aufgereinigt (siehe Kap. 3.2.3 auf Seite 35). Nach Elution des Fusionsproteins mit 10 mM Glutathion wurde der Glutathion-S-Transferase-Anteil des Fusionsproteins anschließend mit Thrombin abgeschnitten. Nach dem Thrombin-Schnitt und der Dialyse wurde das Glutathion-S-Transferase-Protein durch erneutes Laden auf der Glutathion-Sepharose-Säule entfernt (siehe Abb. 4.15 auf der vorherigen Seite).

4.4.1 Enzymatische Aktivitäten

Die Michaelis-Menten-Parameter der aufgereinigten UMP/CMP-Kinase wurden mit Hilfe des spektrophotometrischen Tests bestimmt (siehe Kap. 3.7.1 auf Seite 43). Die UMP/CMP-Kinase wurde in einer Konzentration von 0,2 μ M im Enzymtest eingesetzt. Durch die Messung der Reaktionsgeschwindigkeit bei konstanter Konzentration von Phosphatdonor (2 mM ATP) und Titration des zweiten Substrats (0,05 - 5 mM) wurden die K_M - und k_{cat} -Werte bestimmt. In Abb. 4.16 sind die Aktivitätskurven für die Substrate dCMP und AraCMP dargestellt. Die Ergebnisse aller Messungen sind in Tab. 4.8 auf der nächsten Seite zusammengefaßt.

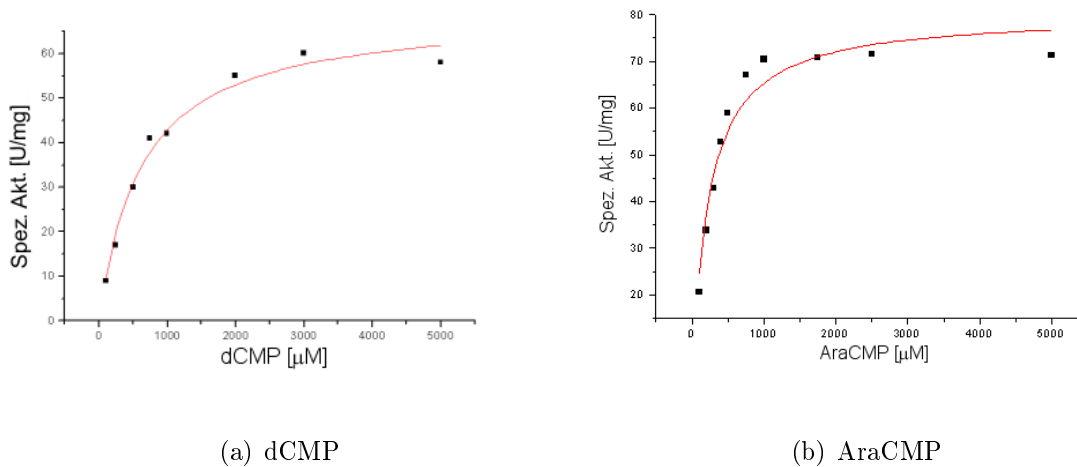


Abbildung 4.16: Aktivitätskurven der menschlichen UMP/CMP-Kinase zur Bestimmung der K_M - und V_{max} -Werte mit den Substraten (a) dCMP und (b) AraCMP.

Substrat	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
UMP	168	65,6	$390,5 \times 10^3$
CMP	128	45,8	$357,8 \times 10^3$
dCMP	623	52,1	$83,6 \times 10^3$
AraCMP	227	60,1	$264,8 \times 10^3$

Tabelle 4.8: Kinetische Parameter der menschlichen UMP/CMP-Kinase mit den Substraten UMP, CMP, dCMP und AraCMP.

Im Vergleich zur menschlichen dCK sieht man, daß die menschliche UMP/CMP-Kinase eine deutlich höhere Enzymaktivität hat. So ist der k_{cat} -Wert bis zu 2500fach höher als bei der dCK. Im Gegensatz dazu sind die K_M -Werte insbesondere für das Substrat dCMP deutlich schlechter. Für das Substrat CMP liegt der K_M -Wert im Vergleich zum K_M -Wert für dCyt bei der dCK über 20fach höher. Trotz des hohen K_M -Wertes ist die Effizienz der CMP-Phosphorylierung des Enzyms (k_{cat}/K_M) fast 90fach höher im Vergleich zur dCyt-Phosphorylierung der dCK. Das beste Substrat für dieses Enzym ist UMP, gefolgt von CMP. Im Vergleich dazu ist dCMP ein schlechtes Substrat und das Enzym zeigt eine sehr niedrige Phosphorylierungseffizienz für dCMP. Dies zeigt die Präferenz des Enzyms für Ribonucleotide (siehe Kap. 4.4.3 auf Seite 85).

Das Nucleosidanalogue AraCMP ist im Vergleich dazu ein gutes Substrat mit Umsatzraten, die nur geringfügig unter denen von UMP liegen. Die Phosphorylierungseffizienz für AraCMP ist dabei um den Faktor 3 größer als für dCMP.

Zusätzlich wurde bei der menschlichen UMP/CMP-Kinase ein Bissubstratanalogue getestet (siehe Kap. 3.7.2 auf Seite 49). Das Bissubstratanalogue P^1 -(5'-Adenosyl)- P^5 -(5'-Uridyl)pentaphosphat (UP_5A) war ein starker Inhibitor. Bei diesem Inhibitor sind die beiden Nucleoside Adenin und Uridin über fünf Phosphorylgruppen verknüpft. Entscheidend für die Simulierung des Übergangszustandes, der eigentlich von vier statt fünf Phosphaten gebildet wird, ist der Abstand zwischen den Nucleosiden. Die UP_5A -Inhibierungskonstante K_i lag bei konstanter ATP-Konzentration von 2 mM in dem Bereich von 1-5 nM. Dieser Wert liegt in dem Bereich, der für die UMP/CMP-Kinase von *D. discoideum* berichtet wurde (Wiesmuller et al., 1995).

4.4.2 Die offene Konformation

Die menschliche UMP/CMP-Kinase gehört zu der Familie der Nucleosidmonophosphat-Kinasen, zu der auch die Adenylat-, Guanylat- und Thymidylat-Kinase zählen (siehe Kap. 1.2.2 auf Seite 6). Bis zu dieser Arbeit beschränkten sich die strukturellen Informationen für dieses wichtige Enzym auf die Uridylat-Kinase von *Saccharomyces cerevisiae* (Muller-Dieckmann und Schulz, 1994) und die UMP/CMP-Kinase von *Dictyostelium discoideum* (Scheffzek et al., 1996). Im Vergleich zur menschlichen UMP/CMP-Kinase besitzen die Enzyme von *S. cerevisiae* und *D. discoideum* nur eine 50 %ige und 52 %ige Sequenzidentität (siehe Sequenzvergleich Abb. 4.17 auf der nächsten Seite). In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Arnon Lavie von der University of Illinois in Chicago wurde deswegen versucht, die Struktur der menschlichen UMP/CMP-Kinase zu erhalten.

Dario Segura-Pena gelang es, ausgehend von dem in dieser Arbeit konstruierten Klon der menschlichen UMP/CMP-Kinase und den hier etablierten Aufreinigungsmethoden, Kristalle zu züchten, und die Kristallstruktur zu lösen. Interessanterweise gelang es, Kristalle ohne die Anwesenheit von Substrat zu züchten. Alle bisher bekannten Strukturen von UMP/CMP-Kinase von *S. cerevisiae* und *D. discoideum* enthalten Substrate oder

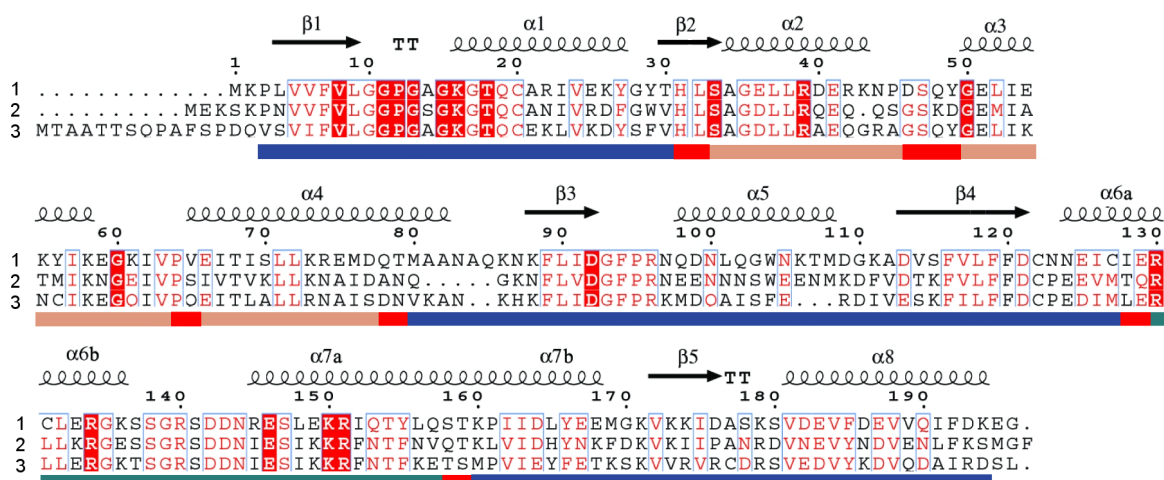


Abbildung 4.17: Sequenzvergleich der menschlichen UMP/CMP-Kinasen (1) mit der UMP/CMP-Kinase von *D. discoideum* (2) und der Uridylat-Kinase von *S. cerevisiae* (3) (Swiss-Prot: P30085, P20425, P15700). Die Sekundärstrukturelemente über dem Sequenzvergleich beziehen sich auf die menschliche UMP/CMP-Kinase. Die Farben der Balken entsprechen den Farben, die in der Strukturdarstellung der menschlichen UMP/CMP-Kinase verwendet wurden (siehe Abb. 4.18).

Inhibitoren, die an der Donor- oder Akzeptorstelle des Enzyms gebunden sind (Scheffzek et al., 1996; Muller-Dieckmann und Schulz, 1994, 1995; Schlichting und Reinstein, 1997). Durch die große Flexibilität der Enzyme war es bisher schwierig, Kristallstrukturen der Nucleosidmonophosphat-Kinasen in der Abwesenheit von Liganden zu erhalten. Die Liganden dienen in der Regel dazu, die Konformation der Enzyme zu stabilisieren, die ein Wachstum der Enzymkristalle ermöglicht.

Die menschliche UMP/CMP-Kinase ist ein globuläres Protein und besteht aus 196 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 22,2 kDa. Das Protein zeigt eine für die Familie der Monophosphat-Kinasen typische α/β -Faltung (Schulz et al., 1990), die von einem Kern aus β -Faltblättern, umgeben von α -Helices, gebildet wird (siehe Abb. 4.18 auf der nächsten Seite). Frühere strukturelle Studien an Enzymen dieser Klasse zeigten, daß es im Rahmen der Substratbindung an dem Enzym zu großen konformationellen Veränderungen und Bewegungen kommt (Vonnrhein et al., 1995). Diese konformationellen Bewegungen des Enzyms beziehen sich dabei auf die NMP-Bindungs- und die „Lid“-Region.

Das Substrat-freie Enzym besitzt eine offenere Form, wobei die „Lid“-Region, die typischerweise wichtige katalytische Reste enthält, die größte Entfernung zur NMP-

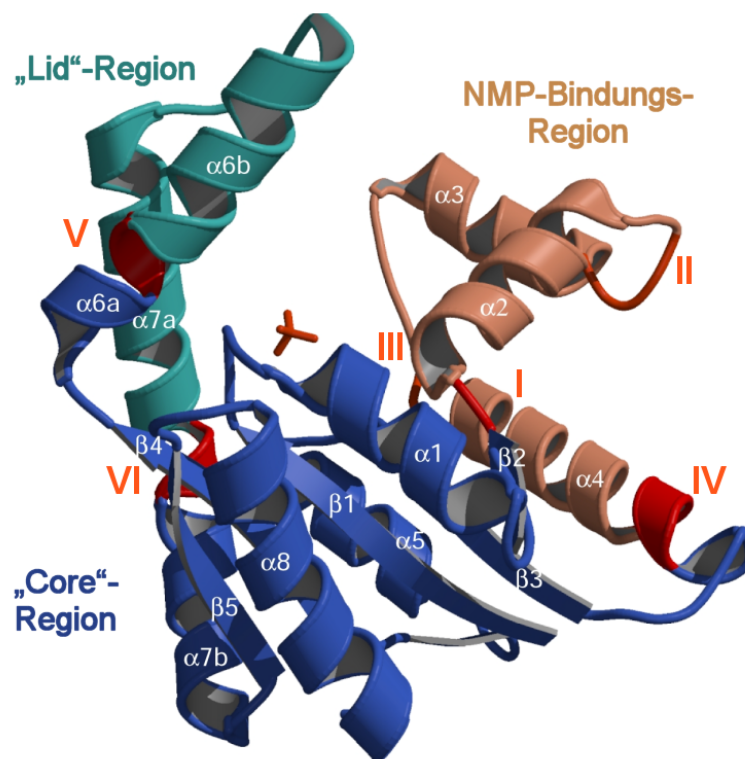


Abbildung 4.18: Tertiärstruktur der menschlichen UMP/CMP-Kinase in der offenen Konformation. Farblich hervorgehoben sind die „Core“- , „Lid“- und NMP-Bindungs-Region, zusätzlich sind die Gelenke I–VI eingezeichnet (PDB-Code 1TEV).

Bindungs-Region zeigt. Nach Bindung eines Substratmoleküls geht das Enzym in einen Zwischenzustand über, den man als teilweise geschlossenen Status bezeichnen kann. Nur bei Anwesenheit beider für die katalytische Reaktion wichtigen Substrate geht das Enzym in den geschlossenen Zustand über, bei dem die „Lid“-Region mit dem Substrat an der Phosphoryldonor-Bindungsstelle interagiert.

Die Kristallstruktur der menschlichen UMP/CMP-Kinase gibt die offene Konformation des Enzyms wieder. Ein Vergleich der menschlichen Struktur mit der geschlossenen Struktur des homologen Enzyms von *D. discoideum* zeigt die erheblichen konformationellen Änderungen des Enzyms, die nach Substratbindung eintreten (siehe Abb. 4.19 auf Seite 81).

Analog zu den anderen NMP-Kinasen kann man die Struktur der menschlichen UMP/CMP-Kinase nach funktionellen und strukturellen Überlegungen in drei Regionen einteilen: die „Core“-Region, die NMP-Bindungs-Region und die „Lid“-Region (siehe Abb. 4.18). Die „Core“-Region bildet den starren Teil des Protein-Moleküls und ist

aus fünf parallelen β -Faltblättern ($\beta 1$ – $\beta 5$) und den Helices $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\alpha 6a$, $\alpha 7b$ und $\alpha 8$ aufgebaut. Das „P-Loop“-Motiv (Verbindung $\beta 1$ und $\alpha 1$), das für die Bindung der Phosphorylgruppen des Phosphatdonors verantwortlich ist, wurde auch der „Core“-Region zugewiesen. In der hier gezeigten Apo-Form der menschlichen UMP/CMP-Kinase kann man ein Sulfat-Molekül sehen, das in der Nähe des „P-Loops“ gebunden ist. Diese Position des Sulfat-Moleküls entspricht der Stelle des β -Phosphates von ATP.

Dieser hochkonservierte „P-Loop“ vollzieht eine leichte konformationelle Änderung nach Substratbindung (eine maximale Bewegung von $\sim 1,9$ Å an der Position des C_{α} -Atoms des Gly11). Diese konformationelle Veränderung des „P-Loops“, als Antwort auf die Art von gebundenem Nucleotid, zeigt sich auch bei der Thymidylat-Kinase (Ostermann et al., 2000, 2003). Die Flexibilität des „P-Loops“ scheint ein wichtiger Bestandteil der Familie der Nucleosidmonophosphat-Kinasen zu sein.

Die NMP-Bindungs-Domäne ist Teil des Moleküls, das die Nucleosidmonophosphate (CMP oder UMP) bindet, und besteht aus drei Helices $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 4$, die mit zwei kurzen „Loops“ miteinander verbunden sind.

In früheren Überlegungen zur NMP-Bindungs-Region, die nur auf Basis der geschlossenen Konformation des Enzyms getroffen wurde, wurde Helix $\alpha 4$ nicht zur NMP-Bindungs-Region hinzugezählt. Vergleicht man die neu erhaltene offene Struktur des Enzyms mit der geschlossenen Form, kommt man zu der Überlegung, daß die Helix $\alpha 4$ mit zur NMP-Bindungs-Region gezählt werden sollte, da sie sich in koordinierter Weise mit Helix $\alpha 2$ bewegt.

Die „Lid“-Region setzt sich aus Helix $\alpha 6b$ und $\alpha 7a$ zusammen, die über einen „Loop“ miteinander verbunden sind. Die Definition der „Lid“-Region umfaßt auch die beiden Helices $\alpha 6b$ und $\alpha 7a$, da beide Helices ihre Konformation bei der Substratbindung ändern. Ein ähnliches Verhalten ist bei der Guanylat-Kinase von Maus zu beobachten (Sekulic et al., 2002).

Strukturelle Untersuchungen verschiedener NMP-Kinasen, darunter auch die UMP/CMP-Kinase, haben gezeigt, daß die „Lid“-Region sich nach Bindung des Substrats schließt (Schlichting und Reinstein, 1997). Durch das Schließen der „Lid“-Region werden einige katalytisch wichtige Aminosäuren in große Nähe zu den Phosphorylgruppen der beiden Substrate gebracht.

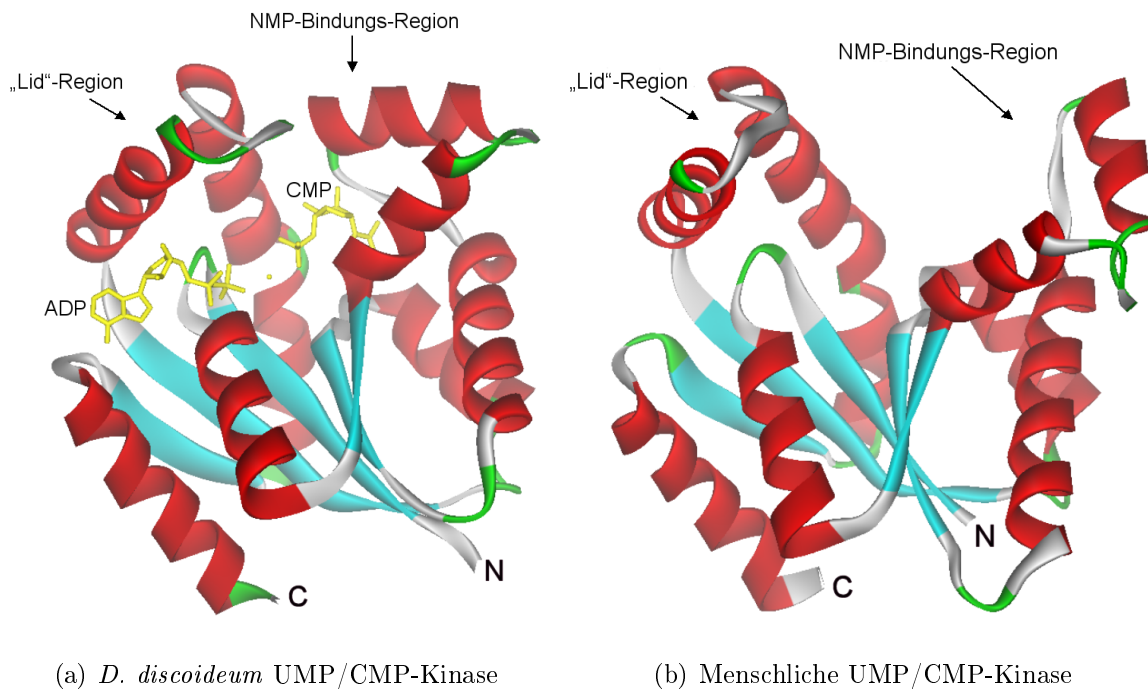


Abbildung 4.19: Vergleich der offenen und geschlossenen Form der UMP/CMP-Kinase. (a) *Dictyostelium discoideum* UMP/CMP-Kinase (PDB-Code 2UKD) in Komplex mit CMP und ADP (in gelb), (b) offene Form der menschlichen UMP/CMP-Kinase (PDB-Code 1TEV).

Um die konformationellen Veränderungen, die durch die Substratbindung an der UMP/CMP-Kinase entstehen, zu identifizieren und zu untersuchen, wurde ein Vergleich der geschlossenen und der offenen Form der UMP/CMP-Kinase angestellt. Dazu dienten die Struktur der offenen Form der menschlichen UMP/CMP-Kinase ohne gebundenes Substrat und die Struktur der geschlossenen Form der *D. discoideum* UMP/CMP-Kinase in Komplex mit ADP, Aluminiumfluorid und CMP (siehe Abb. 4.19) (Schlichting und Reinstein, 1997).

Um die entscheidenden Bewegungen, die das Enzym von der offenen zu der geschlossenen Konformation vollzieht, näher zu charakterisieren, wurde von Dario Segura-Pena ein „Fitting“-Algorithmus verwendet. Die Methode dieses „Fitting“-Algorithmus wurde bereits früher von Gerstein und Chothia veröffentlicht (Gerstein und Chothia, 1991; Lesk und Chothia, 1984).

Die konformationellen Veränderungen des Enzyms, die durch Bindung des Substrats eintreten, werden offensichtlich, wenn man die Struktur der offenen und geschlossenen Form vergleicht (siehe Abb. 4.19 und 4.21 auf Seite 84). Wenn man die beiden Strukturen überlagert, sieht man, daß die größten Abweichungen in der NMP-Bindungs-Region

und in der „Lid“-Region zu finden sind. Die „Core“-Region bleibt weitgehend unverändert. Diese großen Unterschiede zwischen den beiden Formen in der „Lid“- und NMP-Bindungs-Region zeigen, daß das Proteinmolekül flexible Regionen hat.

In der Abwesenheit von Substrat ist das Enzym in der offenen Form, die sich durch einen großen Abstand zwischen „Lid“-Region und NMP-Bindungs-Region auszeichnet. Nach der Substratbindung nimmt das Enzym eine kompaktere Konformation ein, die die „Lid“- und NMP-Bindungs-Region in große Nähe bringt (siehe Abb. 4.19 auf der vorherigen Seite).

Dieses ist gut zu sehen am Beispiel des C_{α} -Atoms von Gly60, das in der Helix $\alpha 3$ der NMP-Bindungs-Region lokalisiert ist, sowie am Arg151, das in der Helix 7a der „Lid“-Region lokalisiert ist (siehe auch Sequenzvergleich Abb. 4.17 auf Seite 78). Zwischen diesen beiden Atomen verkürzt sich der Abstand von 21 Å in der offenen Form zu 4,5 Å in der geschlossenen Form. Vergleicht man die Positionen der C_{α} -Atome zwischen den beiden Konformationen, so kann man die Aminosäuren identifizieren, die sich in Relation zu der statischen „Core“-Region bewegen (siehe Abb. 4.20 auf der nächsten Seite). Die größten Bewegungen sind in der NMP-Bindungs-Region zu finden, mit einer maximalen Verschiebung von ~ 18 Å für das C_{α} -Atom des Glu59. Die „Lid“-Region vollzieht auch eine signifikante Bewegung zwischen der offenen und geschlossenen Konformation. Hier ist die größte Verschiebung von ~ 10 Å bei dem C_{α} -Atom des Arg140 zu finden (siehe Abb. 4.23 auf Seite 87). Die Aminosäure Arg140 ist eines der „Lid“-Arginine, das in der geschlossenen Form an der Katalysereaktion teilnimmt, indem es direkt mit der transferierten Phosphorylgruppe des ATPs interagiert (Schlichting und Reinstein, 1997).

Die Bewegung der „Lid“- und NMP-Bindungs-Region, von der offenen zu der geschlossenen Konformation, erfüllt die Kriterien eines „Induced Fit“-Mechanismus (Koshland, 1994), bei dem die katalytischen Aminosäuren erst nach der Substratbindung eine katalytisch aktive Konformation einnehmen.

Die drei α -Helices, die die NMP-Bindungs-Region bilden ($\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 4$), können nicht als einzelne starre Einheit betrachtet werden, da Helix $\alpha 3$ relativ zu Helix $\alpha 2$ und $\alpha 4$ rotiert. Das Schließen der NMP-Bindungs-Region setzt sich daher aus einer Bewegung über vier verschiedene sogenannte Gelenke zusammen, die als Gelenk I, II, III und

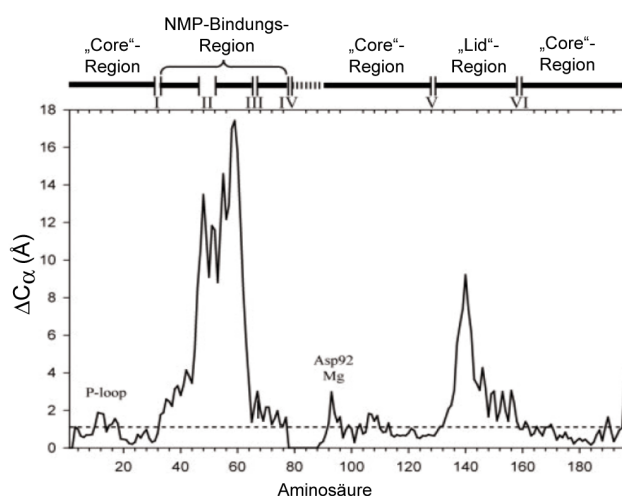


Abbildung 4.20: C_{α} - C_{α} Abstands-Plot. In diesem Plot ist die Entfernung zwischen den C_{α} -Atomen in der offenen und geschlossenen Form als Funktion der Aminosäure gezeigt. Die verschiedenen Regionen des Enzyms und die Positionen der Gelenke sind über dem Plot eingezeichnet (Segura-Pena et al., 2004).

IV bezeichnet werden (siehe Abb. 4.18 und Abb. 4.20). Die komplexe Bewegung über vier verschiedene Gelenke kann in zwei Teilschritte zerlegt werden. Zum einen bei den Gelenken I und IV, die die NMP-Bindungs-Region mit der „Core“-Region verbinden und auf die ganze Domäne wirken, und zum zweiten bei den Gelenken II und III, die Helix $\alpha 3$ bewegen. Die Zuordnung der Gelenke ist in Tab. 4.9 zu sehen.

Region	Strukturelement	Gelenk	Grad der Rotation
NMP	Helix $\alpha 2$	I	11,5°
	Helix $\alpha 3$	II und III	57,0°
	Helix $\alpha 4$	IV	10,9°
„Lid“	Helix $\alpha 6b$	V	18,0°
	Helix $\alpha 7a$	VI	18,0°

Tabelle 4.9: Zuordnung der Gelenke in der menschlichen UMP/CMP-Kinase.

Das Gelenk I besteht aus den Aminosäuren Leu32 und Ser33 und ist im $\beta 2$ -Faltblatt an der Grenze zwischen der „Core“- und NMP-Bindungs-Region lokalisiert. Die Bewegung des Gelenkes I bewirkt eine Rotation um 11,5° in Helix $\alpha 2$ hin zur geschlossenen Form. Die Analyse des Gelenkes IV ist erschwert, da die menschliche UMP/CMP-Kinase ein fünf Aminosäuren langes „Insert“ nach Helix $\alpha 4$ im Vergleich zum *D. discoideum*-Enzym besitzt. Dadurch ist es nicht möglich, die Aminosäuren, die das Gelenk IV bilden, präzise zu identifizieren.

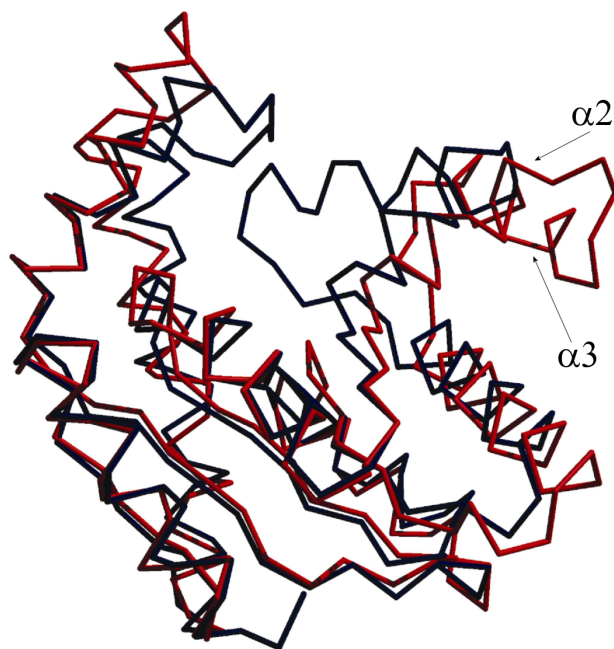


Abbildung 4.21: Konformationelle Änderungen in der UMP/CMP-Kinase. Direkte Überlagerung der offenen Form (in rot) der menschlichen UMP/CMP-Kinase mit der geschlossenen Form von *D. discoideum* (in schwarz).

Die Bewegung von Gelenk IV führt zu einer Rotation um die Helix α_4 von $10,9^\circ$. Einen ähnlichen Wert findet man bei der Rotation um die Helix α_2 von Gelenk I. Dadurch ist davon auszugehen, daß die Helix α_2 und α_4 eine koordinierte gemeinsame Bewegung vollziehen. Betrachtet man beim Schließen der NMP-Bindungs-Region nur die Auswirkungen der Gelenke I und IV, so kann man einen hypothetischen Übergangszustand modellieren, der zwischen der geschlossenen und der offenen Form liegt. Bei diesem Zwischenschritt auf dem Weg zur geschlossenen Form kommt es zu einer Rotation der Helices α_2 und α_4 von $11,4^\circ$ (siehe Abb. 4.21). Die Gelenke II und III sind interne Gelenke der NMP-Bindungs-Region. Sie führen, ausgehend von dem modellierten Übergangszustand, zu einer drastischen konformationellen Änderung der Position von Helix α_3 bei dem Schließvorgang.

Der Schließvorgang der NMP-Bindungs-Region kann zusammenfassend in zwei Bewegungsschritte zerlegt werden. Die erste Bewegung ist an den Gelenken I und IV lokalisiert, die Helix α_2 und α_4 als eine Einheit bewegen. Die zweite Bewegung findet an den Gelenken II und III statt, die auf die Helix α_3 wirken. Diese Bewegung führt zu einer großen Rotation der Helix α_3 von $\sim 57^\circ$. Wenn alle vier Gelenke in die Betrachtung mit einbezogen werden, kommt es bei der Helix α_3 insgesamt zu einer Rotation von 68° . Die zwei Teilbewegungen wirken also additiv und in dieselbe Richtung (11° von den Gelenken I und IV und 57° von den Gelenken II und III).

Die „Lid“-Region der meisten NMP-Kinasen, mit Ausnahme der Thymidylat-Kinase von Säugetieren (Lavie et al., 1997), enthält mehrere katalytisch essentielle Arginine. Nur im Zustand mit gebundenem Substrat können diese Arginine eine Konformation annehmen, die es ihnen erlaubt, direkt mit den Phosphaten von ATP zu interagieren. Die „Lid“-Region der menschlichen UMP/CMP-Kinase setzt sich zusammen aus der Helix $\alpha 6b$, einem „Loop“ und Helix $\alpha 7a$ (siehe Abb. 4.18 auf Seite 79). Zwei Gelenke bestimmen hier die Bewegung der „Lid“-Region. Das erste Gelenk liegt zwischen der „Core“-Region und Helix $\alpha 6b$ und wird von den Aminosäuren Ile128 und Glu129 gebildet. Das zweite Gelenk trennt die Helix $\alpha 7a$ von der „Core“-Region und wird von den Aminosäuren Ser158 und Thr159 gebildet. Die zwei Helices bewegen sich weitgehend als ein Körper mit einer Gesamtrotation von 18° zwischen dem geschlossenen und dem offenen Zustand. Der „Loop“ zwischen Helix $\alpha 7a$ und $\alpha 6b$ zeigt während der Bewegung interne konformationelle Veränderungen, die aber aufgrund der schlechten Elektronendichte in der Kristallstruktur in diesem Bereich nicht näher aufgelöst werden konnten.

4.4.3 Substratspezifität

Dario Segura-Pena gelang es nicht, Kristalle der menschlichen UMP/CMP-Kinase mit gebundenem Substrat (CMP oder UMP) oder Bisubstratinhibitor (UP_5A) zu züchten. Dies war unerwartet, da die Dissoziationskonstante für Bindung von UP_5A bei der menschlichen UMP/CMP-Kinase im nanomolaren Bereich liegt. Gründe für das Scheitern der Ligandenbindung sind in den Kristallisationsbedingungen zu suchen. Kristallwachstum der menschlichen UMP/CMP-Kinase war nur bei niedrigem pH ($\sim 4,6$) zu finden. Bei diesem niedrigen pH ist die Bindung von Substraten und Inhibitor geschwächt. Vergleicht man damit die Bedingungen, die zur Kristallisation der *Dictyostelium discoideum* UMP/CMP-Kinase verwendet wurden, so ist zu erkennen, daß dort der Komplex mit dem Inhibitor UP_5A bei einem pH von 8,8 gezüchtet wurde (Scheffzek et al., 1996). Bei einem vergleichbaren pH konnten allerdings keine Kristalle der menschlichen UMP/CMP-Kinase erhalten werden.

Aus diesem Grund wurde die Struktur der UMP/CMP-Kinase von *D. discoideum* verwendet, um die geschlossene Form des menschlichen Enzyms mit gebundenem Substrat (CMP und AMP) zu modellieren (siehe Abb. 4.22 auf Seite 86 und Abb. 4.23

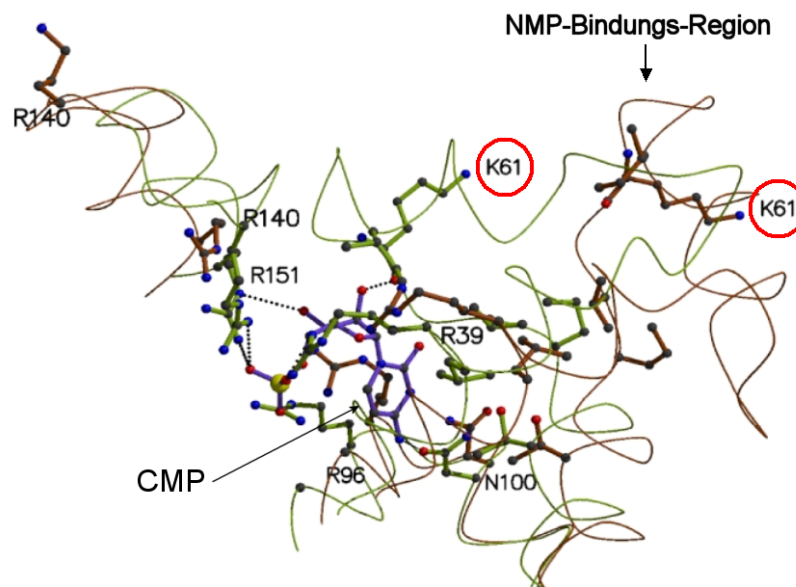


Abbildung 4.22: Überlagerung der offenen Form der menschlichen UMP/CMP-Kinase (braun) mit dem Modell der geschlossenen Konformation (grün). Der Ausschnitt zeigt die Bewegung der NMP-Bindungs-Region. Nur in der geschlossenen Form ist die Bindungstasche vollständig. Hervorzuheben ist die Interaktion zwischen der CMP-Ribose und der Carbonylgruppe der Hauptkette des Lys61 (rot umkreist) in der geschlossenen Form (Segura-Pena et al., 2004).

auf Seite 87). Das Ziel war es, mit Hilfe dieses Modells, die Substratspezifität der menschlichen UMP/CMP-Kinase besser zu verstehen (Liou et al., 2002; Pasti et al., 2003). Eine Analyse des Modells zeigt eine direkte Interaktion zwischen dem Enzym und der 2'-Hydroxylgruppe des Nucleosidmonophosphates (2,8 Å Abstand zwischen dem 2'-Hydroxyl des Ribonucleotids und dem Carbonylsauerstoff des Lys61) (siehe Abb. 4.22). Diese Interaktion erklärt die starke Präferenz des Enzyms von Ribonucleotiden gegenüber 2'-Desoxyribonucleotiden. Diese Präferenz spiegelt sich auch in dem 4-5fach höheren K_M -Wert des Substrats dCMP gegenüber CMP und UMP wider (siehe Tab. 4.8 auf Seite 76). Darüber hinaus wird auch der im Vergleich zu CMP höhere K_M -Wert des Nucleosidanalogons AraC erklärbar. Mit Hilfe dieses Modells kann man voraussagen, daß die 2'-Ara-Hydroxylgruppe des AraC keine Interaktion mit dem Lys61 aufbauen kann. Die 2'-Hydroxylgruppe des AraC kann in zwei verschiedenen Konformationen modelliert werden, entweder in der C2'-endo-Konformation, wie das an die UMP/CMP-Kinase gebundene CMP in der *D. discoideum*-Struktur (Schlichting und Reinstein, 1997), oder in der C2'-exo-Konformation, wie man es in der menschlichen dCK -Struktur findet (Sabini et al., 2003). In beiden Fällen ergibt sich ein großer

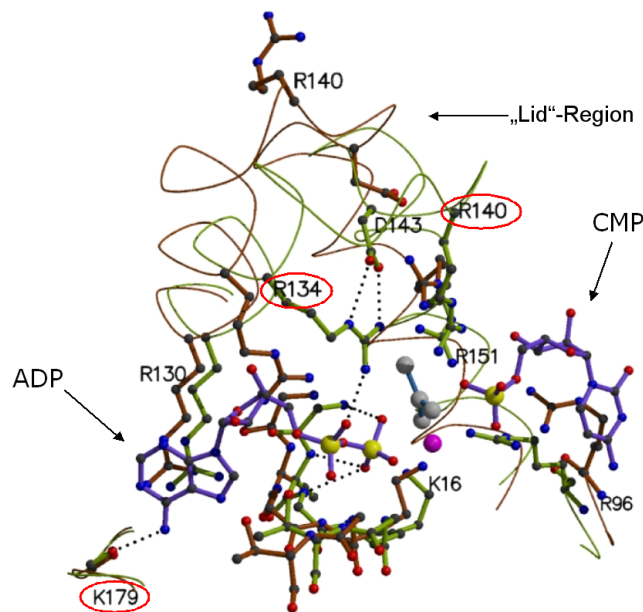


Abbildung 4.23: Überlagerung der offenen Form der menschlichen UMP/CMP-Kinase (braun) mit dem Modell der geschlossenen Konformation (grün). Der Ausschnitt zeigt die Bewegung der „Lid“-Region mit gebundenem ADP, CMP und dem AlF_3 , wie man es in der Struktur der UMP/CMP-Kinase von *D. discoideum* sieht (PDB-Code 3UKD). Nur in der Konformation, die bei der Anwesenheit beider Nucleotide vorliegt, können die „Lid“-Arginine 134 und 140 mit dem Substrat interagieren. Das Arg140 kann in der geschlossenen Form mit dem AlF_3 interagieren, das hier dem γ -Phosphat des ATPs entspricht (Segura-Pena et al., 2004).

Abstand von 4,5 und 5,5 Å zwischen der 2'-Hydroxylgruppe des AraC und der Carbonylgruppe des Lys61.

Enzymmessungen mit GTP als Phosphatdonor zeigen einen um den Faktor 14 schlechteren k_{cat} -Wert für die UMP-Phosphorylierung. Betrachtet man die Phosphoryldonor-Bindungsstelle in dem Modell der geschlossenen Form der menschlichen UMP/CMP-Kinase (siehe Abb. 4.23), so wird die Präferenz des Enzyms für ATP deutlich. In dem Modell kann man einen Abstand von 2,9 Å zwischen dem Carbonylsauerstoff des Lys179 und der Aminogruppe an der 6'-Position der Adenin-Base beobachten (siehe Abb. 4.23). Ein GTP wäre aufgrund der Carbonylgruppe an der 6'-Position ein schlechteres Substrat, wie die Enzymmessungen bestätigt haben.

4.5 Die menschlichen Cytidin-Desaminasen

In menschlichen Zellen gibt es zwei Cytidin-spezifische Desaminasen, die Cytidin- und die Desoxycytidylat-Desaminase (CDA und dCMP-DA). Diese Enzyme katalysieren die irreversible hydrolytische Desaminierung von Cytidin, Desoxycytidin und dCMP zu den entsprechenden Uridinformen (Uridin, Desoxyuridin und dUMP) (Camiener und Smith, 1965) und sind an der Aufrechterhaltung eines ausgeglichenen Pyrimidin-Pools in der Zelle beteiligt (Nygaard, 1986). Darüber hinaus sind sie in der Lage, therapeutisch wichtige Nucleosidanaloga, wie z. B. Ara-C, dFdC und 5-Aza-dCyt, zu desaminieren (Camiener, 1967; Ho, 1973; Chabot et al., 1983) (siehe auch Kap. 1.3.2 auf Seite 9). Durch diese Desaminierung tragen die Desaminasen zur Inaktivierung dieser Medikamente bei und führen zu einer Verschlechterung des Therapieerfolges in der Virus- und Krebsbehandlung. Sie sind somit die Gegenspieler der aktivierenden Nucleosid-Kinasen. Die menschliche CDA ist Teil des „Salvage“-Syntheseweges und die dCMP-DA ist ein Schlüsselenzym für die *de novo*-Synthese von TMP. Durch die Desaminierung von dCMP (Reichard, 1988) entsteht dUMP, das dann von der TMP-Synthase für die Produktion von TMP verwendet werden kann. Dadurch spielt die dCMP-DA eine wichtige Rolle, um eine ausgeglichene Menge an dCTP und TTP für die DNA-Synthese bereitzustellen.

4.5.1 Die Cytidin-Desaminase

Zur Charakterisierung der Desaminierungsaktivität in menschlichen Zellen auf Ebene der Cytidin-basierten Nucleosidanaloga wurde die menschliche Cytidin-Desaminase (CDA; EC 3.5.4.5) kloniert. Als Basis für die Klonierungen diente ein cDNA-Klon (IMAGp998D209638Q, RZPD Berlin). Das 576 bp lange DNA-Fragment wurde zur Proteinproduktion in den Expressionsvektor pET14b über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI* kloniert. Zur Überexpression wurde der Vektor in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) transformiert. Die Überexpression und Aufreinigung der CDA erfolgte wie in Kap. 3.2.2 auf Seite 33 beschrieben. Die Aktivität der CDA wurde mit Hilfe des Desaminase-Tests bestimmt (siehe Kap. 3.7.3 auf Seite 49). Dabei wurden die beiden natürlichen Substrate der CDA, dCyt und Cyt, und die Nucleosidanaloga AraC,

Gemcitabin und 5-Aza-dCyt untersucht. Das Enzym wurde in einer Konzentration von 0,12 μM eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 4.10 zusammengefasst. Die höchste Aktivität zeigt die CDA für das Substrat Cyt. Die maximalen Umsatzraten der getesteten Substrate unterscheiden sich allerdings nur maximal um den Faktor 2,4. Unter den getesteten Nucleosidanaloga ist die höchste Aktivität für Gemcitabin zu finden. Die K_M -Werte für Substrate liegen mit Ausnahme von 5-Aza-dCyt nur um den Faktor 2-3 auseinander (39-110 μM) (Vincenzetti et al., 1996; Bouffard et al., 1993). Das schlechteste Substrat ist 5-Aza-dCyt mit dem niedrigsten k_{cat} -Wert und einem hohen K_M -Wert (280 μM) (Vincenzetti et al., 1996). Insgesamt ist die CDA ein sehr aktives Enzym im Vergleich zu den Nucleosid-Kinasen. Die Umsatzraten der CDA sind für das Substrat dCyt z. B. über 1400fach höher als für die dCK. Auch für das schlechte Substrat 5-Aza-dCyt werden noch Umsatzraten erreicht, die über 200fach über denen der dCK liegen. Die menschliche CDA kann alle in dieser Arbeit untersuchten Nucleosidanaloga sehr gut desaminieren, insbesondere Gemcitabin und dFdC. Dadurch ist sie ein wichtiger Faktor, der zur Inaktivierung der Nucleosidanaloga beiträgt.

Substrat	k_{cat} (s^{-1})
dCyt	36,8
Cyt	40,8
AraC	21,3
dFdC	31,9
5-Aza-dCyt	17,0

Tabelle 4.10: Desaminierungsaktivitäten der menschlichen Cytidin-Desaminase mit den Substraten Desoxycytidin, Cytidin, AraC, dFdC (Gemcitabin) und 5-Aza-dCyt.

4.5.2 Die Desoxycytidylat-Desaminase

Um die Desaminierung auf der Ebene der Monophosphate untersuchen zu können, wurde die menschliche Desoxycytidylat-Desaminase (dCMP-DA; E.C. 3.5.4.12) in die Untersuchungen mit einbezogen. Dieses Enzym katalysiert die Desaminierung von dCMP zu dUMP und ist auch in der Lage, die Monophosphatformen einiger Nucleosidanaloga zu desaminieren. Als Basis für die Klonierung diente ein cDNA-Klon

(IMAGp998B248451Q, RZPD Berlin). Das 537 bp lange DNA-Fragment wurde in den Expressionsvektor pGEX-RB (Brundiers et al., 1999) über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI* kloniert. Die Überexpression und Aufreinigung des Proteins erfolgte wie in Kap. 3.2.3 auf Seite 35 beschrieben. Nach der Aufreinigung des GST-Fusionsproteins wurde das GST durch Thrombinverdau abgespalten. Die Aktivität des gereinigten Proteins wurde mit Hilfe des Desaminierungs-Tests bestimmt (siehe Kap. 3.7.3 auf Seite 49). Für die Messungen mit den Substraten dCMP und CMP wurde das Enzym in einer Konzentration von 0,02 μM und für das Substrat AraCMP in einer Konzentration von 0,09 μM eingesetzt.

Das Enzym zeigt eine sehr hohe Aktivität mit dem namensgebenden Substrat dCMP. Für CMP konnte bei den gemessenen Substratkonzentrationen keine Aktivität festgestellt werden. Das Nucleosidanalogen AraCMP kann von der menschlichen dCMP-DA desaminiert werden, allerdings zeigt das Enzym eine um den Faktor 23 niedrigere Umsatzrate für AraCMP (siehe Tab. 4.11).

Substrat	k_{cat} (s^{-1})
dCMP	127,1
CMP	-
Ara-CMP	5,4

Tabelle 4.11: Desaminierungsaktivitäten der menschlichen dCMP-DA mit den Substraten dCMP und Ara-CMP. Das Enzym zeigte für das Substrat CMP bei Konzentrationen bis 0,5 mM keine Aktivität.

Die Monophosphatformen von Gemcitabin und 5-Aza-Desoxycytidin standen für die Messungen nicht zur Verfügung. In der Literatur lassen sich Werte für die Desaminierung von dFdCMP (Gemcitabin-Monophosphat) durch die menschliche dCMP-DA finden. Die Umsatzraten für die dFdCMP-Desaminierung sind dabei um den Faktor 3,5 höher als für die AraCMP-Desaminierung (Liou et al., 2003).

Zur Zeit werden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Arnon Lavie Kristalle von der menschlichen dCMP-DA gezüchtet, um die 3D-Struktur des Enzyms aufzuklären. Strukturelle Informationen über das Enzym sind für zwei Ansätze wichtig. Zum einen können derzeit eingesetzte Nucleosidanaloga dahingehend verbessert

werden, daß sie stabiler gegenüber dem Abbau durch die Desaminasen sind, zum anderen lassen sich die Informationen zum Design von Inhibitoren der dCMP-DA nutzen. Durch Inhibitoren der dCMP-DA läßt sich der Abbau der aktivierten Nucleosidanaloga verhindern oder verlangsamen, sodaß eine größere Menge an aktiven Substanzen in den Zellen erreicht werden kann.

4.6 Proteintransduktion von dCK-Varianten in menschliche Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Mutante der menschlichen dCK erzeugt, die mehrere Nucleosidanaloga erheblich besser phosphorylieren kann als das Wildtyp-Enzym. Die Untersuchungen beschränkten sich, bis zu diesem Punkt, allerdings nur auf direkte Kinetik-Messungen am Enzym.

Um die Wirkung dieser Mutante in dem komplexen System der Zelle zu untersuchen, wurden Zellkulturexperimente durchgeführt. Zum einen war das Ziel, die Methode für das Einbringen der Proteine in die Zellen zu untersuchen, zum anderen sollte die Wirkung der Proteine in den Zellen analysiert werden. Insbesondere war interessant, wie die eingebrachten Proteine den AraC-Umsatz in den Zellen beeinflussen. Wie bereits in Kap. 1.4 auf Seite 11 ausgeführt, gibt es eine neuere, alternative Strategie zu gentherapeutischen Ansätzen, die sogenannte Proteintransduktion. Mit Hilfe der Proteintransduktion wurde versucht, die Proteine direkt in die Zellen einzubringen und ihre Wirkung auf die Zelle zu untersuchen.

Für den Weg des Proteins in die Zelle wurden vergleichend zwei Ansätze verwendet. Der erste Ansatz basiert auf Fusionsproteinen mit einer Proteintransduktionsdomäne (PTD), der zweite auf sogenannte Peptid-„Carrier“ (siehe Kap. 1.4.2 auf Seite 12). So war es möglich, Aussagen über die unterschiedliche Effizienz der beiden Methoden zur Proteintransduktion zu erhalten. Im Folgenden sind zum Vergleich die Aminosäuresequenzen der PTDs des ursprünglichen HIV-TAT (Aminosäure 47-57) und des PTD4 sowie des Peptid-„Carriers“ Pep-1 gezeigt:

TAT : Y G R K K R R Q R R R

PTD4 : Y A R A A A R Q A R A

Pep-1 : K E T W W E T W W T E W - S Q P - K K K R K V

Für die erste Methode wurden Fusionsproteine der menschlichen dCK konstruiert, die an ihrem N-Terminus eine PTD besitzen. Als PTD wurde eine optimierte Variante PTD4 (siehe Aminosäurevergleich) verwendet, die eine vielfach bessere Transduktionseffizienz als die ursprüngliche TAT-Variante haben soll (Ho et al., 2001).

Für die Klonierungen wurde der Vektor pGEX-RB so modifiziert, daß er die PTD4-Domäne C-terminal nach dem GST trägt. Mit Hilfe eines Thrombinverdaus wurde das Protein vom N-terminalen GST abgespalten und direkt eluiert (siehe Kap. 3.2.3 auf Seite 35).

Die zweite Methode basierte nicht auf Fusionsproteinen. Hier wurden für die Proteintransduktion sogenannte „Carrier“-Peptide, das Pep-1 (Morris et al., 2001), verwendet. Dieses im Labor von Dr. G. Divita entwickelte Pep-1-Peptid besteht aus 21 Aminosäuren und besitzt drei Domänen mit spezifischen Funktionen (siehe Kap. 1.4.2 auf Seite 12). Das Peptid ist am N-Terminus acetyliert und trägt am C-Terminus eine Cysteamidgruppe. Das verwendete Pep-1 wurde von der Arbeitsgruppe G. Divita synthetisiert. Es wird kommerziell unter dem Namen Chariot™ (Active Motif Inc., Carlsbad, CA) vertrieben.

Die Zellkulturexperimente wurden im Labor von Dr. G. Divita (Centre de Recherches de Biochimie Macromoléculaire, Montpellier) durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden menschliche Fibroblastenzellen der Zell-Linie HS-68 verwendet. Die zu testenden Proteine wurden regulär aufgereinigt (siehe Kap. 3.2 auf Seite 33) und die Proteintransduktion wurde nach Protokoll durchgeführt (siehe Kap. 3.6 auf Seite 42). Nach der Proteintransduktion wurden die Zellen für eine Std. bei 37°C inkubiert und dann mit der entsprechenden Menge des Nucleosidanalogons versetzt. Nach einem Tag wurden die Zellen mit frischem Medium und Nucleosidanalogon versorgt. Die Effekte auf das Zellwachstum wurden zwei Tage nach der Proteintransduktion beobachtet.

Für die ersten Tests wurden vergleichend zwei verschiedene Proteine mit diesem System getestet, der Wildtyp und die Dreifachmutante der menschlichen dCK. Als Nucleosidanalogon wurde für diese Tests in allen Fällen AraC verwendet. Pro Ansatz wurden drei verschiedene Kontrollen durchgeführt. Als Referenz für das Zellwachstum wurden in allen Fällen unbehandelte Zellen mit inkubiert. Die erste Kontrolle waren Zellen, die nur mit AraC versetzt wurden, um den Einfluß des Nucleosidanalogons auf die untransduzierten Zellen zu sehen.

Bei der zweiten Kontrolle wurden die Zellen mit AraC und den unmodifizierten Proteinen ohne Pep-1 behandelt. Das bedeutet, die Proteine sollten außerhalb der Zelle bleiben und es sollten z. B. negative Auswirkungen des verwendeten Puffers auf das

Zellwachstum zu sehen sein. Die letzte Kontrolle waren Zellen, die mit dem jeweiligen Pep-1/Protein-Komplex ohne Nucleosidanalogen behandelt wurden. Hier sollte sich zeigen, ob das transduzierte Protein allein ohne Nucleosidanalogen bereits einen Einfluß hat.

Um die nötige Menge an Nucleosidanalogen für ein effektives Abtöten der Zellen abschätzen zu können, wurden verschiedene AraC-Konzentrationen von 50-1000 μM getestet. Außerdem wurde die eingesetzte Proteinmenge von 10-500 nM variiert, um eine optimale Konzentration zu finden. Die ersten Ergebnisse dieser Experimente sind in der Tabelle 4.12 zusammengefaßt:

Tabelle 4.12: Proteintransduktion verschiedener dCK-Varianten in menschliche Zellen. Ein (+) kennzeichnet einen inhibierenden Einfluß auf das Zellwachstum (Abtöten der Zellen), ein (-) zeigt, daß kein Einfluß auf das Zellwachstum festgestellt werden konnte.

Protein	Methode	Nucleosidanalogen	Effekt
-	-	AraC (500 μM)	-
dCK wt (25 nM)	-	AraC (500 μM)	-
dCK wt (10 nM)	Pep-1	-	-
dCK-Dreifachmutante (25 nM)	-	AraC (500 μM)	-
dCK-Dreifachmutante (10 nM)	Pep-1	-	-
dCK wt (25 nM)	PTD4	AraC (500 μM)	+
dCK wt (10 nM)	Pep-1	AraC (500 μM)	++
dCK-Dreifachmutante (25 nM)	PTD4	AraC (500 μM)	++
dCK-Dreifachmutante (10 nM)	Pep-1	AraC (250 μM)	+++

Die Kontrollen zeigten, daß bei den eingesetzten Konzentrationen von Protein und Nucleosidanalogen kein negativer Einfluß auf das Zellwachstum beobachtet werden konnte. Somit konnte ausgeschlossen werden, daß die transduzierten Proteine alleine die Zellen töten.

Ein Vergleich der Ergebnisse der beiden Transduktionsmethoden zeigt, daß die Pep-1-Methode scheinbar eine höhere Transduktionseffizienz besitzt. Bereits bei geringerer Proteinkonzentration (10 nM) konnte mit der Pep-1-Methode ein Effekt beobachtet

werden. Um einen Effekt bei der Transduktion mit der PTD4-Domäne zu sehen, mußten mindestens 25 nM Protein eingesetzt werden.

Der Vergleich zwischen dem Wildtyp und der Dreifachmutante zeigt, daß die Mutante bereits bei niedrigeren AraC-Konzentrationen einen Einfluß auf das Zellwachstum hat. Bei der Dreifachmutante reichen bereits 250 µM AraC für ein effektives Abtöten der Zellen aus. Bei dem Wildtyp sind dafür mindestens 500 µM AraC notwendig.

Betrachtet man vergleichend die Versuche mit AraC ohne Proteintransduktion, so zeigt sich, daß über 1 mM Konzentrationen von AraC notwendig sind, um einen Effekt des Nucleosidanalogs zu erkennen. Mit Hilfe der transduzierten Proteine konnte die notwendige Konzentration für ein effektives Abtöten der Zellen gesenkt werden.

5 Diskussion

5.1 Die menschliche Desoxycytidin-Kinase

Die Desoxycytidin-Kinase ist aufgrund ihrer essentiellen Funktion im Nucleosidphosphat-Stoffwechsel ein Zielenzym bei der Behandlung von viralen Infektionen und bei der Krebstherapie. Die menschliche dCK spielt eine zentrale Rolle bei der Aktivierung der Nucleosidanaloga und ist, in vielen Fällen, das limitierende Enzym für den ersten Phosphorylierungsschritt in der Aktivierungskaskade (Mansson et al., 2003).

In dieser Arbeit wurde die menschliche dCK biochemisch und kinetisch näher charakterisiert. Unter Verwendung eines „His-tag“-Expressionssystems konnten größere Mengen von mehr als 40 mg aus einem Liter *E. coli*-Kultur in löslicher und aktiver Form aufgereinigt werden. Bei der Analyse der Kinaseaktivitäten bezüglich der drei natürlichen Substrate dCyt, dAde und dGuo war die geringe Umsatzrate für das Substrat dCyt auffällig. Im Vergleich zu dAde ist der k_{cat} -Wert um den Faktor 27 kleiner.

Ein anderes Bild ergibt sich, wenn man den K_M -Wert mit in die Betrachtung einbezieht. Das Substrat dCyt weist den niedrigsten K_M -Wert auf, was eine hohe Affinität des Enzyms zu dem Substrat anzeigt. Für den Vergleich der Enzymaktivitäten ist die Berücksichtigung beider Parameter wichtig. Dafür wird die sogenannte Effizienz des Enzyms für das jeweilige Substrat verwendet, die aus dem Verhältnis k_{cat}/K_M gebildet wird. Die dCK zeigt unter den natürlichen Substraten die höchste Effizienz bei dCyt. Bei den beiden Purin-Substraten dAde und dGuo ist die Effizienz etwa halb so groß (siehe Tab. 4.1 auf Seite 52).

Die Umsatzraten der dCK zur Aktivierung von Nucleosidanaloga zeigen, daß die Effizienz für die Nucleosidanaloga um den Faktor fünf bis sechs größer ist als für natürliche Substrate. So ist z. B. die Umsatzrate für dFdC (Gemcitabin) um den Faktor zwölf

größer als für dCyt. Trotz dieser höheren Effizienz scheint die dCK für die getesteten Nucleosidanaloga das limitierende Enzym für die Bereitstellung pharmakologisch aktiver, triphosphorylierter Substanzen zu sein (Mansson et al., 2003).

Dies wird deutlich, wenn man die Umsatzraten der dCK mit den Aktivitäten der Nucleosidmonophosphat-Kinasen vergleicht. Dort liegen die k_{cat} -Werte um den Faktor 1000 höher (siehe Tab. 4.8 auf Seite 76 und Tab. 4.1 auf Seite 52). Für die Nucleosidanaloga AraC, Gemcitabin und 5-Aza-dCyt ist der Phosphorylierungsschritt durch die menschliche dCK der einzige Weg zu der pharmakologisch aktiven, triphosphorylierten Form. Im Gegensatz dazu stehen für die natürlichen Substrate alternative Wege für den Aufbau von Substraten für die DNA-Synthese durch den *de novo*-Syntheseweg zur Verfügung.

Ausgehend von der in pET14b überexprimierten und durch Thrombinverdau freigesetzten dCK wurden im Labor von Dr. Arnon Lavie erfolgreich Kristallisationsexperimente durchgeführt. Die Röntgenstrukturen der dCK in Komplex mit dCyt und zwei klinisch relevanten Nucleosidanaloga konnten in hoher Auflösung gelöst werden. Anhand dieser Strukturen konnten die unterschiedlichen Aktivitäten und Spezifitäten des Enzyms für verschiedene Substrate erklärt werden.

Um die kinetischen Daten mit den Strukturinformationen in Einklang zu bringen, kann man einen Reaktionsmechanismus formulieren und die beteiligten Gruppen identifizieren. Der allgemein akzeptierte Mechanismus für die Kinasereaktion bei Desoxyribonucleosid-Kinasen geht davon aus, daß eine Aktivierung der 5'-Hydroxylgruppe der Desoxyribose notwendig ist, um einen nucleophilen Angriff der 5'-OH-Gruppe auf das γ -Phosphat des Phosphatdonors zu ermöglichen (Eriksson et al., 2002). Diese Aktivierung geschieht durch eine Base, die die 5'-OH-Gruppe des Zuckers deprotoniert (Wild et al., 1997). Als wahrscheinlichster Kandidat bei der menschlichen dCK kommt die Carboxylatgruppe des Glu53 in Frage, die in räumlicher Nähe zu der 5'-Hydroxylgruppe des Nucleosids (Entfernung 2,6 Å, siehe Abb. 4.7 auf Seite 59) und der NH1-Gruppe des Arg128 liegt (Entfernung 3,0 Å). In allen drei dCK-Komplexen (dCyt-ADP, AraC-ADP und Gemcitabin-ADP) sind die Atompositionen des Glu53, Arg128 und des Desoxyribonucleosids oder des Nucleosidanalogs im Rahmen der Messgenauigkeit identisch.

Die Umsatzraten der dCK liegen für die Nucleosidanaloga höher als für das natürliche Substrat dCyt. Die k_{cat} -Werte sind etwa um den Faktor zehn größer, während die K_M -Werte für die Nucleosidanaloga nur geringfügig über denen von dCyt liegen (siehe Tab. 4.2 auf Seite 53). Ein Vergleich der Strukturen zeigt, daß die Nucleosidanaloga AraC und Gemcitabin im Vergleich zu dCyt zusätzliche Interaktionen in der Substratbindungstasche eingehen. AraC bildet eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Arg128 des „ERS“-Sequenzmotivs und der Hydroxylgruppe an der 2'-Position des Arabinofuranosyl-Zuckers ($d1 = 3,0 \text{ \AA}$, siehe Abb. 4.7 auf Seite 59).

Für das Gemcitabin findet man eine ähnliche Interaktion zwischen dem Fluoratom (R1). Zusätzlich bildet das zweite Fluoratom (R2) des Gemcitabins eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Tyr86 aus ($d2 = 2,7 \text{ \AA}$, siehe Abb. 4.7 auf Seite 59). Dies läßt vermuten, daß die höhere dCK-Aktivität für die beiden Nucleosidanaloga aus den Interaktionen des Arg128 mit der R1-Position und des Tyr86 mit der R2-Position resultiert, da die Atompositionen des Glu53, des Arg128 und des Nucleosids identisch sind.

Sowohl AraC als auch Gemcitabin besitzen die zusätzliche Arg128-R1-Interaktion und zeigen eine ähnliche Steigerung der Enzymaktivität. Da der k_{cat} -Wert des Gemcitabins nur geringfügig über dem von AraC liegt, scheint die zusätzliche Tyr86-R2-Interaktion des Gemcitabins nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Der ausschlaggebende Grund für die Verbesserung des k_{cat} -Wertes scheint die zusätzliche Arg128-R1-Interaktion zu sein.

Nimmt man an, daß die beobachtete Umsatzrate bei der „steady-state“-Kinetik durch den Phosphoryl-Transferschritt bestimmt wird, kann man eine Erklärung für die erhöhte Umsatzrate auf den Interaktionen von Glu53, Arg128 und dem Substrat aufbauen.

In Anwesenheit von Desoxycytidin findet keine Abschwächung der Interaktion zwischen Glu53 und Arg128 durch das Substrat statt. Im Gegensatz dazu könnte ein Akzeptor von Wasserstoffbrückenbindungen an der 2'-Arabinosyl-Position mit dem Glu53 um die Interaktion mit dem Arg128 konkurrieren. Genau dies findet man bei den Nucleosidanaloga AraC und Gemcitabin in Form einer Hydroxylgruppe bzw. eines Fluoratoms. Dadurch, daß die Glu53-Arg128-Interaktion geschwächt wird, steigt die Fähigkeit der

Carboxylatgruppe des Glu53 als Protonenakzeptor zu fungieren. Dies führt dazu, daß die 5'-Hydroxylgruppe des Nucleosids nucleophiler und somit der Angriff auf das γ -Phosphat des Phosphatdonors erleichtert wird. Damit kann die beobachtete höhere Umsatzrate für AraC und Gemcitabin im Vergleich zu dCyt erklärt werden.

Dieser positive Einfluß der Substituenten an der 2'-Arabinosyl-Position auf die dCK-Aktivität durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen wird auch durch andere Substrate unterstützt. Das Purin-Nucleosidanalogue 2-Chloro-2'-Arabino-Fluoro-2'-Desoxyadenosin (CAFdA, Clofarabin, siehe Abb. 5.1) z. B. zeigt eine fast dreifach erhöhte Effizienz als Substrat für die dCK im Vergleich zu der Variante ohne Fluoratom an der 2'-Position (2'-Chloro-2'-Desoxyadenosin, CdA, Cladribin) (Lotfi et al., 1999).

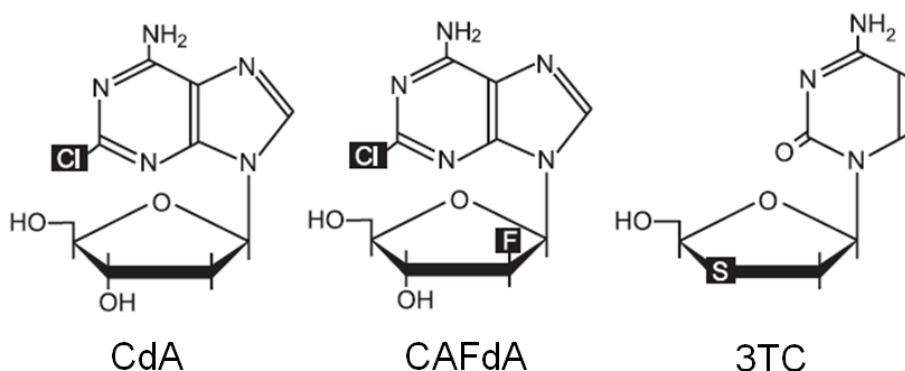


Abbildung 5.1: Nucleosidanaloga 2-Chloro-2'-Desoxyadenosin (CdA), 2-Chloro-2'-Arabino-Fluoro-2'-Desoxyadenosin (CAFdA) und 2',3'-Dideoxy-3'-Thiacytidin (3TC), hervorgehoben sind die Chlor-, Fluor- und Schwefelatome (Van Rompay et al., 2003).

Zur Zeit wird das Nucleosidanalogue CAFdA in der Behandlung von Leukämie mit sehr erfolgversprechenden Aussichten klinisch (Phase II) getestet (Kantarjian et al., 2003; Cooper et al., 2004). Auf Basis der Strukturinformationen der dCK kann man voraussagen, daß die höhere Effizienz des Nucleosidanalogs Clofarabin (CAFdA) durch die Interaktion des Fluoratoms mit dem Arg128 verursacht wird. Das Fluoratom an der 2'-Arabinosyl-Position kann, wie bei dem Gemcitabin, mit dem Arg128 der dCK interagieren, die Glu53-Arg128-Interaktion schwächen und somit die Fähigkeit des Glu53, als Base zu fungieren, erhöhen.

Eine weitere wichtige Interaktion geht von der 3'-Hydroxylgruppe aus, die den Zuckerrückgrat des Nucleosids stabilisiert und positioniert. Kristallisationsexperimente mit Sub-

straten, denen diese 3'-Hydroxylgruppe fehlt, waren nicht erfolgreich. So gelang es z. B. nicht, Kristalle mit dem Nucleosidanalogen 2',3'-Didesoxycytidin (ddC) zu züchten. Eine Begründung dafür mag die fehlende 3'-Hydroxylgruppe des ddC sein. In allen drei Komplexen (dCyt, AraC, Gemcitabin) wird die 3'-Hydroxylgruppe durch die Interaktion mit Glu197 und Tyr86 in Position gehalten (siehe Abb. 4.7 und Kap. 4.1.4 auf Seite 58).

Aufgrund dieser Strukturinformationen läßt sich eine Modifikation des Nucleosidanalogs ddC vorschlagen, um die Phosphorylierungseffizienz und die antivirale Wirkung zu verbessern. Notwendig dafür wäre ein Akzeptor für Wasserstoffbrückenbindungen an der 2'-Position, um eine Interaktion mit Glu197 und Tyr86 herzustellen. In Frage kommen dafür eine Hydroxylgruppe oder Fluoratome an einer oder beiden 2'-Arabinosyl-Positionen.

Eine Substanz, die diese Kriterien erfüllt, ist das 2',3'-Dideoxy-2'-Arabino-Fluorocytosin. Diese Verbindung wurde bereits synthetisiert und hat sich bei Tests von antiviralen HIV-Substanzen als wirksam herausgestellt (Lee et al., 1999; Chen et al., 2003). Auf Grundlage der Strukturinformationen kann man erwarten, daß diese Substanz eine hohe Phosphorylierungseffizienz zeigen wird.

Die menschliche dCK ist auch in der Lage, nicht natürliche L-Nucleosidanaloga zu phosphorylieren (Wang et al., 1999). Dazu zählen 3TC (2',3'-Dideoxy-3'-Thiacytidin, siehe Abb. 5.1 auf der vorherigen Seite), das bereits in klinischer Verwendung für die Behandlung von HIV-Infektionen ist (Kewn et al., 1997), und neuere Entwicklungen wie das Troxacitabine, das zur Zeit in der Behandlung von Tumoren klinisch getestet wird (Gourdeau et al., 2001; Townsley et al., 2003; Giles et al., 2003). Modelliert man diese L-Nucleosidanaloga in die Bindungstasche der dCK, so läßt sich erkennen, daß man die 5'-OH-Gruppe an dieselbe Stelle wie bei der Bindung von dCyt bringen kann. Es besteht auf Basis der dCK-Struktur genügend Raum für die Bindung dieser modifizierten Nucleosidanaloga. Insgesamt scheint die Phosphorylierung dieser künstlichen Nucleoside ähnlich wie bei den natürlichen Nucleosiden abzulaufen. Diese Vorhersagen lassen sich allerdings erst mit Hilfe einer Kristallstruktur in Komplex mit diesen L-Nucleosiden überprüfen.

5.1.1 Veränderung der Substratspezifität

Ein Sequenzvergleich der menschlichen dCK mit der TK2, der dGK und der *Dm*-dNK zeigt ein „Insert“ bei der dCK. Dieses „Insert“, das bei den anderen Enzymen nicht vorhanden bzw. verkürzt ist, bildet einen „Loop“ in der dCK-Struktur (siehe Abb. 4.8 auf Seite 61). Da dessen Funktion und der Einfluß auf die Enzymaktivität unbekannt waren, wurden Mutanten mit deletiertem „Insert“ erzeugt.

Vermutet wurde, daß dieser flexible „Loop“ einen Einfluß auf die Substratelektivität hat. In der dCK-Struktur ist zu sehen, daß dieser „Loop“ in der Lage wäre, auf das Enzym zurückzufalten, um weitere Interaktionen einzugehen. Die verschieden langen Deletionen der „Insert“-Region bestätigten die Vermutung, daß diese Region die Substratelektivität beeinflusst.

Das erste Deletionskonstrukt dCK Δ 1 führte zu einer Verringerung der Enzymaktivität. Die Phosphorylierungseffizienz für das Substrat dCyt verschlechterte sich auf ein Zwanzigstel, für dGuo auf ein Viertel und für AraC auf ein Neunzehntel. Die Verkürzung in der dCK Δ 1 scheint einen starken Einfluß auf die Bindung des Substrats zu haben, wie man an dem 65fach gestiegenen K_M -Wert für dCyt sehen kann (siehe Tab. 4.4 auf Seite 63).

Für die Deletionsmutante dCK Δ 1 wurde auch die Kristallstruktur gelöst. Dadurch war ein direkter Vergleich der Wildtyp-dCK mit der Mutante möglich. Die allgemeine Struktur des Enzyms hat sich durch die Deletion nicht verändert. Das Rückgrat des Enzyms, gemessen an den C α -Atomen, ist weitgehend identisch. Unterschiede treten dagegen an dem „Loop“ zur Erkennung und Bindung des Phosphatdonors auf.

Im Gegensatz zu der Struktur der Wildtyp-dCK gelang es bei der Mutante, Komplexe mit dem alternativen Phosphatdonor UTP, in Form des Produkts UDP, zu erhalten. Kinetische Messungen mit UTP als Phosphatdonor zeigten, daß die Wildtyp-dCK und die Mutante dCK Δ 1 in der Lage sind, UTP zu verwenden (siehe Tab. 4.5 auf Seite 66). Mit UTP als Phosphatdonor kommt es allerdings zu einer Verringerung der maximalen Umsatzrate (V_{max}). Dieser Effekt ist bei den Purin-Substraten dAde und dGuo stärker ausgeprägt als bei dem Pyrimidin-Substrat dCyt. Die dCK Δ 1-Mutante zeigt eine geringere Erniedrigung der Umsatzrate, jedoch waren auch hier die Purin-Substrate am stärksten betroffen.

Die größten Veränderungen zwischen den Strukturen mit gebundenem UDP oder ADP (dCK Δ 1 und Wildtyp-dCK) sind an dem „Loop“ zur Bindung des Phosphatdonors zu erkennen. Dieser „Loop“ zwischen der α 10-Helix und dem β 5-Faltblatt ist zwischen den Formen mit gebundenem UDP oder ADP stark verschoben und in der Struktur ohne Phosphatdonor ungeordnet (siehe Abb. 4.10 auf Seite 65). Durch diese große Flexibilität des „Loops“ scheint die dCK in der Lage zu sein, sowohl ATP als auch UTP binden zu können. Die Möglichkeit, UTP zu nutzen, ist insbesondere im Fall von Krebszellen interessant, da es dort zu einer Verschiebung der relativen NTP-Konzentrationen kommen kann (Traut, 1994). Mit einer dCK-Mutante, die gezielt auf die Phosphatdonor-Präferenz von Krebszellen optimiert ist, wäre man in der Lage, die Aktivierung von Nucleosidanaloga in Krebszellen effektiver und auch spezifischer zu machen.

Im Vergleich zur dCK Δ 1 zeigt das Deletionskonstrukt dCK Δ 2 eine nahezu unveränderte Effizienz für die dCyt-Phosphorylierung. Die entscheidende Veränderung bei dieser Variante ist dagegen der Verlust der Phosphorylierungsaktivität für das Purin-Substrat dGuo. Die weitere Verkürzung der „Insert“-Region scheint die Konformation der Bindungstasche des Enzyms derart zu verändern, daß das Substrat dGuo nicht mehr gebunden oder umgesetzt werden kann.

Hervorzuheben ist die Fähigkeit dieser Variante, weiterhin dCyt effektiv phosphorylieren zu können, wohingegen die Aktivität für das Nucleosidanaloga AraC stark gesunken ist. Der um den Faktor 27 gestiegene K_M -Wert für AraC zeigt eine deutlich verringerte Affinität des Substrats zum Enzym. Die dCK Δ 2-Variante ist spezifischer für Pyrimidin-Substrate geworden, hat aber bei der entscheidenden Funktion, der Phosphorylierung des Nucleosidanalogs AraC, stark an Aktivität verloren. Erstaunlich ist, daß Veränderungen an dem Enzym, die nicht die Region des aktiven Zentrums betreffen, eine derartige Änderung in der Substratspezifität und der Aktivität verursachen können.

Das dCK Δ 3-Konstrukt mit der größten Deletion zeigt keine Phosphorylierungsaktivität mehr. Hier scheint die Konformation des Enzyms derart stark beeinflusst zu sein, daß keine Phosphorylierung mehr möglich ist.

5.1.2 Verbesserung der Kinaseaktivität

Die menschliche dCK ist, aufgrund ihres geringen k_{cat} -Wertes von $0,025 \text{ s}^{-1}$ (siehe Tab. 4.1 auf Seite 52), ein ineffizientes Enzym. Auch bei der Aktivierung von Nucleosidanaloga sind die k_{cat} -Werte der dCK niedrig (siehe Tab. 4.2 auf Seite 53). Im Vergleich dazu zeigt das Enzym von *Drosophila melanogaster* (*Dm*-dNK) eine über 1500fach höhere Effizienz bei der dCyt-Phosphorylierung (Knecht et al., 2002b). Diese höhere Effizienz resultiert überwiegend aus dem über 600fach höheren k_{cat} -Wert der *Dm*-dNK.

Auf Basis der Strukturvergleiche zwischen menschlicher dCK und *Dm*-dNK entstand die Hypothese, daß das Arg104 in der dCK einer der Hauptgründe für den niedrigen k_{cat} -Wert sei. Um einer energetisch nachteiligen Interaktion zwischen der erweiterten Konformation des Arg104 und der Aminogruppe des dCyt aus dem Wege zu gehen, wird erwartet, daß das Arg104 eine Konformation eingeht, die einen größtmöglichen Abstand von dem Substrat dCyt aufweist. In der Abb. 5.2 auf der nächsten Seite kann man sehr gut sehen, daß in der dCK-Struktur mit gebundenem dCyt das Arg104 von dem Substrat wegzeigt.

Im Gegensatz dazu zeigt das entsprechende Arg118 in der dGK-Struktur eine ausgestreckte Konformation, die durch Interaktionen mit dem Ser114 und dem Asp147 stabilisiert wird. Das Arg104 der dCK ist in der Lage, beide Konformationen einzunehmen, um sowohl Purin-Nucleoside (dGuo, dAde) als auch Pyrimidin-Nucleoside (dCyt, AraC) phosphorylieren zu können. In der dGK ist diese Flexibilität durch das Ser114 nicht gegeben und das Enzym kann keine Pyrimidin-Nucleotide phosphorylieren (Johansson et al., 2001).

In der *Dm*-dNK findet sich an der Stelle des Arginins ein Methionin. Mit dem Ziel, die katalytische Effizienz der dCK zu erhöhen, wurde das Arg104 zu einem Methionin mutiert. Da das Arg104 an dem Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt ist (siehe Abb. 5.2 auf der nächsten Seite), wurde zum Ausgleich für das ungeladene Methionin das Asp133 zu einem Alanin mutiert. Zusätzlich wurde das Ala100 in ein Valin mutiert, wie man es bei dem Enzym von *D. melanogaster* findet.

Wie die Ergebnisse in Tabelle 4.6 auf Seite 71 zeigen, haben die Mutationen erfolgreich zu einer Steigerung der Umsatzrate des Enzyms geführt. Besonders hervorzuheben ist

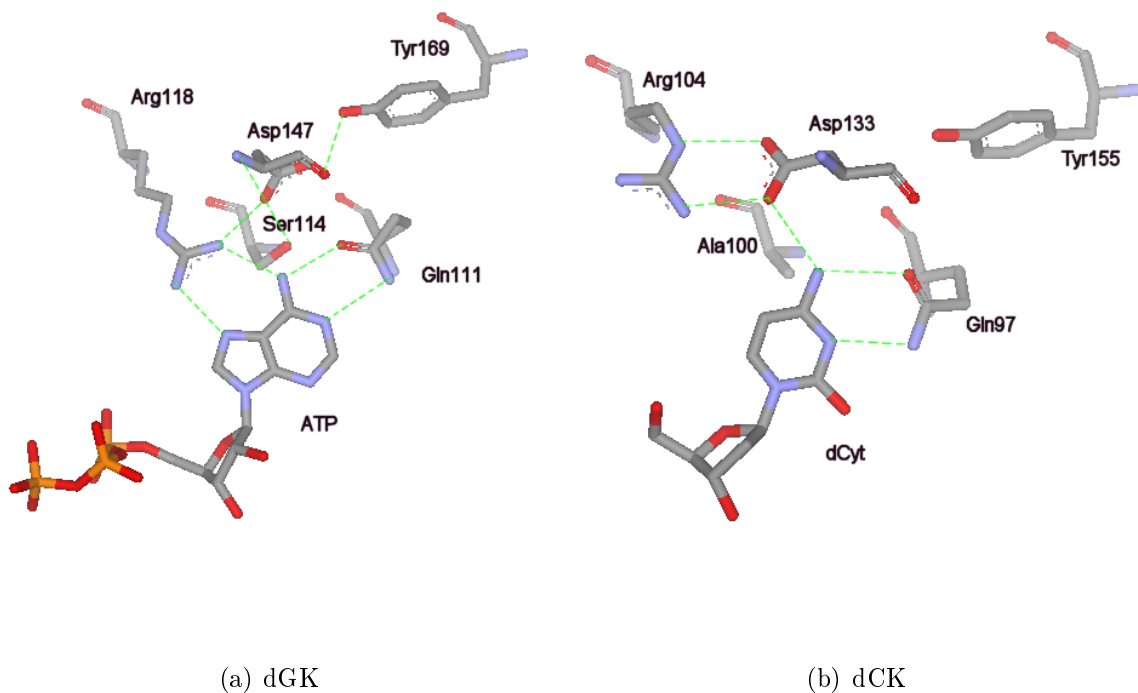


Abbildung 5.2: Vergleich der Interaktionen der kritischen Aminosäuren mit ATP bzw. dem Substrat Desoxycytidin in den Bindungstaschen der menschlichen (a) dGK (PDB-Code 1JAG) und (b) dCK (PDB-Code 1P61). In der Dreifachmutante der dCK wurden die Aminosäuren Ala100, Arg104 und Asp133 mutiert.

der stark gestiegene k_{cat} -Wert für das Substrat dCyt (10fach) und die Steigerung der Phosphorylierungseffizienz um den Faktor 41. Für alle drei getesteten Nucleosidanaloga konnte eine Steigerung der Umsatzrate um Faktoren zwischen 3 und 14 erreicht werden. Für Gemcitabin und 5-Aza-dCyt kam es dadurch zu einer Verbesserung der Phosphorylierungseffizienz. Gleichzeitig hat die Dreifachmutante nahezu die Fähigkeit verloren, Purin-Substrate zu phosphorylieren. Die Substrate dAde und dGuo erreichen nur 0,5 % und 0,02 % der Phosphorylierungseffizienz von dCyt (siehe Tab. 4.7 auf Seite 72). Dadurch ist die dCK-Dreifachmutante spezifischer für Pyrimidine geworden.

Interessant ist die neu hinzugekommene Aktivität für Thd. Dadurch würde sich die Möglichkeit bieten, Nucleosidanaloga, die auf Thd basieren, zu phosphorylieren. Normalerweise können diese Nucleosidanaloga nur von der TK1 bzw. der in den Mitochondrien lokalisierten TK2 phosphoryliert werden. Ein Vergleich der Enzymaktivitäten für das Substrat Thd zeigt, daß die Umsatzraten der dCK-Dreifachmutante ($k_{cat} = 0,59 \text{ s}^{-1}$)

über denen der Wildtyp-TK2 ($k_{cat} = 0,31 \text{ s}^{-1}$) liegen (Al-Madhoun , 2004). Die Effizienz für die Phosphorylierung von Thd liegt bei der dCK-Dreifachmutante fast um den Faktor zwei höher als bei der TK2. Die dCK-Dreifachmutante ist somit ein besseres Enzym für die Phosphorylierung von Thd als die Wildtyp-TK2. Sie sollte dadurch auch in der Lage sein, Nucleosidanaloga, die auf Thymidin basieren, phosphorylieren zu können. Allerdings sind diese Werte im Vergleich zur TK1 gering. Die Umsatzrate der TK1 für Thd ($k_{cat} = 3,2 \text{ s}^{-1}$) ist um den Faktor 11, die Effizienz um den Faktor 89 höher als für die TK2 (Al-Madhoun , 2004). Auch die dCK-Dreifachmutante kann die Umsatzraten der TK1 nicht erreichen, die Effizienz für die Thd-Phosphorylierung ist um den Faktor 46 niedriger als bei der TK1.

Die Fähigkeit der dCK-Dreifachmutante, Thymidin phosphorylieren zu können, basiert wahrscheinlich auf der Vergrößerung der Substratbindungstasche. Die mutierten Aminosäuren befinden sich in der Nähe der 5'-Position des Pyrimidinringes und erzeugen so eine Bindungstasche, die die Methylgruppe des Thymidins aufnehmen kann. In der Wildtyp-dCK kommt es dagegen zu einer sterischen Behinderung, die eine effiziente Phosphorylierung von Thymidin verhindert (siehe Abb. 5.2 auf der vorherigen Seite).

Am bemerkenswertesten bezüglich der dCK-Dreifachmutante ist die über 41fache Steigerung der Phosphorylierungseffizienz für das natürliche Substrat dCyt. Es handelt sich hier um einen der wenigen Fälle, bei denen es mit Hilfe von Struktur-basiertem Design gelang, das Enzym für sein natürliches Substrat drastisch zu verbessern. Bei der Alkalischen Phosphatase aus *E. coli* z. B. konnte durch gezielte Mutationen eine Steigerung der Umsatzrate um den Faktor 40 erreicht werden (Muller et al., 2001). Dies führte allerdings gleichzeitig zu einer Verschlechterung des K_M -Wertes, sodaß insgesamt nur eine geringe Steigerung der Effizienz um den Faktor zwei erreicht werden konnte.

Viele Ansätze zielen im Gegensatz dazu darauf ab, die Enzymfunktion zu verändern, bzw. neue Aktivitäten zu generieren (Cedrone et al., 2000). Dies zeigt auch die Schwierigkeit, ein Enzym für sein natürliches Substrat zu verbessern. Geht man von der Vorstellung aus, daß das Enzym während der Evolution für das natürliche Substrat optimiert worden ist, ist es erstaunlich, daß bei der dCK diese Steigerung der Aktivität möglich war. Die Methode des rationalen, auf Strukturinformationen basierenden Designs einer Mutante war in diesem Fall sehr erfolgreich. Alternative Methoden, wie z. B.

die klassische Zufallsmutagenese oder gezielte Evolution, erzeugen oft eine große Anzahl von Mutationen, die weit vom aktiven Zentrum des Enzyms entfernt sind. Vergleichende Untersuchungen zeigen, daß diese Ansätze oft weniger effizient sind als Methoden, die sich auf das aktive Zentrum oder die Substratbindungstasche beschränken (Morley und Kazlauskas, 2005).

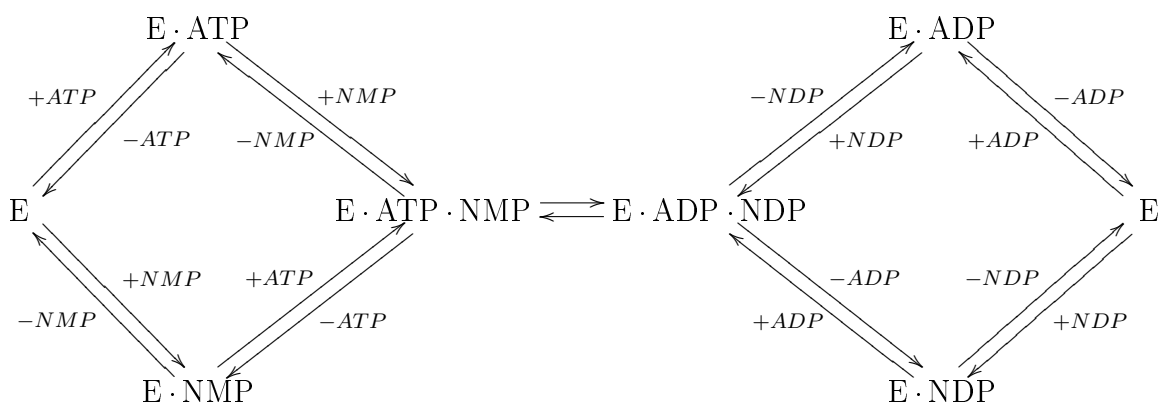
5.2 Die menschliche UMP/CMP-Kinase

Die menschliche UMP/CMP-Kinase spielt durch die Phosphorylierung der Substrate UMP, CMP und dCMP zu den entsprechenden Diphosphaten eine entscheidende Rolle bei der Bereitstellung von Bausteinen für die DNA-Synthese. Weiterhin ist die UMP/CMP-Kinase beteiligt bei der Aktivierung vieler Nucleosidanaloga, die in der Krebs- und Virustherapie eingesetzt werden. Hier übernimmt das Enzym den zweiten, nach der dCK folgenden, Aktivierungsschritt.

In Zusammenarbeit mit dem Labor von Dr. Arnon Lavie konnte auch hier die Struktur des Enzyms gelöst werden. Es gelang in diesem Fall, die offene Form der UMP/CMP-Kinase ohne gebundenes Substrat zu kristallisieren. Dadurch war es möglich, einen Vergleich zwischen offener und geschlossener Form herzustellen (siehe Abb. 4.19 auf Seite 81). Bis zu diesem Zeitpunkt wurden nur die Strukturen der UMP/CMP-Kinase von *S. cerevisiae* und *D. discoideum* aufgeklärt, die Substrat oder Inhibitor gebunden hatten und somit nicht in der offenen Form vorlagen (Scheffzek et al., 1996; Muller-Dieckmann und Schulz, 1995).

Der Vergleich der offenen Form der menschlichen UMP/CMP-Kinase mit der geschlossenen Form der *D. discoideum* UMP/CMP-Kinase zeigt deutlich die durch Substratbindung induzierten konformationellen Änderungen. Nach der „Induced Fit“-Theorie (Koshland, 1994) kann die Bindung eines Substrats an das Enzym deutliche Veränderungen in der Konformation des Enzyms verursachen. Dies führt dazu, daß die katalytischen Aminosäuren korrekt positioniert werden, um an der Katalysereaktion teilzunehmen. Strukturelle Untersuchungen anderer NMP-Kinasen haben ebenfalls zu wichtigen Beobachtungen geführt, die die „Induced Fit“-Theorie stützen (Yan und Tsai, 1999).

Der durch die NMP-Kinase katalysierte Transfer der Phosphorylgruppe geschieht erst nach der Bindung des Phosphatdonors und -akzeptors in der entsprechenden Bindungstasche. Bei dieser Phosphattransferreaktion geht man zur Zeit von einem „Random Bi-Bi“-Mechanismus aus (Rhoads und Lowenstein, 1968). Bei dem „Random Bi-Bi“-Mechanismus kann das Enzym mindestens vier verschiedene Konformationen während des Katalysezyklusses eingehen: einen substratfreien Zustand, jeweils einen Zustand mit gebundenem Phosphatdonor oder -akzeptor und einen Zustand, bei dem beide Substrate gebunden sind. Die folgende Abbildung zeigt schematisch den „Random Bi-Bi“-Mechanismus für ein Enzym E für die Hin- und Rückreaktion:



Bei den NDP-Kinasen findet man im Vergleich dazu den sogenannten „Ping-Pong“-Mechanismus, der sich in zwei Schritte aufteilen lässt. Im ersten Schritt bindet der Phosphatdonor und seine γ -Phosphorylgruppe wird auf ein Histidin der NDP-Kinase übertragen. Im zweiten Schritt bindet dann ein Phosphatakzeptor an die phosphorylierte NDP-Kinase und erhält nun deren Phosphorylgruppe (Schaertl et al., 1998).

Leider hat es sich als schwierig erwiesen, Kristallstrukturen von allen vier Zuständen einer einzelnen NMP-Kinase zu erhalten. Allerdings gelang es, die Strukturen der NMP-Kinasen unterschiedlicher Organismen in verschiedenen Zuständen zu erhalten. Der Vergleich der Kristallstrukturen ermöglichte, die substratinduzierte Bewegung während der Katalysereaktion aufzuzeigen (Vonnheim et al., 1995).

In der Arbeitsgruppe von Dr. Arnon Lavie konnten im Fall der Guanylat-Kinase auf ähnliche Weise die substratinduzierte Bewegung anhand der Strukturen des offenen, des GMP-gebundenen (Blaszczyk et al., 2001) und des GMP/ADP-gebundenen Zustandes (Sekulic et al., 2002) analysiert werden. In diesem Fall wurden die Strukturen der Guanylat-Kinase von *S. cerevisiae* im offenen und GMP-gebundenen Zustand und der Guanylat-Kinase von Maus im GMP/ADP-gebundenen Zustand miteinander verglichen. Mit Hilfe der Struktur der offenen UMP/CMP-Kinase konnte gezeigt werden, daß die menschliche UMP/CMP-Kinase während des Katalysezyklusses eine ähnliche Bewegung vollzieht, wie man sie bei anderen NMP-Kinasen findet.

Eine Änderung der Konformation derjenigen Aminosäuren, die die Gelenkregionen bilden, führt zu einer Bewegung jeder einzelnen Domäne in Relation zu der starren „Core“-Region. Im Vergleich zu der Guanylat-Kinase (Sekulic et al., 2002) gibt es bei der menschlichen UMP/CMP-Kinase zusätzliche Gelenke, die auch innerhalb der NMP-Bindungs-Region und der „Lid“-Region wirken.

Bei der „Lid“-Region findet man diese zusätzlichen Gelenke in dem „Loop“, der die beiden Helices $\alpha 6$ und $\alpha 7$ verbindet (siehe Abb. 4.18 auf Seite 79). Dadurch kann der „Loop“ eine zusätzliche Drehbewegung ausführen, obwohl sich der helikale Teil der „Lid“-Region als einzelner, starrer Körper bewegt. Diese Drehung des „Loops“ führt zu einer Verschiebung der Position der Guanidiniumgruppe des Arg140 von 18 Å zwischen der offenen und geschlossenen Form (siehe Abb. 4.23 auf Seite 87). Die parallel ablaufende Bewegung der $C\alpha$ -Atome der „Lid“-Region beträgt nur 10 Å. Nur in der geschlossenen Konformation kann das Arg140 seine katalytische Rolle erfüllen, indem es begleitend mit der Phosphorylgruppe des NMP und der transferierten Phosphorylgruppe des ATPs interagiert (siehe Abb. 4.23 auf Seite 87).

Auf ähnliche Weise ändert eine andere katalytisch wichtige Aminosäure, das Arg134, seine Konformation, während die „Lid“-Region schließt. Wie in dem Fall des Arg140, kann diese Aminosäure nur in der geschlossenen Konformation mit der transferierten Phosphorylgruppe interagieren. Darüber hinaus wird die Position des Arg134 in der geschlossenen Konformation durch das Asp143 stabilisiert (siehe Abb. 4.22 auf Seite 86). Die Entfernung zwischen dem Arg134 und dem Asp143 verringert sich vom offenen zum geschlossenen Zustand von 10 Å auf 2,8 Å. Die Drehbewegung innerhalb des

„Loops“ wird durch zwei konservierte Glycine ermöglicht, die direkt neben den kritischen Aminosäuren Arg134 und Arg140 liegen (134-**RGKSSGR**-140).

Die beobachtete Bewegung der NMP-Bindungs-Region geschieht mit Hilfe von zwei externen (I und VI) und zwei internen (II und III) Gelenken (siehe Tab. 4.9 auf Seite 83). Sie führt schließlich dazu, daß Aminosäuren in der Helix $\alpha 3$ mit dem Phosphatakzeptor (UMP oder CMP) interagieren können. Erwähnenswert hierbei ist die Interaktion zwischen der 2'-Hydroxylgruppe des NMP-Substrats mit der Carbonylgruppe des Lys61. Diese Interaktion erklärt die Präferenz des Enzyms für Ribonucleotide, wie man an den höheren K_M -Werten für die Desoxyribonucleotide im Vergleich zu den Ribonucleotiden erkennen kann (siehe Tab. 4.8 auf Seite 76). Zusätzlich werden in der geschlossenen Form hydrophobe Interaktionen zwischen der Uridin- bzw. der Cytidin-Base und den Aminosäuren Leu38, Ile62 und Val63 in der NMP-Bindungs-Region gebildet. Zur selben Zeit interagiert in der geschlossenen Form die 3'-Hydroxylgruppe des Zuckers mit Arg151 in der „Lid“-Region. Somit ist der Zuckerring des NMP nicht nur für die Stabilisierung der NMP-Bindungs-Domäne verantwortlich, sondern bildet auch eine Brücke zwischen der „Lid“-Region und der NMP-Bindungs-Domäne. Dies erklärt, warum die Substrate dCMP, dem die 2'-Hydroxylgruppe fehlt, und ddCMP, dem die 2'- und die 3'-Hydroxylgruppe fehlt, mit geringerer Effizienz im Vergleich zu CMP phosphoryliert werden (Liou et al., 2002).

Nicht alle Aminosäuren, die an der Substratbindung beteiligt sind, vollziehen derart drastische Konformationsänderungen. So findet z. B. bei der UMP- und der CMP-Bindung nur eine moderate Konformationsänderung der Oberfläche statt, die von dem $\beta 3$ -Faltblatt und dem folgenden „Loop“ gebildet wird. Die Aminosäure Asn100, die eine wichtige Rolle bei der Basenspezifität der UMP/CMP-Kinase spielt, ist weitgehend statisch. Das für die Interaktion mit der Phosphorylgruppe des UMP oder CMP verantwortliche Arg96 ist ebenfalls Teil der statischen „Core“-Region. Die Situation an der ATP-Bindungsstelle ist ähnlich. Aminosäuren wie z. B. das Lys179, das Interaktionen mit der Aminogruppe des Adenosins eingeht, oder der „P-Loop“, der die α - und β -Phosphate bindet, vollziehen nur leichte konformationelle Änderungen als Antwort auf die ATP-Bindung. Daher ist davon auszugehen, daß diese Aminosäuren für die Erkennung des Substrats notwendig sind.

Betrachtet man die Domänenbewegungen aus thermodynamischer Sicht, so gehen die derzeitigen Theorien davon aus, daß Enzyme zwischen verschiedenen Zuständen mit niedriger Energie oszillieren. Die Bindung des Liganden würde dann dazu führen, die geschlossene Konformation zu stabilisieren (Kumar et al., 1999; Gerstein et al., 1994). Im Sinne des bereits erwähnten „Induced Fit“-Mechanismus kann man folgern, daß die Bindungsstellen schon in Abwesenheit des Substrats teilweise gebildet sind. Während sich das Enzym in der offenen Konformation befindet, kommt es zur Substratbindung. Danach führt das Schließen der NMP-Bindungs- und der „Lid“-Region dazu, daß zusätzliche Kontakte mit dem Substrat gebildet werden. Diese zusätzlichen Kontakte stabilisieren dann das Enzym in der geschlossenen Konformation. Die „Lid“-Region bewegt sich im wesentlichen als einzelne starre Einheit mit einer zusätzlichen Drehbewegung des „Loops“, der die beiden Helices der „Lid“-Region verbindet.

Im Gegensatz dazu vollzieht die NMP-Bindungs-Region ausgeprägtere konformationelle Änderungen, die sich in zwei Bewegungen unterteilen lassen. Zuerst findet eine Bewegung der gesamten Domäne als starre Einheit statt. Zusätzlich kann sich die zentrale Helix der Domäne noch einmal relativ zum Rest der Domäne bewegen.

Zusammengenommen wird durch die Bewegungen der „Lid“- und NMP-Bindungs-Region ein katalytisch aktives Zentrum gebildet. Durch die Verwendung dieses „Induced Fit“-Mechanismus können die NMP-Kinasen nutzlose ATP-Hydrolyse verhindern. Denn in Abwesenheit beider Substrate ist das aktive Zentrum des Enzyms ausgeschaltet. Erst durch die Bindung beider Substrate und die Ausbildung der geschlossenen Konformation kann die Katalysereaktion eingeleitet werden. Die Ergebnisse verdeutlichen die herausragende Rolle der Enzym-Dynamik bei der Katalysereaktion und bei der Substraterkennung der menschlichen UMP/CMP-Kinase.

5.3 Die menschlichen Cytidin-Desaminasen

Die Cytidin-Desaminasen gehören zu der Enzymfamilie, die die hydrolytische Desaminierung ihrer Substrate zu den entsprechenden Uracil-Produkten katalysiert. In menschlichen Zellen gibt es zwei Mitglieder dieser Enzymfamilie, die Cytidin-Desaminase (CDA) und die Desoxycytidylat-Desaminase (dCMP-DA). Die CDA ist Teil des „Salvage“-Syntheseweges und die dCMP-DA ist ein wichtiger Bestandteil der *de novo*-Synthese von Thymidin-Nucleotiden.

Entscheidend für die Untersuchung dieser Enzyme in dieser Arbeit war allerdings ihre Rolle im Metabolismus von Nucleosidanaloga. Die CDA und dCMP-DA sind die direkten Gegenspieler zur menschlichen dCK und zur UMP/CMP-Kinase. Bei einer Vielzahl von in Virus- und Krebstherapien eingesetzten Nucleosidanaloga erzeugen sie durch die Desaminierung eine pharmakologisch inaktive Form, d. h. der Wirkstoff wird z. B. nicht mehr von der DNA-Polymerase als Substrat angenommen. Dazu zählen die in dieser Arbeit getesteten Nucleosidanaloga AraC, Gemcitabin und 5-Aza-dCyt. Um die Desaminierungsaktivitäten vergleichend zu analysieren, wurden die beiden Enzyme kloniert. Sie konnten erfolgreich in *E. coli* überexprimiert und ihre Aktivitäten charakterisiert werden.

Die menschliche CDA kann alle in dieser Arbeit getesteten Nucleosidanaloga mit hoher Aktivität desaminieren (siehe Tab. 4.10 auf Seite 89). Im Desaminierungs-Test zeigt die CDA die höchste Aktivität für das natürliche Substrat Cytidin, gefolgt von Desoxycytidin. Unter den getesteten Nucleosidanaloga ist die höchste Aktivität für Gemcitabin zu finden.

Die dCMP-DA zeigt eine sehr hohe Aktivität für das Substrat dCMP (siehe Tab. 4.11 auf Seite 90). Es konnte keine Aktivität für das Substrat CMP gemessen werden. Die dCMP-DA scheint stark zwischen der Desoxy- und Riboseform zu diskriminieren. Mit Hilfe des Desaminierungs-Tests konnte gezeigt werden, daß die dCMP-DA das Nucleosidanaloga AraCMP desaminieren kann. Die Umsatzrate liegt hier allerdings um den Faktor 23 unter derjenigen mit dem Substrat dCMP. Literaturwerte zeigen, daß die dCMP-DA auch die Monophosphatform des Gemcitabins desaminieren kann (Liou et al., 2003). Im Vergleich zu AraCMP scheint das dFdCMP ein besseres Substrat

für die dCMP-DA zu sein, mit einer über dreifach höheren Umsatzrate.

Die Untersuchungen ergeben, daß es auch auf der Ebene der Monophosphate zu einer Inaktivierung von Nucleosidanaloga durch die dCMP-DA kommt. Insgesamt scheinen die Monophosphate der Nucleosidanaloga AraC und Gemcitabin aber schlechtere Substrate für die dCMP-DA im Vergleich zur CDA zu sein.

Betrachtet man die Aktivitäten beider Desaminasen, so sieht man, daß der größte Beitrag zur Inaktivierung der Nucleosidanaloga in der Zelle wahrscheinlich von der menschlichen CDA stammt. Ohne genaue Kenntnisse der Expression dieser beiden Enzyme in den Zellen ist der relative Anteil der Inaktivierung schwierig abzuschätzen. In Leukämiezellen konnte jedoch festgestellt werden, daß eine erhöhte Menge an Cytidin-Desaminase in den Zellen für die Resistenz gegenüber dem Nucleosidanalogen AraC verantwortlich ist (Balzarini et al., 1998). Auch für das Nucleosidanalogen Gemcitabin zeigen sich deutliche Auswirkungen durch die Desaminierung.

Untersuchungen der Gemcitabin-Konzentrationen im Plasma von Patienten zeigen niedrige Halbwertszeiten zwischen 1–26 Min. (durchschnittlich 7 Min.) (Grunewald et al., 1991, 1992). Dabei wurde auch beobachtet, daß in den Patienten die desaminierte Form von Gemcitabin, das dFdU, der einzige Metabolit im Plasma war. Diese Ergebnisse belegen, daß die Desaminierung von dFdC zu dFdU für die niedrige Halbwertszeit dieses Nucleosidanalogs im Plasma verantwortlich ist (Bouffard et al., 1993). Eine Inhibition der menschlichen CDA könnte die Konzentration des Nucleosidanalogs im Plasma erhöhen und damit auch die intrazelluläre Konzentration steigern.

Insgesamt ist die Desaminierung von Nucleosidanaloga ein wichtiger Faktor, der die Aktivierung von Nucleosidanaloga in der Krebs- und Virustherapie beeinflusst. Die Desaminierung führt zu niedrigeren Konzentrationen des Wirkstoffes in den Zellen, was die effiziente Phosphorylierung durch die menschliche dCK behindert. Konzentrationen des Wirkstoffes, die unterhalb des K_M -Wertes liegen, führen dazu, daß die dCK dieses Substrat nicht mit maximaler Geschwindigkeit phosphorylieren kann und die Phosphorylierung durch dieses Enzym limitierend wird.

5.4 Anwendung der dCK-Varianten in menschlichen Zellen

Ein Ziel der Arbeit war es, dCK-Mutanten für den Einsatz zur therapeutischen Aktivierung wichtiger, Cytidin-basierter Nucleosidanaloga herzustellen. Die erfolgsversprechenden Ergebnisse der erstellten Mutanten machten einen ersten Test der Proteine in menschlichen Zellen interessant. Dafür wurden Zellkulturexperimente mit Fibroblastenzellen im Labor von Dr. G. Divita (Centre de Recherches de Biochimie Macromoléculaire, Montpellier) durchgeführt.

Die Frage war, ob sich durch das Einbringen der Proteine der AraC-Umsatz in den Zellen beeinflussen läßt. Ziel dabei war es, die limitierende Aktivierung durch die zell-eigene dCK zu umgehen und für einen ausreichend hohen AraCTP-Spiegel in den Zellen zu sorgen. Vergleichend wurden der Wildtyp und die Dreifachmutante untersucht. Als Nucleosidanalogen wurde in allen Fällen AraC verwendet. Für das Einbringen der Proteine in die Zellen in biologisch aktiver Form wurden zwei verschiedene Methoden verwendet.

Die erste Methode stützt sich auf das System der Proteintransduktionsdomänen (PTD), die mit dem Zielprotein fusioniert sind und eine Aufnahme in die Zelle vermitteln sollen (siehe Kap. 1.4.2 auf Seite 12). Die zweite Methode wurde im Labor von Dr. G. Divita entwickelt. Dabei werden sogenannte „Carrier“-Peptide eingesetzt, die einen nicht-kovalenten Komplex mit dem Zielprotein bilden und durch spezifische Domänen einen Eintritt in die Zelle bewirken sollen (Morris et al., 2001).

Interessant war der Vergleich der Effizienz dieser beiden Methoden. Die ersten Experimente zeigen keinen eindeutigen Unterschied bei der Wirksamkeit beider Methoden. Es scheint allerdings, daß die Pep-1-vermittelte Proteintransduktion effektiver ist, da geringere Proteinmengen für die Transduktion notwendig sind. Um genauere Aussagen zu machen, sind allerdings weitergehende Experimente notwendig. Ein Vorteil der Pep-1-Methode ist, daß keine Fusion mit dem Zielprotein, wie im Falle der PTDs, notwendig ist. Außerdem scheint die Komplexierung mit dem Peptid das Zielprotein zu stabilisieren.

Die Werte aus Tab. 4.12 auf Seite 94 belegen eindeutig, daß die eingebrachten dCK-Proteine die Aktivierung des AraC positiv beeinflussen. Ein Abtöten der Zellen durch die eingebrachten Proteine ohne AraC konnte durch die Kontrollen weitgehend ausgeschlossen werden. Bei den eingesetzten Proteinkonzentrationen waren keine negativen Effekte auf das Zellwachstum zu sehen. Auch scheint die eingesetzte Dreifachmutante, trotz ihrer über 41fach höheren Effizienz, bei der dCyt-Phosphorylierung den Nucleosidphosphat-Stoffwechsel der Zelle nicht negativ zu beeinflussen.

Dagegen konnte bei der Aktivierung des AraC eine eindeutig höhere Effizienz im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Bereits bei AraC-Konzentrationen von 250 μM konnte in Kombination mit der Dreifachmutante ein effektives Abtöten der Zellen erreicht werden. Beim Einsatz der Wildtyp-dCK waren hierfür AraC-Konzentrationen von mindestens 500 μM notwendig.

Insgesamt haben die Zellkulturexperimente gezeigt, daß durch das Einbringen der dCK-Proteine die für das Abtöten der Zellen notwendige AraC-Konzentration verringert werden konnte. Besonders hervorzuheben ist das Ergebnis mit der dCK-Dreifachmutante, die die besten Effekte in den Experimenten gezeigt hat. Obwohl bei dieser Mutante die Phosphorylierungseffizienz für das Substrat AraC niedriger liegt als bei dem Wildtyp-Enzym, konnte hier ein stärkerer Effekt beobachtet werden. Der höhere K_M -Wert der Mutante scheint sich bei den eingesetzten Konzentrationen nicht negativ ausgewirkt zu haben. Stattdessen scheint der fast dreifach höhere k_{cat} -Wert für die AraC-Phosphorylierung entscheidend gewesen zu sein.

Bei den k_{cat} -Werten zeigt die dCK-Dreifachmutante höhere Umsatzraten für alle getesteten Nucleosidanaloga. Für Gemcitabin steigerte sich die Umsatzrate um den Faktor drei und für 5-Aza-dCyt sogar um den Faktor 14. Deswegen wird es nach den ersten Tests mit AraC interessant, weitere Nucleosidanaloga wie Gemcitabin und vor allem 5-Aza-dCyt in den Zellkulturexperimenten zu testen. Allerdings läßt sich der Einfluß der K_M - und k_{cat} -Werte unter den getesteten Bedingungen nur schwer abschätzen und vorhersagen, da viele unbekannte Faktoren eine Rolle spielen. So ist im Moment nicht bekannt, ob sich in den Versuchen die intrazellulären Konzentrationen der Wildtyp-dCK und der Mutante unterscheiden oder ob es Unterschiede in ihrer intrazellulären Stabilität gibt.

Die Gabe von rekombinanten oder aus natürlichen Quellen aufgereinigten Proteinen wird heute schon bei einigen Krankheiten routinemäßig angewendet. So werden z. B. bei der Behandlung von Diabetes rekombinant hergestellte Insulinanaloga eingesetzt. Das erste genetisch veränderte und rekombinant hergestellte Insulin (Lispro) ist bereits seit 1996 in der klinischen Anwendung. Bei diesem Insulinanalogon wurde die Reihenfolge zweier Aminosäuren in der B-Kette des Insulins vertauscht (Vajo und Duckworth, 2000). Seitdem erhielten weitere Insulinanaloga eine Zulassung, bei denen durch Mutation die Aminosäuresequenz des menschlichen Insulins verändert wurde.

Im Rahmen einer potentiellen therapeutischen Anwendung bei der Krebsbehandlung hat die Proteintransduktion erfolgversprechende Aussichten. Ein Beispiel ist die erfolgreiche Therapie einer Form von Brustkrebs mit Herceptin (Genentech, San Francisco). Dieses Medikament ist seit dem Jahr 2000 für die Behandlung von Frauen mit Brustkrebs zugelassen. Bei dieser Behandlung werden chimäre, monoklonale Antikörper gegen einen menschlichen Rezeptor für die epidermalen Wachstumsfaktoren HER1 und HER2 eingesetzt (Ranson und Sliwkowski, 2002; Baselga et al., 1996). Dieser Rezeptor ist bei ca. 25 % aller Brustkrebspatienten überexprimiert (Slamon et al., 1989).

Der kombinierte Einsatz von Proteintransduktion von Nucleosid-Kinasen und Nucleosidanaloga hat das Potential für eine neue Form der Therapie. Sein Anwendungsfeld liegt besonders dort, wo der therapeutische Effekt normalerweise keine längere und regulierte Expression eines Transgens verlangt, wie es oft bei der Gentherapie der Fall ist. Auf lange Sicht könnte sich dieser Therapieansatz im Gegensatz zur Gentherapie als technisch einfacher und kostengünstiger herausstellen. Einige der möglichen Nebeneffekte der Gentherapie, wie z. B. Toxizität, Immunreaktionen oder der unkontrollierte Einbau des als Genfahre verwendeten Vektors im Genom, könnten vermieden werden.

Bei der therapeutischen Anwendung der Proteintransduktion können auch Nebeneffekte wie z. B. Immunreaktionen gegen das eingebrachte Protein auftreten. Daher ist der in dieser Arbeit verwendete Ansatz, der auf menschlichen Enzymen aufbaut, die nur an wenigen Stellen modifiziert sind, für solche Therapien interessant. Durch die Verwendung menschlicher Enzyme sind nur geringe oder keine Immunreaktionen zu erwarten.

Andere Ansätze basieren auf viralen Proteinen, wie z. B. der Thymidin-Kinase des Herpes-simplex-Virus (HSV-TK). Die HSV-TK wird z. B. bei der sogenannten „Suizid-Gentherapie“ in Kombination mit dem Nucleosidanalogen Ganciclovir eingesetzt (Yazawa et al., 2002). Bei dieser Therapie ist das Ziel, Tumorzellen durch Genübertragung so zu verändern, daß Krebsmedikamente nur in ihnen wirksam werden. Da das Nucleosidanalogen Ganciclovir von den menschlichen Nucleosid-Kinasen nicht phosphoryliert werden kann, zeigt Ganciclovir auf unbehandelte Zellen keine Wirkung. Erst durch die mit Hilfe der Gentherapie eingebrachte HSV-TK werden die Krebszellen sensitiv für dieses Nucleosidanalogen. Die HSV-TK ist dann in der Lage, selektiv das Ganciclovir in den Krebszellen zu aktivieren und dadurch die Zellen abzutöten.

Aufgrund der Verwendung viraler Kinasen ist die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Immunreaktionen bei dieser Strategie relativ hoch. Bei gentherapeutischen Versuchen an Mäusen, in denen HSV-TK in Kombination mit GCV eingesetzt wurde, kam es zu dem Problem, daß sich während der Behandlung Immunreaktionen gegen das virale Enzym entwickelt haben (Warren et al., 2002). Bezogen auf den Menschen, wäre bei der Verwendung modifizierter menschlicher Enzyme diese Gefahr geringer oder ließe sich ganz vermeiden.

6 Zusammenfassung

Die menschlichen Nucleosid- und Nucleosidmonophosphat-Kinasen spielen eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung einer Vielzahl von Nucleosidanaloga, die in der Behandlung von Virus- und Krebserkrankungen eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurden Enzyme untersucht, die limitierend für die Aktivierung Pyrimidin-basierter Nucleosidanaloga in menschlichen Zellen sein können. Dazu wurden die menschliche Desoxycytidin-Kinase (dCK) und die UMP/CMP-Kinase kloniert, überexprimiert und aufgereinigt. Da neben der Phosphorylierung durch Kinasen auch die Inaktivierung der Nucleosidanaloga durch Desaminasen eine wichtige Rolle spielt, wurden die menschliche Cytidin- und die Desoxycytidylat-Desaminase ebenfalls rekombinant hergestellt und in die Untersuchungen einbezogen.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Arnon Lavie wurde die Kristallstruktur der menschlichen dCK und der UMP/CMP-Kinase gelöst. Für die dCK konnten dabei Strukturen in Komplex mit dCyt und den zwei wichtigen Nucleosidanaloga AraC und Gemcitabin erhalten werden. Daraus ließen sich wichtige Informationen über die Bindung und Phosphorylierung dieser Substrate ableiten. Die UMP/CMP-Kinase konnte in der Substrat-freien Konformation kristallisiert werden. Dies erlaubte die Rekonstruktion des Katalysemechanismus durch Vergleich mit Kristallstrukturen anderer Spezies, die in anderen, Substrat-gebundenen Konformationen vorliegen. Die Untersuchungen der menschlichen Desaminasen CDA und dCMP-DA ergaben, daß beide Enzyme in der Lage sind, wichtige Nucleosidanaloga zu desaminieren. Der Vergleich der Aktivitäten beider Desaminasen zeigt, daß der größte Beitrag zur Inaktivierung der Nucleosidanaloga in den Zellen wahrscheinlich von der menschlichen CDA ausgeht.

Hauptziel dieser Arbeit war es, diese Nucleosid-Kinasen kinetisch und an Hand der Proteinstruktur zu untersuchen, um Informationen für das Design von Mutanten mit verbesserter Kinaseaktivität für Nucleosidanaloga zu erhalten.

Auf der Basis von Sequenzvergleichen wurden Deletionsmutanten der dCK erstellt, bei denen eine Region, die in der Kristallstruktur einen „Loop“ bildet, teilweise entfernt wurde. Bei der dCK Δ 2-Mutante konnte dadurch, bei fast unveränderter Aktivität für die dCyt-Phosphorylierung, eine Verschiebung der Spezifität von Purin- zu Pyrimidin-Substraten erreicht werden. Eine Verbesserung der Kinaseaktivität gelang mit diesen Mutanten allerdings nicht.

Auf der Basis von Struktur- und Sequenzvergleichen mit der *Dm*-dNK konnten katalytisch wichtige Aminosäuren identifiziert werden, die zur Entwicklung der dCK-Dreifachmutante führten. Mit dieser Mutante konnte eine deutliche Steigerung der Enzymaktivität der menschlichen dCK erreicht werden. Erstaunlich ist die Steigerung der Phosphorylierungseffizienz des Enzyms um den Faktor 41 für das natürliche Substrat dCyt. Auch für die in dieser Arbeit wichtigen Nucleosidanaloga konnte die Enzymaktivität verbessert werden. Für die Nucleosidanaloga AraC, Gemcitabin und 5-Aza-dCyt stiegen die k_{cat} -Werte um Faktoren zwischen 3 und 14. Darüber hinaus konnte eine neue Enzymaktivität festgestellt werden. Die Dreifachmutante ist, im Gegensatz zum Wildtyp-Enzym, in der Lage, auch Thd effizient zu phosphorylieren. Gleichzeitig verringerte sich die Enzymaktivität für die Purin-Substrate dGuo und dAde. Insgesamt findet bei der Dreifachmutante eine Verschiebung der Substratspezifität zu den Pyrimidin-Substraten bei gleichzeitiger Erhöhung der Aktivität statt.

Um die Relevanz dieser Aktivitätssteigerungen im Hinblick auf die Aktivierung von Nucleosidanaloga zu zeigen, wurden Experimente an menschlichen Zellen durchgeführt. Dabei konnten erfolgreich zwei Methoden zur Proteintransduktion getestet werden. Die Pep-1-vermittelte Proteintransduktion scheint dabei Vorteile gegenüber der Methode mit PTD-Fusionsproteinen zu haben. Die eingebrachten Proteine haben die AraC-Aktivierung in den Zellen positiv beeinflusst. Der Vergleich des Wildtyp-Enzyms und der Dreifachmutante zeigt, daß bei der Mutante bei niedrigerer AraC- und Proteinkonzentration ein effektiveres Abtöten der Zellen erreicht werden kann. Diese Ergebnisse eröffnen die Möglichkeit, die dCK-Dreifachmutante im Rahmen von proteintherapeutischen Versuchen zur Modulation des Nucleosidanalagon-Umsatzes in Krebszellen einzusetzen.

A Anhang

A.1 Nucleotidsequenzen

A.1.1 Die menschliche dCK

```
atgccaccccgccaagagaagctgccctctttctcagccagctctgaggggacccgc
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
taccggtggggcgggttctcttcgacgggcagaaagagtcggtcgagactcccctgggcg

M A T P P K R S C P S F S A S S E G T R -

atcaagaaaatctccatcgaaggaacatcgctgcaggaagtcaacatttgtgaatc
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
tagttcttttagaggtagcttcctttagcgcgacgtcccttcagttgtaaacacttatag

I K K I S I E G N I A A G K S T F V N I -

cttaacaattgtgtgaagattgggaagtggtcctgaacctgttgccagatggtgcaat
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
gaattgttaacacacttctaacccttcaccaaggacttggacaacggtctaccacgtta

L K Q L C E D W E V V P E P V A R W C N -

gttcaaagtactcaagatgaattgaggaacttacaatgtctcagaaaaatgggtgggaat
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
caagtttcatgagttctacttaaaccttgaatggttacagagtctttttaccaccctta

V Q S T Q D E F E E L T M S Q K N G G N -

gttcttcagatgatgtatgagaaacctgaacgatggtcttttaccttcaaacctacgcc
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
caagaagtctactacatactcttggacttgctaccagaaaatggaaggttggatgctgg

V L Q M M Y E K P E R W S F T F Q T Y A -

tgtctcagtcgaataagagctcagcttgcctctctgaatggcaagctcaaagatgcagag
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
acagagtcagcttattctcgagtcgaacggagagacttaccggttcgagtttctacgtctc

C L S R I R A Q L A S L N G K L K D A E -

aaacctgtattatTTTTTgaacgatctgtgtatagtgacaggtatTTTTTgcatctaatt
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
tttggacataataaaaaacttgcctagacacatatcactgtccatataaaaaacgtagatta

K P V L F F E R S V Y S D R Y I F A S N -
```

```

ttgatgaatctgaatgcatgaatgagacagagtggaacaatttatcaagactggcatgac
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
aacatacttagacttacgtacttactctgtctcacctgttaaatagttctgaccgtactg

L Y E S E C M N E T E W T I Y Q D W H D -

tggatgaataaccaatthggccaaagccttgaattggatggaatcatttatcttcaagcc
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
acctacttattggttaaaccggtttcggaacttaacctaccttagtaaatagaagttcgg

W M N N Q F G Q S L E L D G I I Y L Q A -

actccagagacatgcttacatagaatatatttacggggaagaaatgaagagcaaggcatt
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
tgaggtctctgtacgaatgtatcttataataatgcccttcttacttctcgttcgtaa

T P E T C L H R I Y L R G R N E E Q G I -

cctcttgaatatthtagagaagcttcattataaacatgaaagctggctcctgcataggaca
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
ggagaacttataaatctctcgaagtaaatthtactttcgaccgaggacgtatcctgt

P L E Y L E K L H Y K H E S W L L H R T -

ctgaaaaccaacttcgattatcttcaagaggtgcctatcttaacactggatgtaaatgaa
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
gacttttggtgaagctaataagaagttctccacggatagaattgtgacctacaattactt

L K T N F D Y L Q E V P I L T L D V N E -

gactttaagacaaatatgaaagtctggttgaaaaggtcaaagagtttttgagtactttg
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
ctgaaatttctgtttatactttcagaccaacttttccagtttctcaaaaactcatgaac

D F K D K Y E S L V E K V K E F L S T L -

tga
781 --- 783
act

* -

```

A.1.2 Die menschliche UMP/CMP-Kinase

```

atgaagccgctggtcgtgttctcctcggcggccccggcgccggcaaggggaccagtg
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
tacttcggcgaccagcacaagcaggagccgcccgggcccggcgttcccctgggtcacg

M K P L V V F V L G G P G A G K G T Q C -

gccgcgatcgtcgagaaatatggctacacacacctttctgcaggagagctgcttctgat
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
cgggcgtagcagctctttataccgatgtgtgtggaagacgtcctctcgacgaagcacta

A R I V E K Y G Y T H L S A G E L L R D -

```

```

gaaaggaagaaccagattcacagtatggtgaacttattgaaaagtacattaaagaagga
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
ctttccttcttgggtctaagtgtcataccacttgaataacttttcatgtaatttcttct

E R K N P D S Q Y G E L I E K Y I K E G -

aagattgtaccagttgagataaccatcagtttattaaagagggaaatggatcagacaatg
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
ttctaacatgggtcaactctattggtagtcaaataatttctccctttacctagtctgttac

K I V P V E I T I S L L K R E M D Q T M -

gctgccaatgctcagaagaataaattcttgattgatgggtttccaagaaatcaagacaac
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
cgacggttacgagtcttcttatttaagaactaactacccaaaggttcttttagttctgttg

A A N A Q K N K F L I D G F P R N Q D N -

cttcaaggatggaacaagaccatggatgggaaggcagatgtatctttcgttctctttttt
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
gaagttcctaccttgttctgtgacctacccttccgtctacatagaaagcaagagaaaaaa

L Q G W N K T M D G K A D V S F V L F F -

gactgtaataatgagatttgtattgaacgatgtcttgagaggggaaagagtagtgtagg
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
ctgacattattactctaaacataacttgctacagaactctcccctttctcatcaccatcc

D C N N E I C I E R C L E R G K S S G R -

agtgatgacaacagagagagcttgaaaagagaattcagacctaccttcagtcaacaag
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
tcactactgttgtctctctcgaaccttttctctaagtctggatggaagtcagttgtttc

S D D N R E S L E K R I Q T Y L Q S T K -

ccaattattgacttatatgaagaaatggggaaagtcaagaaatagatgcttctaaatct
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
ggttaataactgaatatacttctttaccctttcagttcttttatctacgaagatttaga

P I I D L Y E E M G K V K K I D A S K S -

gttgatgaagtttttgatgaagttgtgcagatttttgacaaggaaggctaa
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 591
caactacttcaaaaactacttcaacacgtctaaaaactgttccttccgatt

V D E V F D E V V Q I F D K E G * -

```

A.1.3 Die *Drosophila melanogaster* dNK

```

atggcggaggcagcatcctgtgccccaaaggggaccaagtacgccgagggcaccagccc
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
taccgcctccgctgtaggacacgggctttcccctggttcatgcggtcccgtgggtcggg

M A E A A S C A R K G T K Y A E G T Q P -

ttcaccgtcctcatcgagggaacatcggcagcgggaagaccacgtatttgaaccacttc
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
aagtggcaggagtagctcccgttgtagccgtcgccttctggtgcataaacttggtgaag

F T V L I E G N I G S G K T T Y L N H F -

gagaagtacaagaacgacatttgccctgctgaccgagcccgtcgagaagtggcgcaacgtc
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
ctcttcatgttcttgctgtaaacggacgactggctcgggcagctcttcaccgcgttgag

E K Y K N D I C L L T E P V E K W R N V -

aacggggtaaatctgctggagctgatgtacaaagatcccaagaagtgggcatgcctttt
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
ttgccccatttagacgacctcgactacatgtttctagggttcttcaccggtacgggaaa

N G V N L L E L M Y K D P K K W A M P F -

cagagttatgtcacgctgaccatgctgcagtcgcacaccgccccaccaacaagaagcta
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
gtctcaatacagtgcgactggtagcagctcagcgtgtggcggggttggttcttctgat

Q S Y V T L T M L Q S H T A P T N K K L -

aaaataatggagcgcctccatttttagcgcctcgctattgcttcgtggagaacatgcgacga
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
ttttattacctcgcgaggtaaaaatcgcgagcgataacgaagcacctcttgtagcgtgct

K I M E R S I F S A R Y C F V E N M R R -

aacggctcgctggagcaggcatgtacaatacgcctggaggagtgtacaagttcatcgaa
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
ttgccgagcgacctcgtcccgtacatgttatgcgacctcctcacatgttcaagtagctt

N G S L E Q G M Y N T L E E W Y K F I E -

gagtccattcacgtgcaggcggacctcatcatatatctgcgcacctcgccgaggtggcg
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
ctcaggtaagtgcacgtccgcctggagtagtatatagacgcgtggagcggcctccaccgc

E S I H V Q A D L I I Y L R T S P E V A -

tacgaacgcatccggcagcgggctcgttctgaggagagctgcgtgccgcttaagtacctt
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
atgcttgctgtaggccgtcgcggagcaagactcctctcgcagcagcggcgaattcatggaa

Y E R I R Q R A R S E E S C V P L K Y L -

```

```

caggagctgcatgagttgcacgaggactggttgatacaccagagacgaccgagtcgtgc
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
gtcctcgcagctactcaacgtgctcctgaccaactatgtggctctctgctggcgtcagcacg

Q E L H E L H E D W L I H Q R R P Q S C -

aaggtcctagtcctcgcgatgccgatctgaacctggaaaacattggcaccgagtaccagcgc
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
ttccaggatcaggagctacggctagacttggaccttttgtaaccgtggctcatggctcgcg

K V L V L D A D L N L E N I G T E Y Q R -

tcggagagcagcatattcgacgccatctcaagtaaccaacagccctcgccggttctggtg
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
agcctctcgtcgtataagctgcggtagagttcattggttgtcgggagcggccaagaccac

S E S S I F D A I S S N Q Q P S P V L V -

tcgccagcaagcgcagagggtcgccagataa
721 -----+-----+-----+-----+-----+ 753
agcgggtcgttcgcggtctcccagcggcttatt

S P S K R Q R V A R * -

```

A.1.4 Die menschliche Cytidin-Desaminase

```

atggaggcgaaggcggcaccacaagccagctgcaagcggcgcgtgctcgggtgctggcagag
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
tacctccgcttccgctgggttcggctcgcagcttcgccgcgcacgaccacagccgtctc

M E A K A A P K P A A S G A C S V S A E -

gagaccgaaaagtggatggaggaggcgcgatgcacatggcacaagaagccctcgaaaatact
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
ctctggcttttcacctacctcctccgctacgtgtaccggtttcttcgggagcttttatga

E T E K W M E E A M H M A K E A L E N T -

gaagttcctggttgctgtcttatggtctacaacaatgaagttgtaggaaggggagaaat
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
cttcaaggacaaccgacagaataccagatggtgttacttcaacatcccttcccctcttta

E V P V G C L M V Y N N E V V G K G R N -

gaagttaaccaaaccaaaaatgctactcgcacatgcagaaatgggtggccatcgatcaggtc
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
cttcaattggtttggtttttacgatgagctgtacgtctttaccaccggtagctagctccag

E V N Q T K N A T R H A E M V A I D Q V -

ctcgattggtgctgctcaaagtggaagagtcctcctgaaagtatttgaacacactgtgttg
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
gagctaaccacagcagtttcacggttctcagggagacttcataaacttgtgtgacacaac

L D W C R Q S G K S P S E V F E H T V L -

```

```

tatgtcactgtggagccgtgcattatgtgtgcagctgctctccgcctgatgaaaatcccg
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
atacagtgcacacctcggcacgtaatacacacgtcgacgagagggcggactacttttagggc

Y V T V E P C I M C A A A L R L M K I P -

ctggttgatatggctgtcagaatgaacgatttggtggttggtgctctgttctaaatatt
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
gaccaacataataccgacagtcttacttgctaaaccaccaacaccgagacaagatttataa

L V V Y G C Q N E R F G G C G S V L N I -

gcctctgctgacctaccaaacactgggagaccatttcagtgtatccctggatatcgggct
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
cggagacgactggatggtttgtagccctctggtaaagtcacatagggacctatagcccga

A S A D L P N T G R P F Q C I P G Y R A -

gaggaagcagtggaatgttaaagaccttctacaacaagaaaatccaaatgcacaaaaa
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
ctccttcgtcacctttacaatttctggaagatgtttgttcttttaggtttacgtggtttt

E E A V E M L K T F Y K Q E N P N A P K -

tcgaaagttcggaaaaggaatgtcagaaatcttga
541 -----+-----+-----+-----+-----+ 576
agctttcaagcctttttccttacagtctttagaact

S K V R K K E C Q K S * -

```

A.1.5 Die menschliche Desoxycytidylat-Desaminase

```

atgagtgaagtttctgcaagaacgggacgactatgtggaatggccagagtattttatg
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
tactcacttcaaaggacgttctttgcctgctgataaaccttaccggtctcataaaatac

M S E V S C K K R D D Y L E W P E Y F M -

gctgtggccttcttatcagcacagagaagcaaatccaaattcccaggctcggcgcctgc
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
cgacaccggaagaatagtcgtgtctctctgctttctaggtttaaggtccagccgaggac

A V A F L S A Q R S K D P N S Q V G A C -

atcgtgaattcagaaaacaagattgtcgggattgggtacaatgggatgccaaatgggtgc
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
tagcacttaagtcttttcttaacagccctaaccatgtttaccctacggtttaccacg

I V N S E N K I V G I G Y N G M P N G C -

```

```

    agtgatgacgtggtgccttggagaaggacagcagagaataagctggacaccaaatacccg
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
    tcactactgcacaacggaacctcttctctgtcgtctcttattcgacctgtggtttatgggc

    S D D V L P W R R T A E N K L D T K Y P -

    tacgtgtgccatgctggagctgaatgccatcatgaacaaaaattcgaccgatgtgaaaggc
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
    atgcacacggtagcctcgacttacggtagtagtctgtttttaagctggctacactttccg

    Y V C H A E L N A I M N K N S T D V K G -

    tgtagtatgtatgtcgccttgtcccttgaatgaatgcgctaagctcatcatccaggca
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
    acatcatacatacagcggaacaagggaacattacttacgcgattcgagtagtagtccgt

    C S M Y V A L F P C N E C A K L I I Q A -

    ggtataaaagaagtgattttcacgtctgataaataccatgatagtgacgaggcaactgct
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
    ccatattttcttactaaaagtgacagactatttatggtactatcactgctccggtgacga

    G I K E V I F T S D K Y H D S D E A T A -

    gcgaggctcctgtttaatatggccgggtgacattccggaaattcataccgaagtgcagc
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
    cgctccgaggacaaattataccggccccactgtaaggcctttaagtatggcttcacgtcg

    A R L L F N M A G V T F R K F I P K C S -

    aagattgtcattgactttgattcaattaacagcagaccgagtcaaaagcttcagtga
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 537
    ttctaacagtaactgaaactaagttaattgtcgtctggctcagttttcgaagtcact

    K I V I D F D S I N S R P S Q K L Q * -

```

Drei- und Ein- Buchstabencode der Aminosäuren

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

A.2 Abkürzungsverzeichnis

Neben den international gültigen physikalischen Einheiten und chemischen Symbolen fanden folgende Abkürzungen Verwendung:

3TC	β -L-2',3'-Didesoxy-3'-Thiacytidin
ADK	Adenylat-Kinase
AID	„Activation-induced Deaminase“
AK	Adenosin-Kinase
AraC	Arabinosylcytosin (Cytarabin)
AraCMP	Arabinosylcytosinmonophosphat
5-Aza-dCyt	5-Aza-2'-Desoxycytidin (Decitabin)
CAFdA	2-Chloro-2'-Arabino-Fluoro-2'-Desoxyadenosin
CdA	2-Chloro-2'-Desoxyadenosin
CDA	Cytidin-Desaminase
Cyt	Cytidin
dAde	Desoxyadenosin
dCK	Desoxycytidin-Kinase
dCMP	Desoxycytidinmonophosphat
dCMP-DA	Desoxycytidylat-Desaminase
dCyt	Desoxycytidin
dFdC	2',2'-Difluorodesoxycytidin (Gemcitabin)
dGK	Desoxyguanosin-Kinase
dGuo	Desoxyguanosin
<i>Dm</i> -dNK	<i>Drosophila melanogaster</i> Desoxyribonucleosid-Kinase
dNK	Desoxyribonucleosid-Kinase
GCV	Ganciclovir
GST	Glutathion-S-Transferase
GUK	Guanylat-Kinase
HSV-TK	Herpes-Simplex-Virus Thymidin-Kinase
k_{cat}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
K_d	Dissoziationskonstante
K_i	Inhibierungskonstante
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
LDH	Lactatdehydrogenase
NDP-Kinase	Nucleosiddiphosphat-Kinase
NMP-Kinase	Nucleosidmonophosphat-Kinase
NTP	Nucleosidtriphosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvat-Kinase
PTD	Proteintransduktionsdomäne
TAT	„Transactivator of Transcription“
TdK	<i>E. coli</i> Thymidin-Kinase
Thd	Thymidin
TK1	Thymidin-Kinase 1
TK2	Thymidin-Kinase 2
TMPK	Thymidylat-Kinase

U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UCK	Uridin/Cytidin-Kinase
UMPK	UMP/CMP-Kinase
UTP	Uridintriphosphat
V_{max}	Maximale Umsatzrate

B Literaturverzeichnis

Die Literaturangaben sind alphabetisch nach den Namen der Autoren sortiert. Bei mehreren Autoren wird nach dem ersten Autor sortiert.

- J. L. Abbruzzese. New applications of gemcitabine and future directions in management of pancreatic cancer. *Cancer*, 15(4 Suppl.):941-5, 2002.
- K. C. Agarwal, R. P. Miech und R. E. Parks Jr. Guanylate kinases from human erythrocytes, hog brain, and rat liver. *Methods Enzymol.*, 51:483-90, 1978a.
- R. P. Agarwal, B. Robison und R. E. Parks Jr. Nucleoside diphosphokinase from human erythrocytes. *Methods Enzymol.*, 51:376-86, 1978b.
- A. S. Al-Madhoun, S. Eriksson, Z.-X. Wang, E. Naimi, E. E. Knaus, and L. I. Wiebe. Phosphorylation of isocobostyryl- and difluorophenyl-nucleoside thymidine mimics by the human deoxynucleoside kinases. *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*, 23(12):1865-74, 2004.
- H. Arakawa, J. Hauschild und J. M. Buerstedde. Requirement of the activation-induced deaminase (AID) gene for immunoglobulin gene conversion. *Science*, 295(5558):1301-6, 2002.
- T. Arima, H. Akiyoshi und S. Fujii. Characterization of pyrimidine nucleoside monophosphokinase in normal and malignant tissues. *Cancer Res.*, 37(6):1593-1597, 1977.
- E. S. Arner und S. Eriksson. Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacol. Ther.*, 67(2):155-86, 1995.
- J. Balzarini, L. Naesens und E. D. Clercq. New antivirals - mechanism of action and resistance development. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1(5):535-46, 1998.
- J. Baselga, D. Tripathy, J. Mendelsohn, S. Baughman, C. C. Benz, L. Dantis, N. T. Sklarin, A. D. Seidman, C. A. Hudis, J. Moore, P. P. Rosen, T. Twaddell, I. C. Henderson und L. Norton. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 14(3):737-44, 1996.
- J. M. Berg, J. L. Tymoczko und L. Stryer. Biosynthese der Nucleotide. In *Biochemie*, Seite 763-86. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2003.
- H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov und P. E. Bourne. The protein data bank. *Nucleic Acids Res.*, 28(1):235-242, 2000.

- J. Blaszczyk, Y. Li, H. Yan und X. Ji. Crystal structure of unligated guanylate kinase from yeast reveals GMP-induced conformational changes. *J. Mol. Biol.*, 307(1):247–57, 2001.
- D. Y. Bouffard, J. Laliberte und R. L. Momparler. Kinetic studies on 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) with purified human deoxycytidine kinase and cytidine deaminase. *Biochem. Pharmacol.*, 45(9):1857–61, 1993.
- M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248–54, 1976.
- R. Brundiers. *Protein-Design an Thymidylatekinasen zur Verbesserung des AZT-Monophosphat Umsatzes*. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, 1999.
- R. Brundiers, A. Lavie, T. Veit, J. Reinstein, I. Schlichting, N. Ostermann, R. S. Goody und M. Konrad. Modifying human thymidylate kinase to potentiate azidothymidine activation. *J. Biol. Chem.*, 274(50):35289–35292, 1999.
- W. O. Bullock, J. M. Fernandez und J. M. Short. XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *BioTechniques*, 5(4):376–379, 1987.
- G. W. Camiener. Studies of the enzymatic deamination of cytosine arabinoside. II. Properties of the deaminase of human liver. *Biochem. Pharmacol.*, 16(9):1681–9, 1967.
- G. W. Camiener und C. G. Smith. Studies of the enzymatic deamination of cytosine arabinoside. I. Enzyme distribution and species specificity. *Biochem. Pharmacol.*, 14(10):1405–16, 1965.
- F. Cedrone, A. Ménez und E. Quéméneur. Tailoring new enzyme functions by rational redesign. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10:405–10, 2000.
- G. G. Chabot, J. Bouchard und R. L. Momparler. Kinetics of deamination of 5-AZA-2'-deoxycytidine and cytosine arabinoside by human liver cytidine deaminase and its inhibition by 3-deazauridine, thymidine or uracil arabinoside. *Biochem. Pharmacol.*, 32(7):1327–8, 1983.
- H. Chen, S. B. Pai, S. J. Hurwitz, C. K. Chu, Y. Glazkova, H. M. McClure, M. Feitelson und R. F. Schinazi. Antiviral activity and pharmacokinetics of 1-(2,3-dideoxy-2-fluoro- β -L-glyceropent-2-enofuranosyl)cytosine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47(6):1922–8, 2003.
- E. G. Chottiner, D. S. Shewach, N. S. Datta, E. Ashcraft, D. Gribbin, D. Ginsburg, I. H. Fox und B. S. Mitchell. Cloning and expression of human deoxycytidine kinase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(4):1531–1535, 1991.
- J. Clos, J. T. Westwood, P. B. Becker, S. Wilson, K. Lambert und C. Wu. Molecular cloning and expression of a hexameric drosophila heat shock factor subject to negative regulation. *Cell*, 63(5):1085–97, 1990.

- T. Cooper, H. Kantarjian, W. Plunkett und V. Gandhi. Clofarabine in adult acute leukemias: clinical success and pharmacokinetics. *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*, 23(8-9):1417–23, 2004.
- D. Derossi, A. H. Joliot, G. Chassaing und A. Prochiantz. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.*, 269(14):10444–50, 1994.
- C. Dumontet, K. Fabianowska-Majewska, D. Mantincic, E. Callet Bauchu, I. Tigaud, V. Gandhi, M. Lepoivre, G. J. Peters, M. O. Rolland, D. Wyczechowska, X. Fang, S. Gazzo, D. A. Voorn, A. Vanier-Viornerly und J. MacKey. Common resistance mechanisms to deoxynucleoside analogues in variants of the human erythroleukaemic line K562. *Br. J. Haematol.*, 106(1):78–85, 1999.
- G. Elliott und P. O’Hare. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell*, 88(2):223–33, 1997.
- S. Eriksson, B. Munch-Petersen, K. Johansson und H. Eklund. Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 59(8):1327–46, 2002.
- S. Fawell, J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L. L. Chen, B. Pepinsky und J. Barsoum. TAT-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(2):664–8, 1994.
- M. F. Flajnik. Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents. *Nat. Rev. Immunol.*, 2(9):688–98, 2002.
- K. G. Ford, B. E. Souberbielle, D. Darling und F. Farzaneh. Protein transduction: an alternative to genetic intervention? *Gene Ther.*, 8(1):1–4, 2001.
- A. D. Frankel und C. O. Pabo. Cellular uptake of the TAT protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 55(6):1189–93, 1988.
- S. Futaki. Arginine-rich peptides: potential for intracellular delivery of macromolecules and the mystery of the translocation mechanisms. *Int. J. Pharm.*, 245(1-2):1–7, 2002.
- S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda und Y. Sugiura. Arginine-rich peptides. an abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.*, 276(8):5836–40, 2001.
- M. Gerstein und C. Chothia. Analysis of protein loop closure. Two types of hinges produce one motion in lactate dehydrogenase. *J. Mol. Biol.*, 220(1):133–49, 1991.
- M. Gerstein, A. M. Lesk und C. Chothia. Structural mechanisms for domain movements in proteins. *Biochemistry*, 33(22):6739–49, 1994.
- F. J. Giles, S. Faderl, D. A. Thomas, J. E. Cortes, G. Garcia-Manero, D. Douer, A. M. Levine, C. A. Koller, S. S. Jeha, S. M. O’Brien, E. H. Estey und H. M. Kantarjian. Randomized phase I/II study of troxacitabine combined with cytarabine, idarubicin, or topotecan in patients with refractory myeloid leukemias. *J. Clin. Oncol.*, 21(6):1050–6, 2003.

- S. C. Gill und P. H. Hippel. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, 182:319–326, 1989.
- H. Gourdeau, M. L. Clarke, F. Ouellet, D. Mowles, M. Selner, A. Richard, N. Lee, J. R. Mackey, J. D. Young, J. Jolivet, R. G. Lafreniere und C. E. Cass. Mechanisms of uptake and resistance to troxacitabine, a novel deoxycytidine nucleoside analogue, in human leukemic and solid tumor cell lines. *Cancer Res.*, 61(19):7217–24, 2001.
- S. Grant. Ara-C: cellular and molecular pharmacology. *Adv. Cancer Res.*, 72:197–233, 1998.
- R. Grunewald, J. L. Abbruzzese, P. Tarassoff und W. Plunkett. Saturation of 2',2'-difluorodeoxycytidine 5'-triphosphate accumulation by mononuclear cells during a phase I trial of gemcitabine. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 27(4):258–62, 1991.
- R. Grunewald, H. Kantarjian, M. Du, K. Faucher, P. Tarassoff und W. Plunkett. Gemcitabine in leukemia: a phase I clinical, plasma, and cellular pharmacology study. *J. Clin. Oncol.*, 10(3):406–13, 1992.
- K. L. Guan und J. E. Dixon. Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal. Biochem.*, 192(2):262–7, 1991.
- G. Gumina, Y. Chong, H. Choo, G. Y. Song und C. K. Chu. L-nucleosides: antiviral activity and molecular mechanism. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2(10):1065–86, 2002.
- R. S. Harris, J. E. Sale, S. K. Petersen-Mahrt und M. S. Neuberger. AID is essential for immunoglobulin V gene conversion in a cultured B cell line. *Curr. Biol.*, 12(5):435–8, 2002.
- S. Hatse, E. De Clercq und J. Balzarini. Role of antimetabolites of purine and pyrimidine nucleotide metabolism in tumor cell differentiation. *Biochem. Pharmacol.*, 58(4):539–55, 1999.
- V. Heinemann, Y. Z. Xu, S. Chubb, A. Sen, L. W. Hertel, G. B. Grindey und W. Plunkett. Cellular elimination of 2',2'-difluorodeoxycytidine 5'-triphosphate: a mechanism of self-potential. *Cancer Res.*, 52(3):533–9, 1992.
- R. B. Helling, H. M. Goodman und H. W. Boyer. Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J. Virol.*, 14(5):1235–44, 1974.
- A. Ho, S. R. Schwarze, S. J. Mermelstein, G. Waksman und S. F. Dowdy. Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential *in vitro* and *in vivo*. *J. Virol.*, 61(2):474–7, 2001.
- D. H. Ho. Distribution of kinase and deaminase of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine in tissues of man and mouse. *Cancer Res.*, 33(11):2816–20, 1973.
- S. N. Ho, H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen und L. R. Pease. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77(1):51–9, 1989.

- E. Hochuli. Purification of recombinant proteins with metal chelate adsorbent. *Genet. Eng. (NY)*, 12:87–98, 1990.
- P. Huang, S. Chubb, L. W. Hertel, G. B. Grindey und W. Plunkett. Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res.*, 51(22):6110–7, 1991.
- S. Ikeda, G. T. Ma und D. H. Ives. Heterodimeric deoxynucleoside kinases of *Lactobacillus acidophilus* R-26: functional assignment of subunits using limited proteolysis controlled by end-product inhibitors. *Biochemistry*, 33(17):5328–34, 1994.
- D. H. Ives und S. Ikeda. Life on the salvage path: the deoxynucleoside kinase of *Lactobacillus acidophilus* R-26. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 59:205–55, 1998.
- G. P. Jamieson, L. R. Finch, M. Snook und J. S. Wiley. Degradation of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine 5'-triphosphate in human leukemic myeloblasts and lymphoblasts. *Cancer Res.*, 47(12):3130–5, 1987.
- G. P. Jamieson, M. B. Snook und J. S. Wiley. Saturation of intracellular cytosine arabinoside triphosphate accumulation in human leukemic blast cells. *Leuk. Res.*, 14(5):475–9, 1990.
- K. Johansson, S. Ramaswamy, C. Ljungcrantz, W. Knecht, J. Piskur, B. Munch-Petersen, S. Eriksson und H. Eklund. Structural basis for substrate specificities of cellular deoxyribonucleoside kinases. *Nat. Struct. Biol.*, 8(7):616–20, 2001.
- M. Johansson und A. Karlsson. Differences in kinetic properties of pure recombinant human and mouse deoxycytidine kinase. *Biochem. Pharmacol.*, 50(2):163–8, 1995.
- M. Johansson, S. Brismar und A. Karlsson. Human deoxycytidine kinase is located in the cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(22):11941–11945, 1997.
- H. Kantarjian, V. Gandhi, J. Cortes, S. Verstovsek, M. Du, G. Garcia-Manero, F. Giles, S. Faderl, S. O'Brien, S. Jeha, J. Davis, Z. Shaked, A. Craig, M. Keating, W. Plunkett und E. J. Freireich. Phase II clinical and pharmacologic study of clofarabine in patients with refractory or relapsed acute leukemia. *Blood*, 102(7):2379–86, 2003.
- H. O. Karlstrom. Inability of *Escherichia coli* B to incorporate added deoxycytidine, deoxyadenosine, and deoxyguanosine into DNA. *Eur. J. Biochem.*, 17(1):68–71, 1970.
- S. Kewn, G. J. Veal, P. G. Hoggard, M. G. Barry und D. J. Back. Lamivudine (3TC) phosphorylation and drug interactions *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.*, 54(5):589–95, 1997.
- W. Knecht, G. E. Petersen, B. Munch-Petersen und J. Piskur. Deoxyribonucleoside kinases belonging to the thymidine kinase 2 (TK2)-like group vary significantly in substrate specificity, kinetics and feed-back regulation. *J. Mol. Biol.*, 315(4):529–40, 2002a.
- W. Knecht, M. P. Sandrini, K. Johansson, H. Eklund, B. Munch-Petersen und J. Piskur. A few amino acid substitutions can convert deoxyribonucleoside kinase specificity from pyrimidines to purines. *EMBO J.*, 21(7):1873–80, 2002b.

- W. Knecht, G. E. Petersen, M. P. Sandrini, L. Sondergaard, B. Munch-Petersen und J. Piskur. Mosquito has a single multisubstrate deoxyribonucleoside kinase characterized by unique substrate specificity. *Nucleic Acids Res.*, 31(6):1665–72, 2003.
- H. Kobayashi, S. Man, C. H. Graham, S. J. Kapitan, B. A. Teicher und R. S. Kerbel. Acquired multicellular-mediated resistance to alkylating agents in cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(8):3294–3298, 1993.
- D. E. Koshland. The key-lock theory and the induced fit theory. *Angewandte Chemie Intern. Edition*, 33(23-24):2375–2378, 1994.
- J. R. Kroep, W. J. Loves, C. L. van der Wilt, E. Alvarez, L. Talianidis, E. Boven, B. J. Braakhuis, C. J. van Groeningen, H. M. Pinedo und G. J. Peters. Pretreatment deoxycytidine kinase levels predict *in vivo* gemcitabine sensitivity. *Mol. Cancer Ther.*, 1(6):371–6, 2002.
- S. Kumar, B. Ma, C. J. Tsai, H. Wolfson und R. Nussinov. Folding funnels and conformational transitions via hinge-bending motions. *Cell Biochem. Biophys.*, 31(2):141–64, 1999.
- U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–5, 1970.
- A. Lavie, I. R. Vetter, M. Konrad, R. S. Goody, J. Reinstein und I. Schlichting. Structure of thymidylate kinase reveals the cause behind the limiting step in AZT activation. *Nat. Struct. Biol.*, 4(8):601–4, 1997.
- K. Lee, Y. Choi, E. Gullen, S. Schlueter-Wirtz, R. F. Schinazi, Y. C. Cheng und C. K. Chu. Synthesis and anti-HIV and anti-HBV activities of 2'-fluoro-2', 3'-unsaturated L-nucleosides. *J. Med. Chem.*, 42(7):1320–8, 1999.
- A. M. Lesk und C. Chothia. Mechanisms of domain closure in proteins. *J. Mol. Biol.*, 174(1):175–91, 1984.
- M. Lindgren, M. Hallbrink, A. Prochiantz und U. Langel. Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol. Sci.*, 21(3):99–103, 2000.
- J. Y. Liou, G. E. Dutschman, W. Lam, Z. Jiang und Y. C. Cheng. Characterization of human UMP/CMP kinase and its phosphorylation of D- and L-form deoxycytidine analogue monophosphates. *Cancer Res.*, 62(6):1624–31, 2002.
- J. Y. Liou, P. Krishnan, C. C. Hsieh, G. E. Dutschman und Y. C. Cheng. Assessment of the effect of phosphorylated metabolites of anti-human immunodeficiency virus and anti-hepatitis B virus pyrimidine analogs on the behavior of human deoxycytidylate deaminase. *Mol. Pharmacol.*, 63(1):105–10, 2003.
- K. Lotfi, E. Mansson, T. Spasokoukotskaja, B. Pettersson, J. Liliemark, C. Peterson, S. Eriksson und F. Albertioni. Biochemical pharmacology and resistance to 2-chloro-2'-arabino-fluoro-2'-deoxyadenosine, a novel analogue of cladribine in human leukemic cells. *Clin. Cancer Res.*, 5(9):2438–44, 1999.

- H. Mandel, R. Szargel, V. Labay, O. Elpeleg, A. Saada, A. Shalata, Y. Anbinder, D. Berkowitz, C. Hartman, M. Barak, S. Eriksson und N. Cohen. The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat. Genet.*, 29(3):337–41, 2001.
- J. P. Manis, M. Tian und F. W. Alt. Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol.*, 23(1):31–9, 2002.
- E. Mansson, E. Flordal, J. Liliemark, T. Spasokoukotskaja, H. Elford, S. Lagercrantz, S. Eriksson und F. Albertioni. Down-regulation of deoxycytidine kinase in human leukemic cell lines resistant to cladribine and clofarabine and increased ribonucleotide reductase activity contributes to fludarabine resistance. *Biochem. Pharmacol.*, 65(2):237–47, 2003.
- B. Miroux und J. E. Walker. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.*, 260(3):289–98, 1996.
- K. L. Morley und R. J. Kazlauskas. Improving enzyme properties: when are closer mutations better? *Trends Biotechnol.* 23(5):231-37, 2005.
- M. C. Morris, J. Depollier, J. Mery, F. Heitz und G. Divita. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat. Biotechnol.*, 19(12):1173–6, 2001.
- W. E. Muller und R. K. Zahn. Metabolism of 1- β -D-arabinofuranosyluracil in mouse L5178Y cells. *Cancer Res.*, 39(3):1102–7, 1979.
- H. J. Muller-Dieckmann und G. E. Schulz. The structure of uridylylate kinase with its substrates, showing the transition state geometry. *J. Mol. Biol.*, 236(1):361–7, 1994.
- H. J. Muller-Dieckmann und G. E. Schulz. Substrate specificity and assembly of the catalytic center derived from two structures of ligated uridylylate kinase. *J. Mol. Biol.*, 246(4):522–30, 1995.
- B. H. Muller, C. Lamoure, M.-H. Le Du, L. Cattolico, E. Lajeunesse, F. Lemaitre, A. Pearson, F. Ducancel, A. Ménez und J. C. Boulain. Improving *Escherichia coli* alkaline phosphatase efficacy by additional mutations inside and outside the catalytic pocket. *Chembiochem*, 2(7-8):517-523, 2001.
- B. Munch-Petersen, L. Cloos, G. Tyrsted und S. Eriksson. Diverging substrate specificity of pure human thymidine kinases 1 and 2 against antiviral dideoxynucleosides. *J. Biol. Chem.*, 266(14):9032–8, 1991.
- B. Munch-Petersen, J. Piskur und L. Sondergaard. Four deoxynucleoside kinase activities from *Drosophila melanogaster* are contained within a single monomeric enzyme, a new multifunctional deoxynucleoside kinase. *J. Biol. Chem.*, 273(7):3926–31, 1998.
- M. Muramatsu, K. Kinoshita, S. Fagarasan, S. Yamada, Y. Shinkai und T. Honjo. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, 102(5):553–63, 2000.

- J. Neuhard und R. A. Kelln. Biosynthesis and conversion of pyrimidines. In *Escherichia coli and Salmonella*, Seite 580–99. American Society for Microbiology, 1996.
- A. Nishimura, M. Morita, Y. Nishimura und Y. Sugino. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res.*, 18 (20):6169, 1990.
- P. Nygaard. On the role of cytidine deaminase in cellular metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 195:415–20, 1986.
- N. Onetto, R. L. Momparler, L. F. Momparler und M. Gyger. *In vitro* biochemical tests to evaluate the response to therapy of acute leukemia with cytosine arabinoside or 5-AZA-2'-deoxycytidine. *Semin. Oncol.*, 14(2 Suppl 1):231–7, 1987.
- N. Ostermann, I. Schlichting, R. Brundiers, M. Konrad, J. Reinstein, T. Veit, R. S. Goody und A. Lavie. Insights into the phosphoryltransfer mechanism of human thymidylate kinase gained from crystal structures of enzyme complexes along the reaction coordinate. *Structure Fold. Des.*, 8(6):629–42, 2000.
- N. Ostermann, D. Segura-Pena, C. Meier, T. Veit, C. Monnerjahn, M. Konrad und A. Lavie. Structures of human thymidylate kinase in complex with prodrugs: implications for the structure-based design of novel compounds. *Biochemistry*, 42(9): 2568–77, 2003.
- C. Pasti, S. Gallois-Montbrun, H. Munier-Lehmann, M. Veron, A. M. Gilles und D. Deville-Bonne. Reaction of human UMP-CMP kinase with natural and analog substrates. *Eur. J. Biochem.*, 270(8):1784–1790, 2003.
- P. Pham, R. Bransteitter und M. F. Goodman. Reward versus risk: DNA cytidine deaminases triggering immunity and disease. *Biochemistry*, 44(8):2703–15, 2005.
- A. Phelan, G. Elliott und P. O'Hare. Intercellular delivery of functional p53 by the herpesvirus protein VP22. *Nat. Biotechnol.*, 16(5):440–3, 1998.
- J. Piskur, M. P. B. Sandrini, W. Knecht und B. Munch-Petersen. Animal deoxyribonucleoside kinases: 'forward' and 'retrograde' evolution of their substrate specificity. *FEBS Lett.*, 560(1-3):3–6, 2004.
- W. Plunkett, J. O. Liliemark, T. M. Adams, B. Nowak, E. Estey, H. Kantarjian und M. J. Keating. Saturation of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine 5'-triphosphate accumulation in leukemia cells during high-dose 1- β -D-arabinofuranosylcytosine therapy. *Cancer Res.*, 47(11):3005–11, 1987.
- A. Prochiantz. Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12(4):400–6, 2000.
- M. Ranson und M. X. Sliwkowski. Perspectives on anti-HER monoclonal antibodies. *Oncology*, 63 Suppl 1:17–24, 2002.
- P. Reichard. Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.*, 57:349–74, 1988.

- P. Reichard und A. Ehrenberg. Ribonucleotide reductase – a radical enzyme. *Science*, 221(4610):514–9, 1983.
- D. G. Rhoads und J. M. Lowenstein. Initial velocity and equilibrium kinetics of myokinase. *J. Biol. Chem.*, 243(14):3963–72, 1968.
- A. Saada, A. Shaag, H. Mandel, Y. Nevo, S. Eriksson und O. Elpeleg. Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat. Genet.*, 29(3):342–4, 2001.
- A. Saada-Reisch. Deoxyribonucleoside kinases in mitochondrial DNA depletion. *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*, 23(8-9):1205–15, 2004.
- E. Sabini, S. Ort, C. Monnerjahn, M. Konrad und A. Lavie. Structure of human dCK suggests strategies to improve anticancer and antiviral therapy. *Nat. Struct. Biol.*, 10(7):513–9, 2003.
- J. Sambrook, E. E. Fritsch und T. Maniatis. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbour, New York, USA, 1989.
- G. Sarkar und S. S. Sommer. The megaprimer method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques*, 8(4):404–7, 1990.
- S. Schaertl, M. Konrad und M. A. Geeves. Substrate specificity of human nucleoside-diphosphate kinase revealed by transient kinetic analysis. *J. Biol. Chem.*, 273(10):5662–9, 1998.
- K. Scheffzek, W. Kliche, L. Wiesmuller und J. Reinstein. Crystal structure of the complex of UMP/CMP kinase from *Dictyostelium discoideum* and the bisubstrate inhibitor P1-(5'-adenosyl) P5-(5'-uridyl) pentaphosphate (UP5A) and Mg²⁺ at 2.2 Å: implications for water-mediated specificity. *Biochemistry*, 35(30):9716–27, 1996.
- I. Schlichting und J. Reinstein. Structures of active conformations of UMP kinase from *Dictyostelium discoideum* suggest phosphoryl transfer is associative. *Biochemistry*, 36(31):9290–6, 1997.
- G. E. Schulz, C. W. Muller und K. Diederichs. Induced-fit movements in adenylate kinases. *J. Mol. Biol.*, 213(4):627–30, 1990.
- S. R. Schwarze und S. F. Dowdy. *In vivo* protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. *Trends Pharmacol. Sci.*, 21(2):45–8, 2000.
- D. Segura-Pena, N. Sekulic, S. Ort, M. Konrad und A. Lavie. Substrate-induced conformational changes in human UMP/CMP kinase. *J. Biol. Chem.*, 279(32):33882–9, 2004.
- N. Sekulic, L. Shuvalova, O. Spangenberg, M. Konrad und A. Lavie. Structural characterization of the closed conformation of mouse guanylate kinase. *J. Biol. Chem.*, 277(33):30236–43, 2002.
- D. S. Shewach, K. K. Reynolds und L. Hertel. Nucleotide specificity of human deoxycytidine kinase. *Mol. Pharmacol.*, 42(3):518–24, 1992.

- S. M. Simon und M. Schindler. Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(9):3497–3504, 1994.
- D. J. Slamon, W. Godolphin, L. A. Jones, J. A. Holt, S. G. Wong, D. E. Keith, W. J. Levin, S. G. Stuart, J. Udove und A. Ullrich. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244(4905):707–12, 1989.
- D. B. Smith und K. S. Johnson. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 67(1):31–40, 1988.
- J. Spychala, N. S. Datta, K. Takabayashi, M. Datta, I. H. Fox, T. Gribbin und B. S. Mitchell. Cloning of human adenosine kinase cDNA: sequence similarity to microbial ribokinases and fructokinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(3):1232–7, 1996.
- C. D. Steuart und P. J. Burke. Cytidine deaminase and the development of resistance to arabinosyl cytosine. *Nat. New Biol.*, 233(38):109–10, 1971.
- F. W. Studier, A. H. Rosenberg, J. J. Dunn und J. W. Dubendorff. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.*, 185:60–89, 1990.
- N. N. Suzuki, K. Koizumi, M. Fukushima, A. Matsuda und F. Inagaki. Structural basis for the specificity, catalysis, and regulation of human uridine-cytidine kinase. *Structure*, 12(5):751–764, 2004.
- C. A. Townsley, K. Chi, D. S. Ernst, K. Belanger, I. Tannock, G. A. Bjarnason, D. Stewart, R. Goel, J. D. Ruether, L. L. Siu, J. Jolivet, L. McIntosh, L. Seymour und M. J. Moore. Phase II study of troxacitabine (BCH-4556) in patients with advanced and/or metastatic renal cell carcinoma: a trial of the National Cancer Institute of Canada-Clinical Trials Group. *J. Clin. Oncol.*, 21(8):1524–9, 2003.
- T. W. Traut. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol. Cell. Biochem.*, 140(1):1–22, 1994.
- Z. Vajo und W. C. Duckworth. Genetically engineered insulin analogs: diabetes in the new millenium. *Pharmacol. Rev.*, 52(1):1–9, 2000.
- C. J. van Moorsel, G. J. Peters und H. M. Pinedo. Gemcitabine: Future prospects of single-agent and combination studies. *Oncologist*, 2(3):127–134, 1997.
- A. R. Van Rompay, M. Johansson und A. Karlsson. Phosphorylation of deoxycytidine analog monophosphates by UMP-CMP kinase: molecular characterization of the human enzyme. *Mol. Pharmacol.*, 56(3):562–9, 1999.
- A. R. Van Rompay, M. Johansson und A. Karlsson. Phosphorylation of nucleosides and nucleoside analogs by mammalian nucleoside monophosphate kinases. *Pharmacol. Ther.*, 87(2-3):189–98, 2000.
- A. R. Van Rompay, M. Johansson und A. Karlsson. Substrate specificity and phosphorylation of antiviral and anticancer nucleoside analogues by human deoxyribonucleoside kinases and ribonucleoside kinases. *Pharmacol. Ther.*, 100(2):119–39, 2003.
- J. P. Vartanian, P. Sommer und S. Wain-Hobson. Death and the retrovirus. *Trends Mol. Med.*, 9(10):409–13, 2003.

- M. J. Veuger, M. W. Honders, J. E. Landegent, R. Willemze und R. M. Barge. High incidence of alternatively spliced forms of deoxycytidine kinase in patients with resistant acute myeloid leukemia. *Blood*, 96(4):1517–24, 2000.
- M. J. Veuger, M. H. Heemskerk, M. W. Honders, R. Willemze und R. M. Barge. Functional role of alternatively spliced deoxycytidine kinase in sensitivity to cytarabine of acute myeloid leukemic cells. *Blood*, 99(4):1373–80, 2002.
- S. Vincenzetti, A. Cambi, J. Neuhard, E. Garattini und A. Vita. Recombinant human cytidine deaminase: expression, purification and characterization. *Protein Expr. Purif.*, 8(2):247–53, 1996.
- S. Vincenzetti, A. Cambi, J. Neuhard, K. Schnorr, M. Grelloni und A. Vita. Cloning, expression, and purification of cytidine deaminase from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Expr. Purif.*, 8(2):247–53, 1999.
- C. Vonrhein, G. J. Schlauderer und G. E. Schulz. Movie of the structural changes during a catalytic cycle of nucleoside monophosphate kinases. *Structure*, 3(5):483–90, 1995.
- J. Wang, D. Choudhury, J. Chattopadhyaya und S. Eriksson. Stereoisomeric selectivity of human deoxyribonucleoside kinases. *Biochemistry*, 38(51):16993–9, 1999.
- P. Warren, W. Song, E. Holle, L. Holmes, Y. Wei, J. Li, T. Wagner, X. Yu. Combined HSV-TK/GCV and secondary lymphoid tissue chemokine gene therapy inhibits tumor growth and elicits potent antitumor CTL response in tumor-bearing mice. *Anticancer Res.*, 22(2A):599–604, 2002.
- J. E. Wedekind, G. S. Dance, M. P. Sowden und H. C. Smith. Messenger RNA editing in mammals: new members of the APOBEC family seeking roles in the family business. *Trends Genet.*, 19(4):207–216, 2003.
- J. C. White und R. L. Capizzi. A critical role for uridine nucleotides in the regulation of deoxycytidine kinase and the concentration dependence of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine phosphorylation in human leukemia cells. *Cancer Res.*, 51(10):2559–65, 1991.
- L. Wiesmuller, K. Scheffzek, W. Kliche, R. S. Goody, A. Wittinghofer und J. Reinstein. Crystallization and preliminary X-ray analysis of UMP/CMP-kinase from *Dictyostelium discoideum* with the specific bisubstrate inhibitor P1-(adenosine 5′)-P5-(uridine 5′)-pentaphosphate (UP5A). *FEBS Lett.*, 363(1-2):22–4, 1995.
- K. Wild, T. Bohner, G. Folkers und G. E. Schulz. The structures of thymidine kinase from herpes simplex virus type 1 in complex with substrates and a substrate analogue. *Protein Sci.*, 6(10):2097–106, 1997.
- H. Yan und M. D. Tsai. Nucleoside monophosphate kinases: structure, mechanism, and substrate specificity. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 73:103–34, 1999.
- K. Yazawa, W. E. Fisher und F. C. Brunicardi. Current progress in suicide gene therapy for cancer. *World J. Surg.*, 26(7):783–89, 2002.
- H. Zalkin und P. Nygaard. Biosynthesis of purine nucleotides. In *Escherichia coli and Salmonella*, Seite 561–79. American Society for Microbiology, 1996.

C Danksagung

Herrn Dr. Manfred Konrad danke ich für die Überlassung des Arbeitsthemas, seine stete Diskussionsbereitschaft und die Freiheiten bei der Durchführung der Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. Gallwitz möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und seine Unterstützung danken.

Herrn PD Dr. Irniger danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Bei Herrn Dr. Arnon Lavie möchte ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit bei der Aufklärung der Kristallstrukturen bedanken. Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Lavie, Elisabetta Sabini, Dario Segura-Pena und Michael Godsey für die Zusammenarbeit und den regen Ideenaustausch.

Herrn Dr. Gilles Divita danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die Möglichkeit, die Zellkulturexperimente in seinem Labor durchzuführen.

Bei Herrn Dr. Thomas Heimbürg möchte ich mich für die Einführung in die Kalorimetrie bedanken.

Ein großer Dank geht an die jetzigen und ehemaligen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Konrad, Wei Cun, Christian, Ingo, Robin, David und Martin für die hervorragende Zusammenarbeit.

Bei allen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und die Hilfe im Laboralltag bedanken.

Danken möchte ich auch Bea, Kirsten, Bernd, Michi und Jan für das Korrekturlesen des Manuskriptes und die große Unterstützung während der Endphase.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium der Biologie ermöglichten.

D Lebenslauf

Geburtsdatum, Ort: 12.03.1974, Witzenhausen

Staatsangehörigkeit: deutsch

1980-1984 Grundschole Bad Sooden-Allendorf

1985-1986 Förderstufe Bad Sooden-Allendorf

1987-1993 Gymnasium an der Rhenanusschule Bad Sooden-Allendorf

1993 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

1993-1994 Zivildienst

Okt. 1994 Studium der Biologie (Diplom) an der Georg-August-Universität Göttingen

Okt.1996 Vordiplom

Aug. 1997-Jul. 1998 Auslandsjahr an der University of California Santa Cruz, USA (EAP Program 3 Quarters)

Nov. 1999-Okt. 2000 Diplomarbeit: „Analyse der Dimerisierungseigenschaften von tHisF mit dem ToxR Indikatorsystem“ am Institut für Mikrobiologie und Genetik, Abteilung Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie bei Herrn Prof. Dr. H.-J. Fritz.

Jan. 2001 Beginn Promotion am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Abt. Molekulare Genetik bei Herrn Prof. Dr. D. Gallwitz.