Röntgenkristallographische Untersuchungen von Inhibitor-Komplexen der Proteinkinase A und der Kinasedomäne von Src



Dissertation

Christine Brigitte Breitenlechner

Max-Planck-Institut für Biochemie Abteilung Strukturforschung Max-Planck-Institut für Biochemie Abteilung Strukturforschung

Röntgenkristallographische Untersuchungen von Inhibitor-Komplexen der Proteinkinase A und der Kinasedomäne von Src

Christine Brigitte Breitenlechner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	UnivProf. Dr. W. Hiller
Prüfer der Dissertation:	1. apl. Prof. Dr. Dr. h.c. R. Huber
	2. UnivProf. Dr. J. Buchner
	3. apl. Prof. Dr. GB. Kresse, Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 26.03.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 05.05.2004 angenommen.

Veröffentlichungen, die Teile dieser Arbeit beinhalten

Breitenlechner, C.B., Wegge, T., Berillon, L., Graul, K., Marzenell, K., Friebe, W.-G., Thomas, U., Schumacher, R., Huber, R., Engh, R. A., and Masjost, B. (2004) "Structure-based optimization of novel azepane derivatives as PKB inhibitors". J. Med. Chem. 47, 1375-1390.

Breitenlechner, C., Gaßel, M., Hidaka, H., Kinzel, V., Huber, R., Engh, R. A. and Bossemeyer, D. (2003). "Protein kinase A in complex with Rho-kinase inhibitors Y-27632, fasudil, and H-1152P. Structural basis of selectivity." <u>Structure</u> **11**, 1595-1607.

Gaßel, M., Breitenlechner, C. B., Rüger, P., Jucknischke, U., Schneider, T., Huber, R., Bossemeyer, D. and Engh, R. A. (2003). "Mutants of protein kinase A that mimic the ATP-binding site of protein kinase B (AKT)." J. Mol. Biol. **329**, 1021-1034.

Seifert, M. H., Breitenlechner, C. B., Bossemeyer, D., Huber, R., Holak, T. A. and Engh, R. A. (2002). "Phosphorylation and flexibility of cyclic-AMP-dependent protein kinase (PKA) using 31P NMR spectroscopy." Biochemistry **41**, 5968-5977

Breitenlechner, C., Engh, R.A., Huber, R., Kinzel, V., Bossemeyer, D., and Gaßel, M. (2004). "The Typically Disordered N-Terminus of PKA Can Fold as A Helix and Project the Myristoylation Site into Solution" <u>Biochemistry</u>, *in press*

Gaßel, M., Breitenlechner, C. B., König, N., Huber, R., Engh, R. A., Bossemeyer, D. (2004). "The Protein Kinase C Inhibitor Bisindolyl-maleimide II Binds with Reversed Orientations to Different Conformations of PKA". J. Biol. Chem, *in press*

Breitenlechner, C., Gaßel, M., Engh, R. A., Bossemeyer, D. "Structural Insights into AGC kinase inhibition". <u>Oncology Research</u>, *in press*

Gaßel, M., Breitenlechner, C., Herrero, S., Engh, R. A., Bossemeyer, D. (2004). "Inhibitors of PKA and related protein kinases" <u>Handbook of Experimental Pharmacology</u> [Inhibitors of Protein Kinases and Protein Phophatases]. Heidelberg, Springer Verlag, Heidelberg, *in press*

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2001 bis März 2003 in der Abteilung Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Robert Huber möchte ich für die wissenschaftliche Freiheit und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und die hervorragenden wissenschaftlichen und technischen Bedingungen in der Abteilung danken.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. Richard Engh für die gute Betreuung, die interessanten Projekte, die Einführung in die Kristallographie, sein Vertrauen in meine Arbeit und die hilfreichen Diskussionen und Gespräche.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Dirk Bossemeyer und Herrn. Dr. Michael Gassel vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg, für die jahrelange gute und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Ich danke allen Mitarbeitern und Kollegen der Firma Roche Diagnostics GmbH (Pharma Research), besonders Frau Dr. Birgit Masjost und dem gesamten PKB-Projekteam, sowie Herrn Dr. Konrad Honold und dem Projekteam. Insbesondere möchte ich mich für die Bereitstellung von Protein, die Hilfe bei enzymatischen Assays, die gute Zusammenarbeit und das Interesse an meinen Ergebnissen bedanken.

Allen Freunden und Kollegen hier am Max-Plank-Institut möchte ich, ohne sie namentlich aufzuführen, für die freundliche und hilfsbereite Atmosphäre im Labor danken.

Frau Lissy Weyher-Stingl danke ich für die Hilfe bei analytischen Methoden, der Massenspektrometrie und ITC.

Danken möchte ich auch Renate Rüller, Monika Bumann und Monika Schneider, sowie Werner Dersch und Otmar Paul für die Unterstützung bei bürokratischen und technischen Problemen.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie und Stefan danken, die immer für mich da waren, wenn ich sie gebraucht habe, und mich stets unterstützt haben.

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
Abl	Abelson Kinase
AGC-Familie	Proteinkinase A, G und C beinhaltende Familie
Akt	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog, auch Proteinkinase B (PKB)
AMP-PNP	Adenosin-5'-(β,γ-imido)triphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Blk	B lymphoid tyrosine kinase
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
c-CBL	CBL E3 ubiquitin protein ligase, Signal transduction protein CBL, Proto-Oncogen c-CBL
CCP4	Collaborative Computing Project Number 4
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
Chk1	Serin/Threonin Proteinkinase Chk1
CSA	chemical shift anisotropy
CSK	C-terminale Src Kinase
C-terminal	Carboxyterminal
DESY	Deutsches Elektronensynchrotron
DLS	Dynamic Light Scattering
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia Coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
EtOH	Ethanol
FAK	focal adhesion kinase
FP	Fluoreszenzpolarisation
Frk	fyn-related kinase
Fyn	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase FYN
GSK-3	Glycogensynthasekinase-3
h	Stunden
Hck	Tyrosine-protein kinase HCK, hemopoietic cell kinase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HM	hydrophobes Motiv
IPTG	Isopropyl-β-thiogalaktopyranosid
IRK	insulin receptor kinase, insulin receptor tyrosine kinase domain
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
Lck	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
Lyn	Tyrosine-protein kinase LYN
М	Molar (mol/l)
MEGA-8	N-octanoyl-N-methylglucamin
MeOH	Methanol
MKK2	MAP kinase-activated protein kinase 2, MAPKAPK-2
min	Minuten
n. b.	nicht bestimmt
NCS	non crystallographic symmetry
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance

N-terminal	aminoterminal
OD^{600}	Optische Dichte bei der Wellenlänge 600nm
p130Cas	p130Cas, CRK-associated substrate, Breast cancer anti-estrogen resistance 1 protein
p27	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)
p38 MAP kinase	Mitogen-activated protein kinase p38
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PDK1	Pyruvate dehydrogenase kinase isoform1
PEG	Polyethylenglycol
PH Domäne	plekstrin homology domain
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
РКА	Proteinkinase A, cAMP-abhängige Proteinkinase
PKAB2	PKA-Mutante Val123Ala, Leu173Met
PKAB3	PKA-Mutante Val123Ala, Leu173Met, Gln181Lys
PKAB4	PKA-Mutante Gln84Glu, Val123Ala, Leu173Met, Phe187Leu
PKAB5	PKA-Mutante Gln84Glu, Val123Ala, Leu173Met, Gln181Lys, Phe187Leu
РКВ	Proteinkinase B, Akt
РКС	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PKI	Proteinkinase-Inhibitor, Fragment PKI(5-24)
PRK2	protein-kinase C-related protein kinase
PTB	phosphotyrosine binding
PTK	Protein Tyrosinkinase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S/T-K	Serin/Threonin-Kinase
S6K1	p70 ribosomal protein S6 kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2 Domäne	Src homology 2 Domäne
SH3 Domäne	Src homology 3 Domäne
SLS	Swiss Light Source
Src	human Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src, p60-Src, c-Src
Tris	N-Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Yes	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase YES

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG1	l

2 E	INLEITUNG	2
2.1	Proteinkinasen	2
2.1.1 2.1.2	Flexibilität von Kinasen Regulationsmechanismen	
2.2	Proteinkinase A	6
2.2.1	Proteinkinase A und ihre Regulation	6
2 2 2 2 2	2.2.1.1Die katalytische Untereinheit (PKA).2.2.1.2R-Untereinheiten2.2.1.3Ankerproteine (AKAPs).2.2.1.4Proteinkinase-Inhibitor PKI.	
2.2.2	Struktur der katalytischen Untereinheit von PKA	8
2 2 2 2 2	2.2.2.1Kinasedomäne mit konservierten Elementen2.2.2.2Phosphorylierungsstellen2.2.2.3N-terminales Segment und Helix A2.2.2.4C-Terminus und hydrophobes Motiv	
2.2.3	ATP-Bindung und Katalysemechanismus	
2.3	Src	
2.3.1 2.3.2 2.3.3 2.3.4 2.3.5 2.3.6 2.3.7 2.3.8 2.3.9	Historisches und Einführung Src und Signaltransduktion Aufbau Struktur von Src Regulation durch SH2 und SH3 Domäne Zelluläre Lokalisation Inhibitoren und Aktivatoren von Src Src und Krebs Src Inhibitoren in der Therapie	
2.4	Kinase-Inhibitoren	
2.4.1 2.4.2 2.4.3	Enzymkinetik der Inhibition Ligandenbindung Kinase-Inhibitoren als Targets in der pharmazeutischen Forschung	22 23 23
2.5	Kristallographie und Röntgenstrukturanalyse	
2.6	Ziele und Inhalte der Arbeit	

N	I ATERI	AL UND METHODEN	. 26
3.1	Materi	al	. 26
3.1.1	l Chen	nikalien	26
3.1.2	2 Verb	rauchsmaterialien	26
3.1.3	3 Inhib	itoren	26
3.1.4	4 Pepti	de	26
3.1.5	5 Gerät	te	27
3.1.6	5 Puffe	r, Lösungen und Nährmedien	27
3.1.7	7 Bakte	erienstämme und Plasmide	28
3.2	Metho	den	. 28
3.2.1	l Mole	kularbiologische Methoden	28
3.2.2	2 Expre	ession in <i>E. coli</i> Stämmen	28
3.2.3	3 Trans	sformation chemisch kompetenter Zellen	29
3.2.4	4 Kulti	vierung transformierter Zellen	29
3.2.5	5 Zella	ufschluss	29
3.2.6	6 Reini	gung von PKA	30
	3.2.6.1	Affinitätschromatographie	30
	3.2.6.2	Ionenaustauschchromatographie	30
3.2.7	7 Elekt	rophorese (SDS-PAGE)	30
3.2.8	8 Prote	inbestimmung	30
	3.2.8.1	Proteinbestimmung nach Bradford	30
	3.2.8.2	Proteinbestimmung mit dem Absorptionskoeffizienten	31
3.2.9	Here Krist	allisation	31
3.2.1	10 X-ray	v, Datensammlung	31
3.2.1	11 Struk	turlösung und Verfeinerung	32
3.2.1	12 Grap	hische Darstellung	32
3.2.1	13 IC ₅₀ -1	Bestimmung mittels FP-Assay	32
3.2.1	14 Besti	mmung von Bindungskonstanten mittels ITC (Isothermal Titration Calorimetry)	. 33
3.2.1	15 DLS	(Dynamic Light Scattering)	34
3.2.1	16^{-31} P-N	MR-Untersuchungen	34

4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION - PROTEINKINASE A	35
4.1	Strukturbestimmung von Proteinkinase A–Inhibitor–Komplexen	
4.1	.1 Expression und Reinigung	
4.1	.2 Kristallisation	
4.1	 ERGEBNISSE UND DISKUSSION - PROTEINKINASE A Strukturbestimmung von Proteinkinase A–Inhibitor–Komplexen 4.1.1 Expression und Reinigung 4.1.2 Kristallisation 4.1.3 Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung 4.1.4 Enzymkinetik, IC₅₀-Bestimmung und K_i-Bestimmung Kokristallstrukturen von Rho-Kinase-Inhibitoren und PKA: Y-27632, H 1077 und H-1152P 4.2.1 Allgemeine Struktur 4.2.2 Offene und geschlossene Konformation 4.2.3 Inhibitoren in der ATP-Bindetasche 4.2.4 Analyse der Bindung von HA-1077 an PKA 	
4.1	.4 Enzymkinetik, IC ₅₀ -Bestimmung und K _i -Bestimmung	
4.2	Kokristallstrukturen von Rho-Kinase-Inhibitoren und PKA: Y-27632, 1077 und H-1152P	HA- 38
4.2	2.1 Allgemeine Struktur	
4.2	2.2 Offene und geschlossene Konformation	
4.2	2.3 Inhibitoren in der ATP-Bindetasche	

4.2.5	Analyse der Bindung von H-1152P an PKA	44
4.2.6	Zweite Bindestelle von H-1152P	45
4.2.7	Analyse der Bindung von Y-27632 an PKA	46
4.2.8	Bindung der Inhibitoren im Vergleich	47
4.2.9	Vergleich zu Rho-Kinase	49
4.3	Strukturen von PKA und PKAB-Mutanten im Komplex mit Balanolderiva	aten
		51
4.3.1	Einleitung	51
4.3.2	Plasmastabile Derivate durch Ersatz des Esterlinkers	55
4	2.2.1 Analyse der Struktur des DVA D01 Kompleyes	56
4	3.2.1 Analyse del Siluktul des FRA-Rol-Rollpiexes	50 58
4	3.2.2 Dindung und Dindungsammaten von Eurer-, Amm-, und vinyiden vat 3.2.3 Vergleich zum natürlichen Balanol	60
4	3.2.4 Vergleich der Komplexe von R02 und R03 mit PKA und PKAB2.	61
4 2 2		()
4.3.3	Ernonte Affinitat zu PKB durch Austausch des Phenois gegen Pyridin	62
4.5.4	Selektivität für DKB durch räumlich anspruchsvolle Benzonhenon Substituenten	00 60
4.3.3	Selektivität für FKB durch faumnen anspruchsvone Benzophenon-Substituenten	09
4	3.5.1 Kokristallstrukturen von R23 mit PKA und PKAB5	71
4	3.5.2 Kokristallstrukturen von R31 mit PKA und PKAB4	72
4	3.5.3 Kokristallstruktur von R32 (Piperidin) und PKA	74
4	3.5.4 Kokristallstruktur von R33 (m-Dimethyl-Piperidin) und PKA	75
4	3.5.5 Kokristallstruktur von R34 (p-Dimethyl-Piperidin) und PKA	76
4	3.5.6 Zusammenfassung und Vergleich	7/6
4.3.6	Ersatz des Azepanrings	77
4.3.7	Zusammenfassung	79
4.4	Strukturen von PKA und PKAB-Mutanten im Komplex mit	
	Bisindolvlmaleimiden	80
4.5	Staultan das Komplanas von BKA und Mr ADD	02
4.5	Struktur des Komplexes von PKA und MIADP	83
4.5.1	Nucleotid-Bindung	
452	-	84
т.Э.2	Bindung/Koordination von Mn	84 85
4.5.3	Bindung/Koordination von Mn Glycinloop	84 85 86
4.5.3 4.5.4	Bindung/Koordination von Mn Glycinloop Katalytischer Loop und Peptidbindestelle	84 85 86 86
4.5.2 4.5.3 4.5.4 4.5.5	Bindung/Koordination von Mn Glycinloop Katalytischer Loop und Peptidbindestelle C-Terminus	84 85 86 86 87
4.5.2 4.5.3 4.5.4 4.5.5 4.5.6 4.5.7	Bindung/Koordination von Mn Glycinloop Katalytischer Loop und Peptidbindestelle C-Terminus Synergistische Bindung von PKI und ATP Katalytischer Zuklus	84 85 86 86 87 87
4.5.2 4.5.3 4.5.4 4.5.5 4.5.6 4.5.7	Bindung/Koordination von Mn Glycinloop Katalytischer Loop und Peptidbindestelle C-Terminus Synergistische Bindung von PKI und ATP Katalytischer Zyklus	84 85 86 86 87 87 87
4.5.2 4.5.3 4.5.4 4.5.5 4.5.6 4.5.7 4.6	Bindung/Koordination von Mn Glycinloop Katalytischer Loop und Peptidbindestelle C-Terminus Synergistische Bindung von PKI und ATP Katalytischer Zyklus ⁵¹ P-NMR-Untersuchungen zur Flexibilität der Phosphatgruppen	84 85 86 86 87 87 87 87
4.5.2 4.5.3 4.5.4 4.5.5 4.5.6 4.5.7 4.6 4.6.1	Bindung/Koordination von Mn Glycinloop Katalytischer Loop und Peptidbindestelle C-Terminus Synergistische Bindung von PKI und ATP Katalytischer Zyklus ^T P-NMR-Untersuchungen zur Flexibilität der Phosphatgruppen Signalzuordnung	84 85 86 86 87 87 87 87 88
4.5.2 4.5.3 4.5.4 4.5.5 4.5.6 4.5.7 4.6 4.6.1 4.6.2	Bindung/Koordination von Mn Glycinloop Katalytischer Loop und Peptidbindestelle C-Terminus Synergistische Bindung von PKI und ATP Katalytischer Zyklus ⁵¹ P-NMR-Untersuchungen zur Flexibilität der Phosphatgruppen Signalzuordnung ³¹ P-Relaxation zur Bestimmung der Flexibilität	84 85 86 86 87 87 87 87 87 88 88 88
4.5.2 4.5.3 4.5.4 4.5.5 4.5.6 4.5.7 4.6 4.6.1 4.6.2 4.6.3	Bindung/Koordination von Mn Glycinloop Katalytischer Loop und Peptidbindestelle C-Terminus Synergistische Bindung von PKI und ATP Katalytischer Zyklus ⁵¹ P-NMR-Untersuchungen zur Flexibilität der Phosphatgruppen Signalzuordnung ³¹ P-Relaxation zur Bestimmung der Flexibilität	84 85 86 86 87 87 87 87 88 88 88 89 90
4.5.2 4.5.3 4.5.4 4.5.5 4.5.6 4.5.7 4.6 4.6.1 4.6.2 4.6.3 4.7	Bindung/Koordination von Mn Glycinloop Katalytischer Loop und Peptidbindestelle C-Terminus Synergistische Bindung von PKI und ATP Katalytischer Zyklus ⁵¹ P-NMR-Untersuchungen zur Flexibilität der Phosphatgruppen Signalzuordnung ³¹ P-Relaxation zur Bestimmung der Flexibilität Wechselwirkungen mit AMP-PNP Besonderheiten in der Struktur	84 85 86 86 87 87 87 88 88 88 89 90 91
4.5.2 4.5.3 4.5.4 4.5.5 4.5.6 4.5.7 4.6 4.6.1 4.6.2 4.6.3 4.7 4.7.1	Bindung/Koordination von Mn Glycinloop Katalytischer Loop und Peptidbindestelle C-Terminus Synergistische Bindung von PKI und ATP Katalytischer Zyklus ³¹ P-NMR-Untersuchungen zur Flexibilität der Phosphatgruppen Signalzuordnung ³¹ P-Relaxation zur Bestimmung der Flexibilität. Wechselwirkungen mit AMP-PNP Besonderheiten in der Struktur Der N-Terminus von PKA – Die Struktur einer verlängerten Helix A	84 85 86 86 87 87 87 87 87 87 87 87 87 87 87 87 87 87 90 90 91
4.5.2 4.5.3 4.5.4 4.5.5 4.5.6 4.5.7 4.6 4.6.1 4.6.2 4.6.3 4.7 4.7.1 4.7.2	Bindung/Koordination von Mn Glycinloop Katalytischer Loop und Peptidbindestelle C-Terminus Synergistische Bindung von PKI und ATP Katalytischer Zyklus ³¹ P-NMR-Untersuchungen zur Flexibilität der Phosphatgruppen Signalzuordnung ³¹ P-Relaxation zur Bestimmung der Flexibilität Wechselwirkungen mit AMP-PNP Besonderheiten in der Struktur Der N-Terminus von PKA – Die Struktur einer verlängerten Helix A Besondere Dimere – Eingehakte Moleküle	84 85 86 86 87 87 87 87 88 88 88 90 91 95
4.5.2 4.5.3 4.5.4 4.5.5 4.5.6 4.5.7 4.6 4.6.1 4.6.2 4.6.3 4.7 4.7.1 4.7.2	Bindung/Koordination von Mn Glycinloop Katalytischer Loop und Peptidbindestelle C-Terminus Synergistische Bindung von PKI und ATP Katalytischer Zyklus ¹ P-NMR-Untersuchungen zur Flexibilität der Phosphatgruppen Signalzuordnung ³¹ P-Relaxation zur Bestimmung der Flexibilität Wechselwirkungen mit AMP-PNP Besonderheiten in der Struktur Der N-Terminus von PKA – Die Struktur einer verlängerten Helix A Besondere Dimere – Eingehakte Moleküle	84 85 86 86 87 87 87 87 88 88 89 90 91 95
4.5.2 4.5.3 4.5.4 4.5.5 4.5.6 4.5.7 4.6 4.6.1 4.6.2 4.6.3 4.7 4.7.1 4.7.2 4.7.1	Bindung/Koordination von Mn Glycinloop Katalytischer Loop und Peptidbindestelle C-Terminus Synergistische Bindung von PKI und ATP Katalytischer Zyklus P-NMR-Untersuchungen zur Flexibilität der Phosphatgruppen Signalzuordnung ³¹ P-Relaxation zur Bestimmung der Flexibilität Wechselwirkungen mit AMP-PNP Besonderheiten in der Struktur Der N-Terminus von PKA – Die Struktur einer verlängerten Helix A Besondere Dimere – Eingehakte Moleküle 7.2.1 Strukturlösung 7.2.2 Fingehakte Moleküle	84 85 86 86 87 87 87 87 87 87 87 87 87 87 97 90 91 95 95 95
4.5.2 4.5.3 4.5.4 4.5.5 4.5.6 4.5.7 4.6 4.6.1 4.6.2 4.6.3 4.7 4.7.1 4.7.2 4.4 4.4	Bindung/Koordination von Mn Glycinloop Katalytischer Loop und Peptidbindestelle C-Terminus Synergistische Bindung von PKI und ATP Katalytischer Zyklus ³¹P-NMR-Untersuchungen zur Flexibilität der Phosphatgruppen Signalzuordnung ³¹ P-Relaxation zur Bestimmung der Flexibilität Wechselwirkungen mit AMP-PNP Besonderheiten in der Struktur Der N-Terminus von PKA – Die Struktur einer verlängerten Helix A Besondere Dimere – Eingehakte Moleküle 7.2.1 Strukturlösung 7.2.2 Eingehakte Moleküle 7.2.3 Diskussion	84 85 86 86 87 87 87 87 87 87 87 87 87 87 97 90 91 95 95 96 98

5	5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION - SRC		
5.1	K	ristallisation und Datensammlung	100
•	5.1.1 5.1.2	Unterschiedliche Proteinkonstrukte Kristallisation und Datensammlung	
5.2	S	rukturlösung und Verfeinerung	
	5.2.1 5.2.2 5.2.3 5.2.4	Unterschiedliche Kristallformen Strukturlösung mit <i>Molecular Replacement</i> Verfeinerung Kristallpackung	
	5.2 5.2 5.2	 .4.1 Das Dimer in P1 .4.2 Das Dimer in P2₁ .4.3 Vier Moleküle in P1 	
5.3	S	rukturen der Kinasedomäne von Src	
:	5.3.1	Die Struktur der Kinasedomäne von Src in Kristallen der Raumgruppe P Molekülen in der asymmetrischen Einheit	1 mit zwei 107
	5.3 5.3 5.3 5.3	 Allgemeine Struktur / Konformation Helix C, Glycinloop und Aktivierungsloop C-Terminus ATP-Bindetasche 	
:	5.3.2 5.3.3	Die Struktur der Kinasedomäne von Src in Kristallen der Raumgruppe P. Die Struktur der Kinasedomäne von Src in Kristallen der Raumgruppe P.	2 ₁ 109 1 mit vier
	5.3 5.1	.3.1 Aktivierungsloop	
5.4	A	nalyse der Inhibitorbindung	
	5.4.1 5.4.2 5.4.3	Inhibitor S01 CGP77675 Purvalanol A	
5.5	5 V F	ergleich zu anderen aktiven und inaktiven Strukturen von Kina amilie	ısen der Src- 117
5.6	Z	usammenfassung	
	5.6.1 5.6.2	Proteinstruktur Inhibitoren	

LITERATURVERZEICHNIS12	20
------------------------	----

1 ZUSAMMENFASSUNG

Proteinkinasen spielen bei der Signaltransduktion und der Regulation der Zelle eine große Rolle. Sie sind auch an zellulären Prozessen, wie Metabolismus, Transkription, Zellzuklusprogression, Organisation des Cytoskeletts, Zellbewegung und Apoptose beteiligt. Ist die strenge Regulation der Kinasen gestört, kann es zu unkontrolliertem Zellwachstum und Krebs kommen. In vielen Tumoren wird eine gesteigerte Expression oder Aktivität von Kinasen beobachtet. Deshalb werden kleine Moleküle als Inhibitoren für die Therapie gesucht.

Kristallographische Untersuchungen der Proteinkinase A (PKA) und der Kinasedomäne von SRC sowie deren Inhibitor-Komplexen zeigen Bindungsmodi auf und bilden die Basis für strukturbasiertes Wirkstoffdesign.

Proteinkinase A dient als Modell-Kinase für nahe verwandte Kinasen wie Rho-Kinase, Proteinkinase B (PKB) oder Proteinkinase C (PKC), die selber nicht kristallisiert werden können. Verschiedene Klassen von ATP-kompetitiven Inhibitoren wurden mit PKA kokristallisiert, die Röntgenstrukturen gelöst und analysiert. Rho-Kinase-Inhibitoren Fasudil, H-1152P und Y-27632 hemmen auch an PKA, allerdings schwächer. Die Inhibitoren binden in der Adenosin-Bindetasche mit Kontakten zu Aminosäuren, die unterschiedlich in PKA und Rho-Kinase sind und so zur Selektivität beitragen können. PKB-Inhibitoren sind vom Naturstoff Balanol abgeleitet und extensiv modifiziert worden. 29 Strukturen mit PKA und PKAB-Mutanten, zeigen den Einfluss verschiedener Molekülteile der Inhibitoren auf die Affinität zu PKA und PKB. Bisindolylmaleimide, die vor allem PKC inhibieren, sind offenkettige Derivate vom universellen Kinase-Inhibitor Staurosporin abgeleitet. Sie binden im Gegensatz zu den anderen Inhibitoren an eine offene Konformation des Enzyms. Zusätzlich zeigen einige Strukturen Besonderheiten, wie eine verlängerte Helix A oder einhakte Moleküle (Dimer).

Verschiedene Kristallisationsbedingungen wurden für die Kinasedomäne von Src gefunden und die Kokristallisation mit verschiedenen Inhibitoren etabliert. Verschieden Kristallformen und unterschiedliche Raumgruppen treten auf. Die Proteinstruktur zeigt eine sehr starke Flexibilität in der Konformation der Domänen zueinander. Sie ist aktiven Kinase-Strukturen (Lck, PKA) ähnlicher als der bereits bekannten inaktiven Struktur von Src. Die Kristallpackung lässt eine gewisse Flexibilität zu und der Aktivierungsloop ist im Allgemeinen nicht geordnet. Die Inhibitoren sind in der Elektronendichte gut definiert. Sie sind ATP-kompetitiv und binden an der ATP-Bindestelle, wobei nur die Adenosin-Tasche besetzt wird.

2 EINLEITUNG

2.1 Proteinkinasen

Eukaryotische Proteinkinasen (ePKs) sind eine der größten Enzymfamilien im menschlichen Genom. Bisher sind 518 Mitglieder identifiziert, dies entspricht 1,7 % aller humanen Gene [1]. Proteinkinasen katalysieren die Übertragung des γ -Phosphats von ATP auf ihre Substrate (Peptide oder Proteine). Je nachdem, welche Aminosäure phosphoryliert wird, unterteilt man sie in Serin/Threonin-Kinasen (S/T-K) und Protein Tyrosinkinasen (PTK). Seltener kommen auch Histidinkinasen vor, die sich strukturell allerdings sehr stark von den S/T-K und PTK unterscheiden [2]. Eine Einteilung in Familien erfolgte durch Hanks [3, 4] und später durch Manning [1] in AGC, CAMK, CK1, CMGK, STE, TK, TKL und atypische Proteinkinasen (Abb. 2.1, 2.2).



Abb. 2.1 Dendrogramm aus 491 eukaryotischen Protein Kinasen (nach [1]).

Proteinkinasen spielen eine äußerst wichtige Rolle in der Signaltransduktion und der Regulation der Zelle. Dabei werden Signale (z.B. Hormone und Wachstumsfaktoren) von außerhalb der Zelle über Rezeptoren aufgenommen und innerhalb der Zelle weiter bis in den Zellkern weitergeleitet. Dort kann die Genexpression beeinflusst werden. So steuern sie Zellwachstum, -teilung, -differenzierung oder –adhäsion. An allen zellulären Prozessen wie Metabolismus, Transkription, Zellzyklusprogression, Organisation des Cytoskeletts,

Zellbewegung und Apoptose sind ebenfalls Proteinkinasen beteiligt. Diese Signaltransduktionswege sind sehr komplex und bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt.



Abb. 2.2 Dendrogramm der humanen Proteinkinasen (nach [1]).

Die meisten Proteinkinasen sind aus mehreren Domänen aufgebaut. Allen gemeinsam ist die katalytische Domäne (Kinasedomäne) mit der Phosphorylierungseigenschaft.

Die Kinasedomäne ist stark konserviert und umfasst ca. 260 Aminosäuren [3]. Daneben existieren weitere Domänen wie SH3 und SH2 (*Src homology* 3 bzw. 2), PH (*Plekstrin homology*) und WW Domäne (enthält zwei konservierte Typtophane (W)), die wichtige Aufgaben in der Regulation durch Protein-Protein-Wechselwirkungen haben. Weitere Domänen, die häufig bei Proteinkinasen vorkommen, können der Literatur entnommen werden [1].

2.1.1 Flexibilität von Kinasen

Die katalytische Kinasedomäne ist sowohl in der Sequenz als auch in der Struktur sehr stark konserviert. Sie besteht aus einer etwas kleineren N-terminalen Domäne (N-lobe) und einer etwas größeren C-terminalen Domäne (C-lobe). Der N-lobe besteht aus β-Faltblättern mit einer konservierten Helix, während der C-lobe vorwiegend helikal ist (Abb. 2.3). Der Spalt dazwischen bildet die ATP-Bindetasche, das aktive Zentrum. Die Substrate binden an Teilen des C-lobe und am Aktivierungsloop. Veränderungen der relativen Orientierung von N- zu Clobe kommen sehr oft vor. Die Flexibilität zwischen N-lobe und C-lobe ist für Proteinkinasen typisch. So gibt es viele Strukturen von Proteinkinase A (PKA) ohne und mit diversen Liganden, die eine unterschiedliche Öffnung der Kinase bedingen [5, 6]. Die Flexibilität von Kinasen zeigt sich auch bei der Kristallstruktur von CSK (C-terminale Src Kinase). Dort sind alle sechs Moleküle in der asymmetrischen Einheit unterschiedlich, zwei davon zeigen eine inaktive, vier eine aktive Konformation [7]. Von IRK (Insulin Rezeptor Kinase) existieren Röntgenstrukturen der aktiven und inaktiven Form. Diese unterscheiden sich unter anderem in der relativen Position von N- und C-lobe und der Helix C [8, 9]. Dabei ist wichtig, dass offenen und geschlossene Konformation nicht direkt mit aktiv und inaktiv korrelieren. Allerdings ist eine bestimmte geschlossene Konformation mit den konservierten Aminosäuren in der richtigen Position essentiell für die Katalyse, so dass sich die Strukturen verschiedener Kinasen im aktiven Zustand kaum unterscheiden. Dafür gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Inaktivierungsmechanismen, die sich in stark unterschiedlichen inaktiven Strukturen zeigen.

2.1.2 Regulationsmechanismen

Proteinphosphorylierung ist die am häufigsten vorkommende posttranslationale Modifikation [10]. Dadurch kann die enzymatische Aktivität reguliert werden. Kinasen sind molekulare Schalter, deren Aktivität selbst in den meisten Fällen durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung kontrolliert wird. Diese Phosphorylierung ist reversibel und geschieht im Zusammenspiel mit Proteinphosphatasen. Damit kann schnell zwischen aktivem und inaktivem Zustand gewechselt werden. Dies kann mit einer Konformationsänderung des C- und N-lobes sowie anderen strukturellen Veränderungen verbunden sein. Diese Veränderungen finden im und um das aktive Zentrum statt und können den Glycinloop, die Helix C und den Aktivierungsloop betreffen. Es handelt sich meist um Mechanismen, die die ATP-Bindetasche blockieren [11]. Die eben beschriebene Phosphorylierung erfolgt oft an einem Serin, Threonin oder Tyrosin des Aktivierungsloops, was notwendig für eine Aktivität der meisten Kinasen ist. Eine Ausnahme ist zum Beispiel CSK, die keine Phosphorylierungsstelle im Bereich des Aktivierungsloops besitzt [7]. Es gibt aber auch verschiedene andere Domänen die phosphoryliert werden können und zur Regulation beitragen, zum Beispiel die Phosphorylierung des Hydrophoben Motivs bei Kinasen der AGC-Familie (Abschnitt 2.2.2.4) oder die Phosphorylierung des C-Terminus bei Kinasen der Src-Familie (Abschnitt 2.3.3). Daneben gibt es auch viele weitere Regulationsmechanismen, an denen regulatorische Proteine und Cofaktoren beteiligt sind. Dies sind zum Beispiel regulatorische Untereinheiten bei Protein Kinase A (PKA) oder Cyclin bei Cyclin-abhängiger Kinase (CDK). Es können auch andere Domänen der Kinase regulatorische Funktionen übernehmen, wie SH2 und SH3 Domänen bei Tyrosinkinasen der Src-Familie.

Auf Grund ihrer meist proliferativen Effekte ist eine strenge Kontrolle der Enzymaktivität notwendig. Die Kinase liegt meist inaktiv vor und wird nur auf ein bestimmtes Signal hin aktiviert. Ist dieser strenge Regulationsmechnismus gestört (zum Beispiel durch Mutationen oder Überexpression), kann unkontrolliertes Wachstum und Krebs entstehen. Dies ist meistens durch den Ausfall mehrerer Regulationssysteme bedingt.

2.2 Proteinkinase A

Die cAMP-abhängige Proteinkinase (katalytische Untereinheit), auch Proteinkinase A oder kurz PKA genannt, gehört zur AGC-Familie innerhalb der Familie der Serin/Threonin-Kinasen. Sie ist sehr gut untersucht und dient als Modell für die ganze Kinase-Familie. Dies liegt zum Teil an ihrer frühen Entdeckung, ihrem einfachen Aufbau und der konstitutiven Aktivität, aber auch an den zahlreichen genetischen, biochemischen, funktionellen und strukturellen Untersuchungen. PKA wurde schon sehr früh isoliert, gereinigt und charakterisiert [*12*]. PKA ist der zentrale Effektor des *second messengers* cAMP und an einer Vielzahl von Vorgängen in der Zelle beteiligt. Dazu zählen die Regulation des Glucosemetabolismus (über die Phosphorylierung von Phosphorylase Kinase), die Funktion des Gedächtnisses, die Beeinflussung von Ionenkanälen (Typ L Ca²⁺-Kanäle), die Steuerung der Genexpression (Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB), Zellproliferation und -differenzierung [*13, 14*].

Ihre Kristallstruktur wurde 1991 als erste Struktur einer Kinase aufgelöst [15]. Es wurden seitdem verschiedenste Komplexe mit Substratpeptid allein, MgATP, MnAMP-PNP, ADP oder Adenosin und (Pseudo-)Substratpeptid, sowie diversen Inhibitoren kristallisiert und deren Strukturen aufgeklärt [15-29]. Der Katalysemechanismus ist ausführlich beschrieben (Abschnitt 2.2.3).

2.2.1 Proteinkinase A und ihre Regulation

Das Holoenzym besteht in seiner inaktiven Form aus zwei regulatorischen (R) und zwei katalytischen (C) Untereinheiten. Wird der *second messenger* cAMP gebunden, dissoziiert der Komplex. Dadurch werden die katalytischen Untereinheiten freigesetzt und sind aktiv:

 $R_2C_2 + 4 \text{ cAMP} \rightarrow R_2cAMP_4 + 2 \text{ C}$

In der freien Form ist die katalytische Untereinheit aktiv und kann verschiedene Proteine phosphorylieren, aber auch in den Zellkern gelangen und dort die Genexpression beeinflussen [30].

An der Regulation sind außer den R-Untereinheiten AKAPs (*Protein Kinase A anchoring Proteins*) und der Proteinkinase-Inhibitor PKI beteiligt [31-34].

2.2.1.1 Die katalytische Untereinheit (PKA)

Von der katalytischen Untereinheit (PKA C oder kurz PKA genannt) existieren drei verschiedene Isoformen (α , β und γ) mit teilweise unterschiedlichen Splicevarianten, die im Gewebe unterschiedlich exprimiert werden. Isoformen werden häufig in unterschiedlichen Geweben und Entwicklungsstadien exprimiert. Sie sind in der Evolution durch Genverdoppelung entstanden und ermöglichen eine Feinregulation der Enzymfunktion. PKA C α wird in fast allen Geweben exprimiert und ist die am besten untersuchte Isoform.

PKA C α enthält – neben der Kinasedomäne selbst – N-terminal eine α -Helix und C-terminal einen langen Strang, der vom *C-lobe* aus, an der ATP-Bindetasche vorbei, über den *N-lobe* in eine hydrophobe Tasche bindet. Die Struktur wird unter 2.2.2 näher beschrieben.

2.2.1.2 R-Untereinheiten

Die regulatorischen oder R-Untereinheiten kontrollieren die Aktivität von PKA. Es gibt vier Isoformen RI α , RI β , RII α und RII β [*35-40*]. Diese verschiedenen Subtypen werden in unterschiedlichen Gewebearten exprimiert und haben auch unterschiedliche Eigenschaften. Die RI-Untereinheiten findet man hauptsächlich im Cytosol, während RII-Untereinheiten meist an Zellorganelle über Ankerproteine (AKAPs) gebunden sind [*41*]. Ihre Sequenzen und Strukturen zeigen eine Dimerisierungs-/Docking-Domäne (D/D-Domäne), eine cAMP Bindestelle sowie Bindestellen für die katalytische Untereinheit und AKAPs. Die D/D-Domäne hält die regulatorischen Untereinheiten als Dimer zusammen und bildet gleichzeitig die Bindestelle für die AKAPs. Die R-Untereinheiten binden an PKA wie Substrate an der Peptidbindestelle. Diese Bindung erfolgt synergistisch mit ATP und liegt bei hohen ATP-Konzentrationen im subnanomolaren Bereich (K=0,1 nM). Dabei kann RII auch phosphoryliert werden, nicht aber RI.

2.2.1.3 Ankerproteine (AKAPs)

Ankerproteine (*Protein Kinase A anchoring Proteins*, AKAPs) stellen eine Familie von Proteinen dar, die spezifisch an die D/D-Domäne von RI und RII binden können. Sie sind mitverantwortlich für die Lokalisation von PKA in der Zelle und somit für die Feinabstimmung der Regulation. Je nach AKAP kann PKA an die Plasmamembran, das Sarcoplasmatisches Reticulum, den Golgi-Apparat, das Cytoskelett oder Mitochondrien gebunden werden [42, 43].

2.2.1.4 Proteinkinase-Inhibitor PKI

Der hitzestabile Proteinkinase-Inhibitor (PKI) ist ein ca. 7,8 kDa Protein mit 75 Aminosäuren. Es gibt verschiedene Isoformen (α , β und γ), die gewebe- und zellzyklusspezifisch exprimiert werden [44]. Die α -Isoform ist unter dem Gennamen PKIA zu finden [44-48]. PKI ist ein sehr potenter Inhibitor für PKA, der wie ein Substrat bindet. Die Bindung an PKA ist synergistisch mit MgATP: die reine Bindungskonstante K_D beträgt 2,3 μ M, während die Inhibitions-konstante K_i in Anwesenheit von ATP bei 0,2 nM liegt [34]. Besonders mehrere Arginine (Arg15, Arg18, Arg19) des N-terminalen Bereichs sind für die starke Bindung an PKA und somit für die Hemmung verantwortlich [47]. An der P-Stelle hat PKI anstatt eines Serins oder Threonins ein Alanin (Pseudosubstrat). Außerdem ist ein Kernexportsignal (*Nuclear Export Signal*, NES) (Reste 35-47) vorhanden [49-51]. Die Regulation von PKA über PKI ist cAMP-unabhängig und kann zellzyklusspezifisch erfolgen. Durch einen raschen Export aus dem Zellkern kann so die durch PKA vermittelte Genexpression auch in Anwesenheit von cAMP gestoppt werden.

Bei der Kristallisation von PKA wird ein Fragment – PKI (5-24) – häufig als Pseudosubstratpeptidanalogon zugesetzt (Strukturen in der Proteindatenbank: 1CDK, 1CMK, 1CTP, 1STC, 1YDR, 1YDS, 1YDT).

Auch bei der Reinigung von PKA kann PKI(5-24), das an Säulenmaterial gekoppelt ist, zur Affinitätschromatographie eingesetzt werden [52].

2.2.2 Struktur der katalytischen Untereinheit von PKA

PKA besteht aus 350 Aminosäuren (ca. 41 kDa) und ist damit nur wenig größer als die konservierte Kinasedomäne, die etwa 260 Reste umfasst. Am N- und C-Terminus außerhalb der Kinasedomäne liegen nicht konservierte Sequenzen. Die 40 N-terminalen Aminosäuren beinhalten eine Myristylierungsstelle und eine Helix A (Abb. 2.3, rot). Der C-Terminus von ca. 50 Aminosäuren umspannt die Kinase und bindet mit dem hydrophoben Motiv (HM) in eine hydrophobe Tasche des *N-lobes* (Abb. 2.3, blau). Diese Sequenz ist bei vielen Kinasen der AGC-Familie vorhanden. Diese Teile werden in den folgenden Abschnitten genauer dargestellt.



Abb. 2.3 Struktur von Proteinkinase A. Die N-terminale Helix ist rot, der C-Terminus blau und PKI(5-24) pink gefärbt. Elemente, die an der ATP-Bindung beteiligt sind, sind hervorgehoben: Glycinloop (dunkelgrün), β -Faltblatt 3 (hellgrün), Helix C (orange), katalytischer Loop (gelb) und Aktivierungsloop (lila).

2.2.2.1 Kinasedomäne mit konservierten Elementen

Die Kinasedomäne von Proteinkinasen ist sehr stark konserviert. Dies gilt sowohl für die Sequenz als auch für die Tertiärstruktur. Man kann die Kinasedomäne in zwei Bereiche einteilen, den etwas kleineren N-terminalen *lobe* und den größeren C-terminalen *lobe*. Der Spalt zwischen den beiden Domänen bildet die ATP-Bindetasche. Der *N-lobe* von PKA besteht aus 5 β -Faltblättern und der Helix B und C. Der *C-lobe* ist vorwiegend helikal. Eine Aufteilung in 11 Subdomänen erfolgte später [3] (Abb. 2.4).

Domäne I besteht aus den β-Faltblättern 1 und 2. Mit dem dazwischen liegenden Turn bilden sie den Glycinloop (50-55) mit der Gly-X-Gly-X-X-Gly-Konsensussequenz (Rossmann-Motiv). Der Glycinloop liegt direkt über dem ATP und ist über Wasserstoffbrücken zwischen den Amidgruppen und den Phosphatgruppen mit dem ATP verbunden. Val57 nach dieser Sequenz ist ebenfalls stark konserviert. Zusammen mit einem hydrophoben Rest (Leu49) und Ala70 (β-Faltblatt 3) wird eine hydrophobe Tasche für den Adeninteil von ATP gebildet [53]. Domäne II besteht aus β-Faltblatt 3, das außer Ala70 auch ein stark konserviertes Lysin (Lys72) enthält. Es koordiniert das α- und β-Phosphat von ATP und bildet eine Salzbrücke zu einem Glutamin (Glu91) der Helix C (Domäne III). Beide Reste sind für die katalytische Aktivität essentiell [54]. Die weiteren beiden β-Faltblätter sind Teil der Domäne IV und V. Eine wichtige Verbindung zwischen *N-lobe* und *C-lobe* ist die *Hinge Region* (120-127). Sie schließt die ATP-Tasche seitlich ab. Wichtig ist auch der katalytische Loop (166-171) mit konservierten Resten Asp166, Lys168 und Asn171, die an der enzymatischen Reaktion direkt beteiligt sind (Domäne VIb). Der Aktivierungsloop (Subdomäne VII und VIII) liegt zwischen dem konservierten DFG- und APE-Motiv. Asp184 koordiniert Mg^{2+} bzw. Mn^{2+} und das γ -Phosphat. Thr197 ist eine Phosphorylierungsstelle, die notwendig für die katalytische Aktivität ist. Die Kontakte von pThr197 zu Arg165 und Lys189 sind wichtig für die katalytische Aktivität. Ist die Kinase in einer geschlossenen Konformation, wird außerdem eine Salzbrücke von pThr197 zu His87 der Helix C gebildet. Subdomäne VIII enthält das konservierte APE Motiv (Ala206). Der Aktivierungsloop (197-205) und Teile der Helix D (127-133) sind für die Substraterkennung von entscheidender Bedeutung, ebenso wie Teile der Subdomäne IX (Glu230) und Subdomäne X (241-247). Subdomäne IX ist außerdem wichtig für die Stabilität des *C-lobes*. Subdomänen X und XI (mit konserviertem Arg280) sind weniger stark konserviert, über ihre Funktion ist wenig bekannt.

Die wichtigsten Elemente, die in Kontakt mit ATP (und ATP-kompetitiven Inhibitoren) stehen, sind in Abb. 2.3 farbig hervorgehoben. Eine schematische Darstellung des Aufbaus von PKA nach [11] zeigt Abb. 2.4.



Abb. 2.4 Schematische Darstellung der Domänen- und Sekundärstruktur von PKA mit konservierten Elementen. Nach [11].

2.2.2.2 Phosphorylierungsstellen

Natives Enzym, das aus Organen aufgereinigt wurde, weist zwei Phosphorylierungen an Thr197 und Ser338 auf. Diese beiden Phosphorylierungsstellen sind für die Aktivität und Stabilität von entscheidender Bedeutung. Ser338 ist ein Teil des C-Terminus und verankert ihn auf dem *N-lobe*. Thr197 liegt im Bereich des Aktivierungsloops mit wichtigen Kontakten zu verschiedenen Teilen des Enzyms [55]. Ser10 ist als Autophosphorylierungsstelle *in vitro* bekannt, deren Funktion noch nicht geklärt ist [56]. Bei der Expression von PKA in *E. coli* findet man ein Gemisch aus 2-, 3- und 4-fach phosphoryliertem Protein (stets Ser338, Thr197)

zusätzlich Ser10 und ggf. Ser139) [55, 57-59]. Ser139 kommt nur in rekombinant hergestelltem Protein vor. Eine Funktion ist nicht bekannt. Die Phosphorylierungsstellen sind unterschiedlich flexibel, wobei das Phosphat an Ser10 die höchste, an Thr197 die niedrigste Flexibilität aufweist, wie eine Analyse der B-Faktoren verschiedener Kristallstrukturen und ³¹P-NMR Untersuchungen zeigen [60]. Eine Phosphorylierung von PKA an Thr197 durch PDK1 wird vermutet [61].

2.2.2.3 N-terminales Segment und Helix A

Der N-Terminus von PKA umfasst ca. 30-40 Aminosäuren außerhalb der konservierten katalytischen Domäne, ein Teil davon (15-31) ist die Helix A. Diese Helix ist typisch für PKA und unterscheidet sie von anderen Mitgliedern der AGC-Familie. Die N-terminale Sequenz lautet GNAAAAKKGSEQESV und enthält mehrere Stellen für posttranslationale Modifikationen [62]: Myristylierung¹ von Gly1, Deamidierung von Asn2 und Phosphorylierung von Ser10. Das rekombinant in *E. coli* hergestellte Protein unterscheidet sich dabei von Protein, das aus Säugetiergeweben isoliert wurde: Es ist nicht myristyliert, außer wenn es mit Myristoyltransferase coexprimiert wird [63], nicht deamidiert [64] und zum großen Teil mehrfach phosphoryliert.

Myristylierung steht meist im Zusammenhang mit Membranbindung. Auch basische Aminosäuren wirken an der Membranbindung mit. Eine N-terminale Phosphorylierung kann zur Lösung von der Membran führen, was als *Myristoyl Electrostatic Switch* beschrieben ist [65]. Die Sequenz von PKA enthält alle beschriebenen Merkmale. Die Membranbindung ist für PKA, insbesondere für die katalytische Domäne und N-terminale Peptide, in verschiedenen Experimenten gezeigt worden [66-68], ebenso wie eine Ablösung von der Membran [69, 70].

Eine weitere Funktion des myristylierten N-Terminus ist die Stabilisierung des Enzyms, wobei die Myristylsäure in eine hydrophobe Tasche des *C-lobes* bindet [18].

Circularer Dichroismus (CD) Experimente mit N-terminalen PKA-Peptiden haben gezeigt, dass diese posttranslationalen Modifikationen einen Einfluss auf die Struktur haben können [62]: Die Phosphorylierung von Ser10 vermindert den helikal gefalteten Anteil, während Myristylierung einen strukturierenden Effekt hat. Die Deamidierung von Asn2 hat keinen Einfluss auf die Struktur.

¹ Myristylsäure ist eine C14-Fettsäure, die über eine Säureamidbindung mit dem N-terminalen Glycin kovalent verknüpft ist.

2.2.2.4 C-Terminus und hydrophobes Motiv

Der C-Terminus besteht aus etwa 50 Aminosäuren außerhalb der katalytischen Domäne. Er umspannt das Enzym vom *C-lobe* ausgehend, verläuft an der ATP-Bindetasche vorbei über den *N-lobe* und bindet dort mit dem hydrophoben Motiv (HM) in eine hydrophobe Tasche. Innerhalb der Gruppe der AGC-Familie ist diese Sequenz konserviert. Die Konsensussequenz lautet Phe-X-X-Phe-Ser/Thr-Phe/Tyr. Um in die hydrophobe Tasche zu binden, muss das Serin oder Threonin phosphoryliert werden. Dies ist neben der Phosphorylierung des Aktivierungsloops notwendig für die Aktivierung der Kinase [71]. Eine Ausnahme bilden PRK und atypische PKC-Isoformen, bei denen die Phosphorylierungsstelle durch eine negativ geladene Aminosäure (Asp oder Glu) ersetzt ist, das das pSer/pThr nachahmt [72]. Auch PKA ist ein Sonderfall, da hier Phe-X-X-Phe die letzten vier Aminosäuren der Sequenz sind und somit die Phosphorylierungsstelle fehlt. Bei allen bekannten Strukturen von PKA bindet diese Sequenz in eine hydrophobe Tasche, in Übereinstimmung mit der konstitutiven Aktivität. Für PKB ist eine Bindung des HM in diese Tasche ebenfalls Voraussetzung für die Aktivität [73, 74]. PDK1 hat zwar selbst kein HM, kann aber mit dem HM anderer Kinasen interagieren und wird so aktiviert [75-77].

Die Kristallstrukturen von PKA zeigen den Verlauf des C-Terminus. Die Reste 300 bis 314 sind fest auf dem *C-lobe* verankert. Der Bereich von 314 und 329 ist flexibel und fehlt in den offenen Strukturen des Apoenzyms. In geschlossenen Strukturen zeigt die Seitenkette von Phe327 in die ATP-Tasche und schließt sie seitlich ab. Es bestehen hydrophobe Wechselwirkungen zu ATP oder Inhibitoren. Dieser Teil kann offensichtlich den Zutritt von ATP zur ATP-Tasche kontrollieren [*31*]. Dieses Phe ist zu mehr als 75 % bei Kinasen der AGC-Familie konserviert. Tyr330 trägt zur Peptiderkennung bei; es bestehen Kontakte zu Arg18 von PKI (P-3 *site*) in ternären Komplexen. Die folgenden 20 Aminosäuren sitzen fest auf dem *N-lobe*. Die letzten vier Reste Phe-Ser-Glu-Ser bilden das hydrophobe Motiv (HM) und binden in eine hydrophobe Tasche am *N-lobe*. Sie wird aus den Aminosäuren der β-Faltblätter 3 (Leu74), 4 (Ser109, Phe110, Lys111) und 5 (Leu116) sowie der Helix B (Lys76, Val79, Val80) und C (Ile85, Thr88, Leu89, Lys92) gebildet. Mutiert man Phe347 oder Phe350 zu Alanin, so zeigt das Enzym keine (Phe350) oder nur geringe Restaktivität (Phe347) [*78, 79*].

2.2.3 ATP-Bindung und Katalysemechanismus

Kinasen katalysieren die Übertragung des γ -Phosphats von ATP auf das Substratprotein oder -peptid. Verschiedene Kristallstrukturen von Komplexen von PKA mit Substraten oder Substratanaloga zeigen Ausschnitte aus dem katalytischen Zyklus: Der erste Schritt der Katalyse ist die Bindung von ATP, Magnesium (oder Mangan) und Substratprotein oder -peptid (1ATP, 1CDK) [*17, 20*]. Die Reihenfolge der Bindung kann geordnet oder zufällig sein. Bei PKA wird ATP und Magnesium zuerst gebunden. Hohe Substratkonzentrationen können zu einem unproduktivem Komplex aus Enzym und Substrat führen [*80, 81*]. Sind ATP, Mg²⁺ und Substratpeptid gebunden, erfolgt die Übertragung des Phosphats in einem *in-line* Mechanismus. Das γ -Phosphoratom wird nucleophil angegriffen, das im Übergangszustand 5-fach koordiniert ist (1L3R) [*27*]. Das phosphorylierte Produkt wird zuerst freigesetzt. Die Dissoziation des PKA-ADP/Mg-Komplexes ist der letzte und langsamste Schritt (Abschnitt 4.3). Am Ende liegt wieder freies Enzym vor (1JH3) [*82*].

PDB-Code	Komplex	Katalytischer Schritt	Konformation
1JH3	РКА	E (Apoenzym)	offen
1APM, 2CPK	PKA – PKI	$(E \cdot S^*)$	geschlossen
1CTP, 1CMK	PKA – PKI*	$(\mathbf{E} \cdot \mathbf{S}^*)$	offen
1ATP	PKA/MnATP – PKI	$E \cdot ATP \cdot S^*$	geschlossen
1CDK	PKA/MnAMP-PNP – PKI	$E \cdot ATP^* \cdot S^*$	geschlossen
1JBP	PKA - ADP - PKI	$(\mathbf{E} \cdot \mathbf{ADP} \cdot \mathbf{S^*})$	geschlossen
1L3R	$PKA - AlF_3 - SP20$	Übergangszustand*	geschlossen
1RDQ	PKA – PKI – ATP/ADP+P	Mischform - S*	geschlossen
Abschnitt 4.5	PKA – MnADP	E · ADP	geschlossen

Tabelle 2.1 Verschiedene PKA Komplexe zeigen Ausschnitte aus dem katalytischen Zyklus

* -Analogon

Die ATP-Bindung erfolgt über hydrophobe (van-der-Waals) und hydrophile (Wasserstoffbrücken) Wechselwirkungen sowie durch die Koordination der zweiwertigen Metallkationen (Mn²⁺ oder Mg²⁺). In der Triphosphat-Bindetasche dominieren Wasserstoffbrücken und hydrophile Kontakte zwischen den Sauerstoffatomen der Triphosphatgruppe und der Hauptkette des Glycinloops oder den Seitenketten konservierter Aminosäuren (Abschnitt 2.2.2.1). Die Hydroxylgruppen der Ribose bilden H-Brücken zum Carboxylat von Glu127 (2'OH) und zum Carbonylsauerstoff von Glu170 (3'OH). In der Adenin-Bindetasche gibt es vorwiegend hydrophobe Wechselwirkungen. Nur Val57 und Ala70 sind stark konserviert, alle anderen Aminosäuren sind zwar variabel, aber meistens konservative Austausche. Wasserstoffbrücken existieren von den Adeninstickstoffen N1 und N6 zum Amidstickstoff von Val123 und Carbonylsauerstoff von Glu121 der *Hinge Region*. Alle Wasserstoffbrücken zwischen Enzym, Substratpeptid und AMP-PNP sowie die Komplexierung der Mn²⁺-Ionen sind schematisch in Abb. 2.5 dargestellt [*17*].



Abb. 2.5 Schema der Wasserstoffbrücken und Koordination der Mn-Atome in PKA-MnAMP-PNP-PKI Komplex. Aminosäuren von PKA sind blau dargestellt, Reste des Substratpeptidanalogons (PKI) magenta. Nach [17].

Mit der Bindung von Substrat ist auch eine Konformationsänderung verbunden. Das Apoenzym zeigt eine offene Struktur. Bei der Bindung der Substrate ändert sich die relative Orientierung von *N*- und *C-lobe*, die Konformation ist geschlossen.

2.3 Src

2.3.1 Historisches und Einführung

Das erste Onkogen, das entdeckt wurde, war *v-Src* [83-85]. Es codiert für das transformierende Protein des Rous-Sarcoma Virus (RSV), das bei Hühnern Sarkome, bösartige Tumore des Bindegewebes, auslöst und 1911 von P. Rous erstmals beschrieben wurde [86]. Um 1980 wurde gefunden, dass Src eine Tyrosin-Kinase ist [87-90]. Das zelluläre Homolog *c-Src* kommt natürlicher Weise in allen Zellen vor und ist ein Proto-Onkogen [91, 92]. Verschiedene *Reviews* geben einen guten Überblick über die historische Entwicklung der Src Forschung [93], die Bedeutung von Src in Signaltransduktionswegen [94-96] und Cancerogenese [97-100] sowie Src als *Target* in der Krebsforschung [101, 102].

2.3.2 Src und Signaltransduktion

Src spielt eine wichtige Rolle in vielen Signaltransduktionswegen (siehe Abb. 2.6). Diese regulieren die Zellteilung, Wachstum und Überleben der Zelle und sind mit Vorgängen wie *focal adhesion*, Zytoskelettbewegungen und Zellmigration verbunden. Interaktionen mit FAK (*Focal adhesion kinase*) und p130cas sind beschrieben [*103, 104*]. Src hat einen Einfluss auf die Zellzyklusregulation über die Suppression von P27, Aktivierung von CDKs, Zellüberleben über den PI3K und Akt Signalweg und wirkt zusammen mit Wachstumsfaktoren *downstream* von PDGFR und EGFR [*93, 94, 98*].



Abb. 2.6 Src in Signaltransduktionswegen nach [93].

2.3.3 Aufbau

Src gehört innerhalb der Tyrosinkinasen zur Src-Familie mit neun Mitgliedern: Src, Fyn und Yes kommen in fast allen Geweben vor. Lck, Hck, Lyn, Blk, und Fgr werden nur in speziellen Geweben, vor allem in hämatopoetischen Zellen, exprimiert. Yrk findet man nur in Hühnern [96]. Src weist 77 % und 75 % identische Aminosäuren zu den nächsten Verwandten Yes und Fyn auf. Zu den anderen Kinasen der Src-Familie besteht etwa 60 % Homologie. Weiter entfernt sind Abl und CSK, die immer hin noch 43 % und 40 % identische Aminosäuren besitzen. Ein Sequenzalignment mit den acht humanen Mitgliedern der Src-Familie und den verwandten Tyrosinkinasen Frk, Abl1 und CSK ist in Abb. 2.8 dargestellt.

Src findet man unter dem Swiss-prot Eintrag P12931 mit den Synonymen humane Protooncogene tyrosine-protein kinase Src, p60-Src, c-Src.

Src ist ein ca. 60 kDa Protein mit mehreren Domänen: SH4 Domäne, *unique domain*, SH3 Domäne, SH2 Domäne, SH1 oder katalytische Domäne und C-Terminus (Abbildung 2.7).

Der N-Terminus enthält Myristylierungssequenz und ist verantwortlich für die Membranbindung. Die *unique domain* ist einzigartig für jede Kinase innerhalb der Src-Familie und weist den geringsten Grad an Homologie auf. Die SH3 Domäne erkennt Polyprolin Typ II Helices (prolinreiche Sequenzen mit dem Konsensus PXXP) verschiedener Proteine, sowie die eigene Sequenz P²⁵²QTQGL. Die SH3-Domäne ist über einen Linker mit der SH2 Domäne verbunden, die Phosphotyrosine (insbesondere das eigene pTyr529) bindet. Beide Domänen sind für die Regulation wichtig (Abschnitt 2.3.5). Der Linker, der die oben beschriebene PQTQGL-Sequenz enthält, verbindet zur SH1 oder katalytischen Domäne. Sie enthält eine Autophosphorylierungsstelle (Tyr418²), die im Bereich des Aktivierungsloops liegt und notwendig für eine volle Aktivität ist [*105, 106*]. Der C-Terminus dient der Regulation und besitzt ebenfalls eine Phosphorylierungsstelle (Tyr529). Tyr529 wird von einer anderen Kinase (CSK - *C-terminal src-kinase*) phosphoryliert und bewirkt im Gegensatz zu pTyr418 eine negative Regulation [*107, 108*].



Abbildung 2.7. Schematische Darstellung der Domänenanordnung von c-Src

² Die Nummerierung ist in der Literatur nicht einheitlich. Historisch bedingt findet man meist eine Nummerierung nach der *chicken* Sequenz. Die Sequenznummern sind im Vergleich zur humanen Sequenz im Bereich der katalytischen Domäne um zwei vermindert, d.h. oft wird man statt Tyr418 auch Tyr416 finden. In der vorliegenden Arbeit wird die humane Nummerierung verwendet.



Abb. 2.8 Ein Sequenzalignment von Src mit Kinasen der Src-Familie (Yes, Fyn, Fgr, Hck, Lyn, Lck, Blk) und nahe verwandter Kinasen (Frk, Abl1 und CSK). Identische Aminosäuren sind grün, konservative Austausche dunkel- und hellblau gefärbt. Dies erfolgte in Abstufungen für alle Kinasen, die Src-Familie und dem nächsten verwandten Yes. Dazu wurden die Programme Blast, ClustalW und Alscript verwendet.

2.3.4 Struktur von Src

Die erste Kristallstruktur von Src wurde 1997 publiziert [*109*] und zeigte eine inaktive Konformation der SH3, SH2 und katalytischen Domäne sowie des C-Terminus (Abb. 2.9). Diese drei Domänen werden durch intramolekulare Wechselwirkungen zusammengehalten. Diese bestehen zwischen pTyr529 des C-Terminus und der SH2-Domäne sowie zwischen der SH3 und der katalytischen Domäne, vermittelt durch den SH2-SH1-Linker. Letzteres war so nicht vorherzusehen, denn die Src-Sequenz enthält das typische PXXP-Motiv nicht, das an SH3 Domänen bindet, sondern die Sequenz Pro²⁵²GlnThr²⁵⁴GlnGlyLeu²⁵⁷. Dabei interagieren Pro252 und Thr254 mit der SH3 Domäne, Leu257 mit dem *N-lobe* der katalytischen Domäne [*109*, *110*].



Abb. 2.9 Die Struktur von inaktivem Src (84-533) im Komplex mit AMP-PNP (2SRC) [111] ist analog Abb. 2.7 gefärbt.

Die Tabellen 2.2 und 2.3 geben einen Überblick über die Röntgenstrukturen von Src und nah verwandten Protein Kinasen in der Proteindatenbank (PDB), die die Kinasedomäne enthalten. Weitere Strukturen anderer Tyrosinkinasen wie IRK, FGF, Tie-2, EGFR, Igf-1R sind in der PDB zu finden.

PDB- Code	Kinase	Domäne	Ligand	Zustand	Referenz
1FMK	SRC	SH3,SH2, Kinasedomäne (human)	_	inaktiv	[109]
2SRC	SRC	SH3,SH2, Kinasedomäne (human)	AMP-PNP	inaktiv	[111]
2РТК	SRC	SH3, SH2, Kinasedomäne (chicken)	_	inaktiv	[112]
1KSW	SRC	SH3, SH2, Kinasedomäne (human) Thr338Gly Mutante	N-benzyl-ADP	inaktiv	[113]

 Tabelle 2.2
 Strukturen der Src-Kinasedomäne in der Proteindatenbank (PDB).

Tabelle 2.3 Strukturen der Kinasedomäne von weiteren Mitgliedern der Src-Familie und verwandten Kinasen in der Proteindatenbank PDB.

PDB- Code	Kinase	Domäne	Ligand	Zustand	Referenz
3LCK	LCK	Kinasedomäne	_	aktiv	[114]
1QPC	LCK	Kinasedomäne	AMP-PNP	aktiv	[115]
1QPD	LCK	Kinasedomäne	Staurosporin	aktiv	[115]
1QPJ	LCK	Kinasedomäne	Staurosporin	aktiv	[115]
1QPE	LCK	Kinasedomäne	PP2	aktiv	[115]
1QCF	НСК	SH3, SH2, Kinasedomäne	PP1	inaktiv	[116]
1AD5	НСК	SH3, SH2, Kinasedomäne	AMP-PNP	inaktiv	[117]
2HCK	НСК	SH3, SH2, Kinasedomäne	Quercetin	inaktiv	[117]
1IEP	ABL	Kinasedomäne	STI-571	inaktiv	[118]
1FPU	ABL	Kinasedomäne	Derivat von STI- 571	inaktiv	[119]
1M52	ABL	Kinasedomäne	PD173955	aktiv (nicht phosphoryliert)	[118]
10PJ	ABL	Kinasedomäne, Myristylsäure	STI-571	inaktiv	[120]
10РК	ABL	SH3, SH2, Kinasedomäne, Myristylsäure	PD166326	inaktiv	[120]
10PL	ABL	Myristylsäure , SH3, SH2, Kinasedomäne (N-Terminus bis 531)	PD166326	inaktiv	[120]
1BYG	CSK	Kinasedomäne	Staurosporin	inaktiv	[121]
1K9A	CSK	<i>Full-length</i> (SH3, SH2, Kinasedomäne)	_	aktiv und inaktiv	[7]

2.3.5 Regulation durch SH2 und SH3 Domäne

Die Röntgenstrukturen von Src und weitere Untersuchungen erklären den Mechanismus der Aktivierung [*111, 122, 123*]. Dies geschieht durch Dephosphorylierung des C-terminalen Tyr529 und die Bindung von Liganden an die SH2 und/oder SH3 Domäne. Dadurch wird die enge Bindung der Domänen aneinander aufgehoben. Um die volle Aktivität zu erhalten, erfolgt daraufhin eine Phosphorylierung an Tyr418 des Aktivierungsloops der Kinasedomäne (Abb. 2.10). Eine Röntgenstruktur, die die Konformation und Anordnung der einzelnen Domänen in einem aktiven Zustand zeigt, wurde beschrieben, aber bisher noch nicht veröffentlicht [*124*].



Abb. 2.10 Aktivierung von Src durch Dephosphorylierung von pTyr529 und Phosphorylierung von Tyr418. An die SH2 und SH3 Domänen können andere Proteine gebunden werden. Nach [*122*].

2.3.6 Zelluläre Lokalisation

Src wird in allen Geweben exprimiert, obwohl man in Blutplättchen, Neuronen und Osteoclasten 5-200-fach höhere Expressionslevel als in den übrigen Zellen findet [96]. Erhöhte Expressionslevel sind auch in Krebszellen zu finden (Abschnitt 2.2.8). Es existieren zwei Transkriptionsvarianten, die aber für das gleiche Protein kodieren.

Die zelluläre Lokalisation von Src wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Inaktives Src ist häufig an der endosomalen Membran zu finden, während die aktive Form an der Plasmamembran und in *Focal Adhesion* Komplexen zu finden ist [125]. Diese Veränderungen in der Lokalisation wird durch die SH3-Domäne vermittelt und erfordert eine aktive/offene Konformation [125]. Häufig ist Src an größeren Komplexen beteiligt, zum Beispiel mit FAK und Grb2 [104]. Die N-terminale Myristylierungsstelle und basische Aminosäuren am N-

Terminus sind Voraussetzung für die Membranbindung [*126-129*]. Bestimmte Signale können eine Translokation von der Membran bewirken [*70*].

2.3.7 Inhibitoren und Aktivatoren von Src

Src kann *in vitro* durch das Peptid A gehemmt werden. Es entspricht der Src-Sequenz von 139-159, dem SH3-SH2-Linker. Diese Hemmung ist nicht kompetitiv zu ATP oder Substrat. *In vivo* existiert ein natürlicher Inhibitor, *c-Cbl*. Die Proteintyrosin bindende Domäne (PTB-Domäne) von *c-Cbl* bindet an den phosphorylierten Aktivierungsloop von Src [*130*]. Ein Antikörper, der den Aktivierungsloop sowohl phosphoryliert als auch dephosphoryliert erkennt, inhibiert erstaunlicherweise Src nicht, sondern aktiviert Src [*131*]. *In vivo* gibt es weitere Src-Aktivatoren. Zwei Isoformen des Adapterproteins Shc (P66 und P52) können Src aktivieren [*132*]. Auch bestimmte G-Proteine und β -Arrestin-1 können mit der katalytischen Domäne von Src interagieren und die Aktivität erhöhen [*130*].

2.3.8 Src und Krebs

Mutationen in fast allen Teilen des Proteins können zur Disregulation, konstitutiver Aktivität und somit zu Zelltransformation und damit zu Krebs führen. *v-Src* zum Beispiel ist kürzer, es fehlt ein Teil des C-Terminus mit Tyr529, das in der phosphorylierten Form an die SH2 Domäne bindet und die Kinase so in einer inaktiven Konformation hält. Dadurch ist die Kinase nicht mehr regulierbar, permanent aktiv und in der Lage, Wachstumssignale weiterzuleiten. Eine ähnliche Verkürzung zusammen mit einer Aktivierung ist bei fortgeschrittenen Kolonkarzinomen beschrieben [*133*].

Weitere Mechanismen von Src-Aktivierung in Krebszellen sind eine erhöhte Dephosphorylierung von Tyr529 durch Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs), eine erniedrigte zelluläre Expression von CSK (C-terminale Src Kinase), die Verdrängung intramolekularer Wechselwirkungen mit den SH Domänen, eine Fehlfunktion in der intrazellulären Lokalisation, erhöhte Expressionslevel oder ein verringerter Abbau [98].

In Kolonkarzinomen findet man häufig eine erhöhte Src-Aktivität [134, 135]. In geringerem Umfang ist dies auch schon in früheren Stadien und Adenomen zu beobachten, wobei die Src-Aktivität mit der Tumorprogression korreliert [136, 137]. Welche Rollen genau Src in der Tumorentstehung spielen kann, ist allerdings noch nicht vollständig geklärt [98].

Auch bei Brustkrebs und anderen epithelialen Krebsarten (wie Ovar-, Lungen-, Speiseröhrenund Magenkrebs) sowie daraus abgeleiteten Zelllinien wurde in vielen Fällen eine erhöhte Src-Aktivität festgestellt [138-145].

2.3.9 Src-Inhibitoren in der Therapie

Aufgrund der Überexpression und Überfunktion von Src in vielen Tumorarten ist es ein großes Ziel der Pharmaindustrie, Src-Kinase-Inhibitoren für die Krebstherapie zu entwickeln [101]. Außerdem werden Src-Kinase-Inhibitoren für die Anwendung bei Osteoporose entwickelt [146-148].

Inhibitor-Kokristall-Strukturen mit dem Target-Protein können den Bindungsmodus aufzeigen und sind eine Voraussetzung für strukturbasiertes Design.

2.4 Kinase-Inhibitoren

2.4.1 Enzymkinetik der Inhibition

Inhibitoren binden an ein Enzym und blockieren es. Dies kann kompetitiv zum Substrat oder allosterisch sein. Außerdem unterscheidet man zwischen reversiblen und irreversiblen Hemmstoffen. In den meisten Fällen handelt es sich um eine reversible, kompetitive Inhibition.

Die Bindungskonstante K_i und der IC₅₀-Wert charakterisieren die Bindungsaffinität des Inhibitors und das Ausmaß der Hemmung des Enzyms durch den Inhibitor.

Die Bindungskonstante des Inhibitors ist durch folgende Gleichung gegeben:

 $K_{i} = \frac{[Ligand] \cdot [Protein]}{[Ligand \cdot Protein]}$

 K_i ist mit der freien Bindungsenthalpie ΔG durch folgende Gleichung verknüpft:

 $\Delta G = RT \cdot \ln K_i$ mit R = allgemeine Gaskonstante, T = Temperatur [K]

Die Bindungskonstante K kann mit kalorimetrischen Methoden (ITC) bestimmt werden. Das Protein wird mit dem Liganden titriert, die freiwerdende Reaktionswärme bei jedem Titrationsschritt gemessen und ΔH berechnet. Unter Verwendung weiterer Gleichungen wie $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ und $\Delta G = RT \cdot \ln K_i$ kann die Bindungskonstante K berechnet werden [*149*, *150*]. In der Praxis wird häufig nicht die Inhibitionskonstante (K_i-Wert), sondern der IC₅₀-Wert bestimmt. Das ist die Enzymkonzentration, bei der 50 % der Enzymaktivität gehemmt wird. IC_{50} -Werte können mit enzymatischen Assays bestimmt werden. Dabei ist der IC_{50} -Wert abhängig von der eingesetzten Enzymkonzentration, läuft aber im Allgemeinen parallel zur Bindungskonstante.

2.4.2 Ligandenbindung

Die Bindung von Liganden an Proteine kann auf unterschiedlichen Wechselwirkungen beruhen: Wasserstoffbrücken, ionische Wechselwirkungen (Salzbrücken), Metallkomplexierung, hydrophobe (van-der-Waals) Wechselwirkungen und π - π -Wechselwirkungen zwischen Aromaten. Da alle Wechselwirkungen in wässrigen Medien stattfinden und auch die Bindetasche des Enzyms mit Wasser gefüllt ist, ist der Einfluss des Wassers nicht zu unterschätzen. Entropische Beiträge, über den Verlust von Freiheitsgraden, sind ebenfalls zu berücksichtigen. Deshalb sind starre Liganden bevorzugt, da der Verlust an Freiheitsgraden geringer ist. Nicht immer korreliert die Bindungsaffinität mit dem Beitrag der H-Brücken. Allerdings sollten polare Atome in der Bindetasche immer abgesättigt sein. Die hydrophoben Wechselwirkungen leisten einen Beitrag von ca. 100 bis 200 J/mol pro Å² lipophiler Kontaktoberfläche. Beim Design von Wirkstoffen und Liganden sind folglich sowohl hydrophile als auch hydrophobe Wechselwirkungen zu beachten [151].

2.4.3 Kinase-Inhibitoren als Targets in der pharmazeutischen Forschung

In der pharmazeutischen Industrie sind Proteinkinasen bedeutende Targets in der Onkologie [152]. Seit den ersten Isochinolinderivaten, die PKC-Inhibition zeigten [153], und natürlichen Kinase-Inhibitoren wie Staurosporin (aus *Streptomyces*-Arten) [154-156] und Balanol (aus *Verticillium balanoides* und *Fusarium* Arten) [157, 158] sind viele Kinase-Inhibitoren synthetisiert worden und einige befinden sich in klinischen Phasen [152]. Derzeit finden nur wenige Kinase-Inhibitoren als Therapeutika Einsatz. Fasudil (HA-1077) ist seit 1995 in Japan für die Behandlung von cerebralen Vasospasmen auf dem Markt. STI-571 (Glivec®) ist seit 2001 für die Behandlung einer bestimmten Form von Leukämie (CML, chronischmyeloischer Leukämie) zugelassen, ZD1839 (Iressa®) für Lungenkrebs (NSCLC, nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom). Target von STI-571 ist BCR-Abl, Target von ZD1839 ist EGFR. Inhibitoren von p38 MAP Kinase werden zur Anwendung bei rheumatoider Arthritis entwickelt [159, 160].

Die Entwicklung von selektiven Inhibitoren ist wichtig, um Nebenwirkungen zu vermeiden. In der molekularbiologischen Forschung werden Inhibitoren zur Aufklärung von Signaltransduktionswegen benutzt. Auch hier ist die Selektivität wichtig, um die beobachteten Effekte eindeutig einem Enzym zuzuschreiben. Proteinkinase-Inhibitoren sind meist ATP-kompetitiv und versuchen, die spezifischen Wechselwirkungen zwischen ATP und Enzym nachzuahmen. Wie unter 2.2.3 beschrieben, findet man viele konservierte Reste in der ATP-Bindetasche. Doch vor allem in der Adenintasche ist eine Variation vorhanden. Dies könnte ATP-Bindungs- und ADP-Freisetzungsraten beeinflussen. Diese Variation kann zu funktionellen Unterschieden führen oder einfach nur ein Zeichen von geringerem Evolutionsdruck sein. Auf jeden Fall bietet es die Möglichkeit, selektive Inhibitoren zu finden, die Gebrauch von diesen kleinen Unterschieden in Form und Ladung der Bindetasche machen. Auch der Kinase-Inhibitor STI-571 (Glivec®), der zur Behandlung von chronisch-myeloischer Leukämie eingesetzt wird, hat gezeigt, dass es durchaus möglich ist, affine und selektive Inhibitoren zu finden. In diesem Fall bindet der Inhibitor an eine inaktive Konformation der Kinase, die sich deutlicher von anderen Kinasen unterscheidet als die aktive Form und von diesen nicht eingenommen werden kann.

2.5 Kristallographie und Röntgenstrukturanalyse

Die Grundlage für strukturbasiertes Wirkstoffdesign ist eine Struktur des Target-Enzyms.

Es gibt verschiedene Methoden, um die Struktur von Makromolekülen zu bestimmen. Dazu zählen die Röntgenstrukturanalyse und NMR.

NMR kann Moleküle direkt in Lösung vermessen. Allerdings liegt die Grenze für die Strukturbestimmung derzeit bei ca. 35 kDa.

Um die Raumstruktur mit der Röntgenstrukturanalyse aufzuklären, muss das Protein zuerst kristallisiert werden. Dies geschieht durch Ausfällen des Proteins aus einer übersättigten Lösung (zum Beispiel durch Änderung des Lösungsmittels, der Temperatur, pH-Wertes oder der Ionenstärke). Im nächsten Schritt werden durch die Beugung von Röntgenstrahlung am Kristall Beugungs- oder Diffraktionsmuster erzeugt, die ein Abbild der Struktur sind. Daraus wird nach Lösung des Phasenproblems die Elektronendichte durch Fourier-Transformation berechnet. In diese Elektronendichte kann dann ein atomares Modell der Proteinstruktur eingepasst werden. Details sind in entsprechenden Fachbüchern nachzulesen [*161-165*].

2.6 Ziele und Inhalte der Arbeit

PKA und Src sind prominente und gut untersuchte Vertreter in der Familie der Serin/Threonin- bzw. Tyrosinkinasen.

PKA wird zusammen mit diversen Kinase-Inhibitoren nach bekannten Bedingungen kokristallisiert, die Röntgenstruktur der Komplexe gelöst und die Inhibitorbindung analysiert. Die verwendeten Inhibitoren sind teilweise spezifisch für nah verwandte Kinasen aus der AGC-Familie wie z.B. PKB, PKC oder Rho-Kinase. Lange Zeit war PKA die einzige Kinase in der AGC-Familie, deren Struktur bekannt war. Erst in den letzten beiden Jahren wurden die Strukturen der Kinasedomänen von PKB/Akt [73, 166], PDK1 [77] und Aurora [167] gelöst. So lange keine dieser Kinasen für strukturelle Untersuchungen von Inhibitor-Komplexen zugänglich ist, kann PKA als Modell- oder Ersatz-Kinase dienen. Kinase-Inhibitoren verwandter Enzyme werden mit PKA kokristallisiert und die Kristallstrukturen auf den Bindungsmodus hin analysiert. Homologie-Modelle können erzeugt und zum Vergleich benutzt werden. Mutanten von PKA mit gezielten Austauschen in der Bindetasche machen sie einer anderen Kinase ähnlicher. Mit Inhibitonskonstanten für die Mutanten kann der Einfluss bestimmter Aminosäuren untersucht werden. Außerdem werden die Mutanten unter den gleichen Bedingen wie PKA kokristallisiert und die Strukturen zur weiteren Analyse und zum Vergleich verwendet. Selektivitätsmechanismen werden diskutiert. Die PKB-Inhibitoren sind vom Naturstoff Balanol abgeleitet und extensiv modifiziert worden. Offenkettige Derivate vom universellen Kinase-Inhibitor Staurosporin sind Bisindolylmaleimide, die vor allem PKC inhibieren. Die Rho-Kinase-Inhibitoren leiten sich von der Reihe der H-Inhibitoren ab und sind chemisch gesehen Isochinolinderivate.

Die Kinasedomäne von Src wird kristallisiert und die Röntgenstruktur gelöst. Unterschiedliche Kristallisationsbedingung führen zu Kristallen in verschiedenen Raumgruppen. Inhibitoren und ATP-Analoga werden mit Src kokristallisiert, die Röntgenstrukturen gelöst und die Komplexe analysiert. Die Analyse der Proteinstruktur erfolgt auch im Vergleich zu bereits bekannten Strukturen der Src-Familie.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Sämtliche verwendete Chemikalien und Enzyme wurden, soweit nicht anders angegeben, von folgenden Herstellern bezogen: Biomol (Hamburg), BioRad (München), Fluka (Neu-Ulm), Hampton Research (Laguna Niguel, USA), Merck Eurolab GmbH (Darmstadt), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), New England Biolabs (Schwalbach), Serva (Heidelberg), Sigma Aldrich (Deisenhofen/ Irvine UK). Bacto-Agar, -Trypton, -Hefeextrakt stammten von Difco (Detroit).

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Plastik- und Verbrauchsmaterialien stammten von Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickenhausen), Nalgene Nunc (Wiesbaden) und Roth (Karlsruhe). Ultra- und Sterilfiltrationseinheiten wurden von Millipore (Eschborn) und Pall Gelman Sciences (Ann Arbor, USA) bezogen. Chromatographiematerialien stammten von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg/Uppsala, Schweden), BioRad (München) und Merck Eurolab GmbH (Darmstadt). Kristallisationszubehör wurde von Hampton Research (Laguna Niguel, USA) erworben.

3.1.3 Inhibitoren

ATP und ATP-Analoga wurden von Sigma bezogen. Käufliche Proteinkinase-Inhibitoren wie Sangivamycin, Y-27632, H-Inhibitoren, verschiedene Bisindolylmaleimide, Purvalanol A und PP2 stammten von Calbiochem. PKB-Inhibitoren und Src-Inhibitoren wurden von Dr. B. Masjost, Dr. W.-G. Friebe und Dr. S. Scheiblich sowie deren Mitarbeitern (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

3.1.4 Peptide

Das Peptid PKI(5-24) mit der Sequenz TTYADFIASGRTGRRNAIHD und die Substratpeptide für Src mit der Sequenz AEEEIYGEFEAKKKK wurden von Dr. C. Seidel und Dr. A. Escherich (Roche Diagnostics GmbH) mit Standard Fmoc-Peptidchemie
synthetisiert und durch präparative RP-HPLC gereinigt. Die Peptide waren C-terminal amidiert. Die Identität und Reinheit wurde mit ESI-Massenspektroskopie bestätigt.

Zur Affinitätschromatographie wurde PKI(5-24) nach Vorschrift an Affi-Gel (Biorad) gekoppelt.

3.1.5 Geräte

Gerät	Hersteller
Äkta Explorer, Äkta-FPLC	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Analysenwaage, Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Branson Sonifier 250	Fa. G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Dioden-Array Photometer DU 7500	Beckman, München
DynaPro Dynamic Light Scattering Instrument	Protein Solutions, Lakewood, USA
Elektronische Fein- und Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Envision 2100 Reader	Perkin Elmer, Weiterstadt
pH-Meter pH 211	Hanna instruments, Kehl am Rhein
Schüttelinkubator Minitron	Infors, Bottmingen, Schweiz
Spectrophotometer Lambda 17	Perkin Elmer, Weiterstadt
Thermomixer	Eppendorf
VP-ITC	Microcal
Zentrifugen	Beckman, Sorvall, Eppendorf
ZetasizerNano	Malvern Instruments Ltd., Worchestershire

Zur Datenverarbeitung wurden Silicon Graphics (SGI) *work stations* und *compute server* (IRIX) sowie IBM-kompatible PCs (Microsoft Windows 2000 oder XP und Suse Linux 8.0 bis 8.2) verwendet.

3.1.6 Puffer, Lösungen und Nährmedien

PKA-Expression und Reinigung

LB Medium	10 g/l Bacto Tryptone, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl
LB Agar	10 g/l Bacto Tryptone, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 12,0 g/l Bacto-Agar
IPTG-Lösung	0,1 M IPTG (0,5 g/20 ml)
Ampicillin-Lösung (1000x)	1 g/10 ml in 50 % EtOH
Lysepuffer	50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 30 mM MES pH 6,5
	ggf. Lysozym, DNAse
TMN50-Puffer	50 mM NaCl, 2 mM MgCl ₂ , 20 mM TrisHCl pH 7,4
TMN250-Puffer	250 mM NaCl, 2 mM MgCl ₂ , 20 mM TrisHCl pH 7,4
Elutionspuffer PKI-Säule	200 mM Arginin, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM TrisHCl pH 7,4

ATP-Lösung	100 mM ATP pH 7,0
Puffer A – IEC	20 mM BisTrisPropan pH 8,5
Puffer B – IEC	20 mM BisTrisPropan pH 8,5, 1 M LiCl

3.1.7 Bakterienstämme und Plasmide

Zur Expression rekombinanter Proteine wurden Derivate des *E. coli* Stammes K12 verwendet: BL21DE3 und BL21 Star[™] DE3 Zellen von Invitrogen.

Ein pT7-7 Plasmid mit der Sequenz von PKA Cα (bovin) wurde von Dr. D. Bossemeyer (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

Grundlegende molekularbiologische Arbeiten wurden entsprechend Sambrook und Russell [168] durchgeführt.

Punktmutanten von PKA (PKABx) wurden mit dem Quick Change Kit (Stratagene) nach der Vorschrift und unter Verwendung des pT7-7-PKA Plasmids und geeigneter Primer von Dr. M. Gassel (DKFZ, Heidelberg) hergestellt. Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung bestätigt. Tabelle 3.1 gibt Auskunft über die verfügbaren Mutanten:

Tabelle 3.1 Übersicht über die PKAB-Mutanten

Mutante	Austausche				
PKAB2	Val123Ala	Leu173Met			
PKAB3	Val123Ala	Leu173Met	Gln181Lys		
PKAB4	Val123Ala	Leu173Met		Gln84Glu	Phe187Leu
PKAB5	Val123Ala	Leu173Met	Gln181Lys	Gln84Glu	Phe187Leu

3.2.2 Expression in E. coli Stämmen

Das Gen für bovine cAMP-abhängige Protein Kinase katalytische Untereinheit C α , im folgenden PKA genannt, ist in einem pT7-7 Expressions-Vektor kloniert, und wurde in dieser Form von Dr. D. Bossemeyer (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt [*169*]. Dabei unterscheiden sich bovines und humanes Protein in zwei Aminosäuren, nämlich Asn32Ser und Met63Lys.

Der pT7-7 Vektor enthält ein Resistenzgen, das für β-Lactamase codiert, und einen T7-Promotor, in dessen Abhängigkeit das klonierte Gen steht. β-Lactamase spaltet und inaktiviert Ampicillin und andere Penicilline. Bakterien, die dieses Gen besitzen, sind resistent und können in Antibiotikum-haltigen Medien wachsen, was zur Selektionierung ausgenutzt wird. Der T7-Promotor steuert die Expression des Fremdgens (PKA) in Abhängigkeit von der T7-RNA-Polymerase. Deren Expression und somit die Expression der PKA kann in *E. coli* BL21DE3 Zellen durch IPTG-Zugabe (lacUV-Promotor) induziert werden.

3.2.3 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Chemisch kompetente *E. coli* BL21DE3 Zellen wurden nach der CaCl₂-Methode [*168*] hergestellt und in 100 µl Aliquots bei −80 °C gelagert. Teilweise wurden auch chemisch kompetente BL21 StarTM DE3 Zellen von Invitrogen verwendet.

Für die Transformation wurden Aliquots vorsichtig (ca. 1 h) auf Eis aufgetaut, Plasmid hinzugefügt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 1 min bei 42 °C wurde 1 ml LB-Medium hinzugegeben und weitere 60 min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf einer Ampicillin-haltigen Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

3.2.4 Kultivierung transformierter Zellen

Mehrere transformierte Einzelkolonien wurden in 50-100 ml autoklaviertes LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (Ampicillin oder Carbenicillin) überführt und mehrere Stunden, bis zu einer OD^{600} von ca. 2,0 bei 37 °C in 250 ml Schüttelkolben mit Schikane inkubiert. Mit je 5 ml dieser Vorkultur wurde 11 ebenfalls Antibiotikum-haltiges Medium angeimpft und die Zellen bis zu einer $OD^{600}=0,6$ bei 37 °C inkubiert. Die Temperatur wurde dann auf 25 °C abgesenkt und die Expression bei $OD^{600}=0,9$ mit 0,5 mM IPTG induziert. 15 h nach der Induktion werden die Zellen abzentrifugiert und aufgeschlossen.

3.2.5 Zellaufschluss

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1 h bei 4000 g) abgetrennt und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in Lysepuffer resuspendiert und anschließend mit Ultraschall aufgeschlossen. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Ultrazentrifugation abgetrennt und der lösliche Überstand der weiteren Reinigung zugeführt.

3.2.6 Reinigung von PKA

3.2.6.1 Affinitätschromatographie

Im ersten Schritt wurde PKA durch Affinitätschromatographie aus dem gesamten Zellextrakt isoliert [*22, 52*]. Dazu wurde das Pseudosubstrat Peptid PKI(5-24) nach Vorschrift an Affi-Gel gekoppelt und mit TMN50-Puffer äquilibriert. Da die Bindung von PKA ATP-abhängig erfolgt, wurden Mg²⁺ und ATP im mM Bereich zugegeben, anschließend mit dem Affi-Gel 1 h bei 4 °C inkubiert und schließlich in Leersäulen gegossen. Der Durchlauf wurde aufgehoben und nochmals mit frischem Material inkubiert. Nach Waschen mit ATP-haltigem TMN-50 und anschließend TMN-250 Puffer, konnte PKA mit 200 mM Arginin enthaltendem Elutionspuffer eluiert werden. Dies geschieht durch kompetitive Verdrängung, da die Bindung über eine argininreiche Sequenz erfolgt.

3.2.6.2 Ionenaustauschchromatographie

In *E. coli* wird PKA an unterschiedlichen Stellen phosphoryliert. Diese unterschiedlichen Formen können mit einem Anionenaustauscher getrennt werden [*22, 59*]. Dazu wurde eine MONO-S Säule mit 20 mM BisTrisPropan-Puffer pH 8,5 äquilibriert, Protein auf die Säule aufgetragen und mit einem LiCl-Gradienten von 0 bis 300 mM eluiert.

3.2.7 Elektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dazu werden die Proben mit Probenpuffer versetzt und erhitzt. Die Probe wird so denaturiert und negativ geladen. Sie wird zusammen mit einem Marker aufgetragen und kann im elektrischen Feld auf dem Gel getrennt werden. Die Proteine können dann mit Coomassie-Lösung gefärbt werden. So sind eine Bestimmung des Molekulargewichts und eine Prüfung des Reinheitsgrades möglich.

3.2.8 Proteinbestimmung

3.2.8.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf Bildung eines blauen Farbstoffes bei der Bindung von aromatischen und basischen Aminosäuren [170]. Fertiges Bradford-Reagenz (Biorad) wird unmittelbar vor Gebrauch mit destilliertem Wasser 1:5 verdünnt. Je 1 ml wird in einer Plastikküvette mit Proteinlösung gemischt und die Absorption nach 5 min bei 595 nM gemessen. Die Proteinkonzentration wird mit einer BSA-Eichkurve ermittelt.

3.2.8.2 Proteinbestimmung mit dem Absorptionskoeffizienten

Um die Proteinkonzentration (insbesondere für ITC) exakt zu bestimmen, wird ein Spektrum der Proteinlösung gegen den Puffer aufgenommen. Aus der Extinktion (E) bei 280 nM wird die Konzentration (c) mit einem theoretisch berechneten Extinktionskoeffizienten (ϵ) [171] aus dem Lambert-Beerschen-Gesetz E = c·d· ϵ (mit der Schichtdicke d=1 cm) bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient für PKA ist ϵ = 52150 M⁻¹ cm⁻¹.

3.2.9 Kristallisation

Kristallisationsansätze wurden vorwiegend nach der *sitting* oder *hanging drop*-Methode durchgeführt, die beide auf Dampfdiffusion beruhen [172]. Reines, homogenes, ankonzentriertes Protein wird dabei in einem kleinen Tropfen (1-2 µl) mit einem Teil des Reservoirs, das das Präzipitans enthält, über einer größeren Menge (300-600 µl) Reservoir in einem abgeschlossenen Raum inkubiert. Als Reservoir werden organische Lösungsmittel, Makromoleküle (PEGs), konzentrierte Salzlösungen und Puffer verschiedener pH-Werte als Präzipitans in verschiedenen Kombinationen verwendet (*sparse matrix screens*) [173, 174]. Bedingungen, unter denen Kristalle erhalten werden, können dann weiter verfeinert werden. Im Rahmen der Optimierung von Kristallbedingungen wurden auch Methoden wie *Seeding* [175, 176], Kristallisation im Gel [177] oder unter Öl (*Microbatch*) [178-180] angewendet. Für PKA konnten Bedingungen (15 % Methanol) der Literatur entnommen und angepasst werden [22, 25].

3.2.10 X-ray, Datensammlung

Die bei 4 °C gewachsenen PKA-Kristalle wurden in eine Kapillare geeigneter Größe geerntet, der Kristall getrocknet und an einem Ende der Kapillare etwas Mutterlösung platziert. Dann wurde die Kapillare an beiden Seiten mit Wachs verschlossen. Die Kristalle wurden bei 4 °C über 2 bis 3 Tage an einem Rigaku R200 Röntgengenerator (λ =1,5418 Å) mit einem Bruker X1000 Flächendetektor oder einer Mar2000 Image Plate (Mar Research, Hamburg) gemessen. Alternativ wurden die Kristalle mit einem Loop aus dem Tropfen geerntet, kurz in einen Kryopuffer getaucht und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Dort wurden sie bis zur Messung gelagert. Der Kryopuffer besteht entweder aus 30 % MPD oder einer Mischung aus einem Teil (R,R)-(-)-2,3-Butandiol, zwei Teilen 15 % Methanol und sechs Teilen Mutterlösung. Die Kristalle wurden bei 100 K an einem Rigaku R200 Röntgengenerator mit einem Mar Image Plate Detektor oder am Synchrotron mit einem CCD-Detektor (Mar Research, Hamburg) gemessen.

Alle Src-Kristalle wurden mit dem Loop aus dem Tropfen geerntet, kurz in eine Lösung von 30 % Ethylenglycol getaucht und im Stickstoffstrom bei 100 K direkt an der Messapparatur gefroren. Die Datensammlung erfolgte am Synchrotron entweder am DESY (Hamburg) oder SLS (Villigen, Schweiz).

Datenauswertung (Indizierung, Bestimmung der Kristallorientierung, Raumgruppe, Zellkonstanten, Integration und Skalierung der Intensitäten) erfolgte mit den Programmen Astro/Saint bzw. Mosflm/Scala/Truncate (CCP4) bzw. XDS [*181, 182*].

3.2.11 Strukturlösung und Verfeinerung

Alle Strukturen konnten mit der Methode des *Molecular Replacement* (Faltmolekülmethode [183]) gelöst werden. Dazu wurden die Programme AMoRe und MolRep (CCP4) benutzt [184, 185], um die Position des Modells in der Elementarzelle durch Rotations- und Translationssuche im Pattersonraum zu bestimmen. Geeignete Modelle wurden der Proteindatenbank (PDB) entnommen.

Für die Verfeinerung wurde Refmac 5.1.24 (*maximum likelihood* Algorithmus) (CCP4) [*186-188*] verwendet. Für die Darstellung und zum Einpassen der Atommodelle in die Elektronendichte wurden Moloc (www.moloc.ch) [*189*] und Main [*190*] benutzt.

3.2.12 Graphische Darstellung

Zur graphischen Darstellung und für Abbildungen wurden Moloc, Main, Swiss-Pdb Viewer, WebLab-Viewer, Insight II, Adobe Photoshop, Molscript, Bobscript, Raster3d und Grasp verwendet. Alscript, GCG und Server-Applikation im www wie BLAST, ClustalW wurden für Sequenzvergleiche benutzt.

3.2.13 IC₅₀-Bestimmung mittels FP-Assay

Für die Enzymkinetik von PKA wurde rekombinant hergestelltes Protein verwendet, das allerdings nur durch Affinitätschromatographie gereinigt wurde und somit gemischt phosphoryliert ist.

Der enzymatische Assay beruht auf einem käuflichen PKC-Assay Kit (Panvera®), der von Dr. G. Achhammer und U. Thomas (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) angepasst wurde. Es handelt sich dabei um einen Fluoreszenzpolarisationsassay (FP-Assay). In der Kinasereaktion wird vom eingesetzten Enzym (PKA) unter ATP ein Substrat (PKC-Substrat-Peptid) phosphoryliert. Nach dem Abstoppen der Reaktion, wird zur Detektion gelabeltes phosphoryliertes Substrat (Tracer) sowie ein spezifischer Antikörper gegen phosphoryliertes Substrat zugegeben. Substrat und Tracer kompetieren um den Antikörper. Tracer mit Antikörper weisen eine höhere Polarisation als freie Tracer auf. Die FP korreliert also umgekehrt mit der Menge des gebildeten Substrats und somit auch umgekehrt mit der Kinaseaktivität.

Die benötigte Menge an Enzym und ATP, K_M sowie die Zeitdauer der Inkubation wurden in Vorversuchen bestimmt. Die Inhibitoren wurden dann in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt und die dazugehörigen FP-Werte gemessen. Die resultierenden Kurven wurden mit Excel und Excel-Fit gefittet und die IC₅₀-Werte daraus berechnet.

3.2.14 Bestimmung von Bindungskonstanten mittels ITC (Isothermal Titration Calorimetry)

Bei der Bindung zweier Substanzen (zum Beispiel eines Liganden an Protein) wird Wärme freigesetzt oder aufgenommen. Diese Wärme kann gemessen und daraus die Bindungsenthalpie, -entropie, Bindungskonstante und die Anzahl der Bindungsstellen bestimmt werden.

Kalorimetrische Untersuchungen wurden an gemischt phosphoryliertem PKA-Protein (wie bei den IC₅₀-Bestimmungen auch) mit einem VP-ITC-Gerät (Microcal) durchgeführt. Dazu wurde das Protein nach PKI-Affinitätschromatographie zweimal in 20 mM HEPES pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 0,1 mM CaCl₂, 50 mM KCl dialysiert. Die Proteinkonzentration betrug in allen Fällen ca. 20 μ M. Ein UV-Spektrum wurde aufgenommen und aus der Absorption bei 280 nm die Konzentration bestimmt (Abschnitt 3.2.8). Die Inhibitoren wurden soweit möglich im Dialysepuffer zu 0,5 bis 1 mM gelöst. War dies nicht möglich, wurde der Inhibitor in 100 % DMSO zu 100 mM gelöst und anschließend 1:100 im Dialysepuffer verdünnt, was einer Endkonzentration von 1 % DMSO entspricht. Gleichzeitig wurde dann dem Protein ebenfalls 1 % DMSO zugesetzt. Weitere experimentelle Parameter sind in Tabelle 3.2 zu entnehmen. Das Protein wurde stets in die Messzelle, der Inhibitor in die Titrationsvorrichtung eingefüllt. Die Messdaten wurden mit Microcal Origin 6.0 Software ausgewertet.

Number of injections	40
Temperature	20 °C
Reference Power	15
Initial delay	60 s
Injection volume	5 µl
Duration	10 s
Spacing	600 s bzw. 450 s
Filter Period	2 s

 Tabelle 3.2
 Experimentelle Parameter f
 ür die ITC Messungen.

3.2.15 DLS (Dynamic Light Scattering)

Experimente mit Dynamic Light Scattering beruhen auf der Lichtstreuung durch Partikel in einer Lösung. Nach der Brownschen Molekularbewegung bewegen sich Moleküle abhängig von ihrer Größe, der Temperatur und der Viskosität des Lösungsmittels unterschiedlich schnell. Dies wird ausgenutzt, um die Partikelgröße sowie indirekt daraus das Molekulargewicht zu bestimmen.

Für die Experimente wurde das Protein filtriert oder 10 min bei 14000 g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen, in eine Küvette gefüllt und vermessen. Dazu wurde das Gerät DynaPro (Protein Solutions) oder ZetasizerNano (Malvern) benutzt. Die Auswertung erfolgte mit der entsprechenden Software.

3.2.16 ³¹P-NMR-Untersuchungen

Die unterschiedlich phosphorylierten Formen von PKA wurden mit ³¹P-NMR untersucht. Dazu wurde das Protein auf ca. 12 mg/ml aufkonzentriert. Das Protein lag für die Messung in verschiedenen Puffern vor.

Puffer 1: 20 mM BisTrisPropan, ca. 250 mM LiCl pH 8,5

Puffer 2: 5 mM MES-BisTris, 70 mM LiCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT pH 6,9

Puffer 3: 100 mM MES-BisTris, 75 mM LiCl pH 7,0

Außerdem wurden Lösungen von 25 mM AMP-PNP, 50 mM MgCl₂ und 6 mM PKI(5-24) in Puffer 3 hergestellt und der pH-Wert überprüft.

Die NMR-Spektren wurden von M. Seifert (MPI Biochemie, NMR-Gruppe) an einem Bruker DRX 600 14,1 T Spektrometer mit einem inversen 5 mm ¹H-X Breitbandprobenkopf bei einer Temperatur von 300 K aufgenommen [*60, 191*].

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION - PROTEINKINASE A

4.1 Strukturbestimmung von Proteinkinase A–Inhibitor–Komplexen

4.1.1 Expression und Reinigung

Proteinkinase A (PKA) wurde, wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, in E. coli Zellen exprimiert und in zwei Schritten aus dem Zelllysat gereinigt. Die Reinigung wurde auf SDS-Gelen verfolgt. Zuerst erfolgt eine Affinitätschromatographie an das Pseudosubstratanalogon PKI(5-24), das PKA in Gegenwart von ATP hochaffin und selektiv über argininreiche Sequenzen bindet. Durch mehrere Waschschritte werden die Fremdproteine entfernt, bevor durch ATP-freien, Arg-haltigen Puffer PKA kompetitiv von der Säule gelöst und als bereits sehr reines Protein eluiert wird (nur eine Bande auf dem Gel, Spalte 5 und 6) (Abb. 4.1). Bei der Expression in Bakterien wird PKA posttranslational modifiziert und kann an Thr197, Ser338, Ser10 und Ser139 phosphoryliert werden. Es liegt stets ein Gemisch unterschiedlich phosphorylierter Formen vor, die für die Kristallisation getrennt werden müssen. Dies geschieht durch Anionenaustauschchromatographie (MONO-S-Säule) aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung. Die höher phosphorylierten Formen eluieren zuerst (Peak I = 4-fach, Peak II = 3-fach und Peak III = 2-fach phosphoryliert). Die Proben wurden mittels Massenspektroskopie bezüglich ihres Phosphorylierungszustands analysiert (durchgeführt von Dr. G. Achhammer, Roche Diagnostics oder MPI Massenservice). Die Trennung in die einzelnen unterschiedlich phosphorylierten Formen ist nur für die Kristallisation, nicht aber für enzymatische und biochemische Untersuchungen durchgeführt worden.

Aus 1 l Kultur kann ca. 3-4 mg PKA gewonnen werden. Je nach Charge fallen die Anteile an 3- und 4-fach phosphoryliertem Protein unterschiedlich aus und liegen bei durchschnittlich 1,5 mg.



Abb. 4.1 zeigt den Verlauf der Reinigung. Bereits nach der Affinitätschromatographie (Bande 5 und 6) liegt reines Protein vor. Die Trennung in die einzelnen unterschiedlich phosphorylierten Formen ist nur für die Kristallisation, nicht aber für enzymatische und biochemische Untersuchungen durchgeführt worden.

4.1.2 Kristallisation

Zur Kristallisation von PKA wurde ausschließlich 3- oder 4-fach phosphoryliertes Protein verwendet. Die Bedingungen sind der Literatur entnommen und angepasst [*17, 22, 25, 29*]. Die unterschiedlichen Inhibitoren (1,5 mM) wurden zusammen mit PKA (15 mg/ml), PKI(5-24) (1,5 mM) und dem Detergens MEGA-8 (1,5 mM) kokristallisiert. Für die Kristallisation wurde das Protein ankonzentriert, umgepuffert und PKI(5-24) hinzugefügt. MEGA-8, Pufferlösung und in Methanol oder DMSO gelöster Inhibitor wurden separat zusammengestellt. Zur Kokristallisation wurden die beiden Lösungen auf einem Deckglas gemischt und über ein Reservoir mit 9-18 % Methanol bei 4 °C gehängt (*hanging drops*). *Seeding* erfolgte bei Bedarf nach 2-15 h.

Die Kristallisation von PKAB-Mutanten erfolgte analog zu PKA. Im Fall der PKAB4-Mutante wurde teilweise auch 2-fach phosphoryliertes Protein verwendet.

Der Inhibitor, die Methanolkonzentration und der pH-Wert haben einen großen Einfluss auf die entstehenden Kristalle (Abb. 4.2). Durch *Seeding* konnten die Kristalle optimiert werden.



Abb. 4.2 Diverse PKA Kristalle wachsen unterschiedlich, je nach Inhibitor- und Präzipitanskonzentration (Methanol).

4.1.3 Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung

Die Datensammlung erfolgte wie im Abschnitt 3.2.10 beschrieben. Die Kristalle wachsen bei 4 °C in *hanging drops* über 15-18 % Methanol als Reservoir. Sie wurden in der Kapillare geerntet und bei dieser Temperatur auch gemessen. Ein einzelner Kristall war jeweils ausreichend für einen kompletten Datensatz. Nachdem dieser 4 °C-Messraum nicht mehr zur Verfügung stand, wurden Bedingungen gesucht, unter denen die Kristalle eingefroren werden konnten. Dabei zeigte sich, dass die Kristalle sehr sensibel auf Temperaturschwankungen reagieren und im Kristallisationsraum bei 4 °C direkt in flüssigem Stickstoff gefroren werden müssen. Zwei Kryopuffer erwiesen sich als geeignet: eine Mischung aus einem Teil (R,R)-(-)-2,3-Butandiol, zwei Teilen 15 % Methanol und sechs Teilen Mutterlösung oder eine 30 % Lösung von 2-Methyl-2,3-Pentandiol. Der Großteil der in der Kapillare gemessenen Kristalle zeigte die gleiche Raumgruppe mit sehr ähnlichen Zellkonstanten und gleicher Kristall-

packung. Beim Einfriervorgang können sich die Zellkonstanten etwas ändern. Durch den Pufferwechsel kann der Kristall schrumpfen oder wachsen. Auch die Mosaizität ist bei den gefrorenen Kristallen höher.

Alle Strukturen konnten mit *Molecular Replacement* gelöst werden. Die erste Struktur, ein Komplex aus PKA, PKI(5-24) und Inhibitor R25, wurde mit 1CDK aus der Proteindatenbank [17] gelöst, alle weiteren mit der verfeinerten Struktur des Komplexes mit R25 ohne die Inhibitoratome und Wasser. Zum Teil konnten die Koordinaten auch direkt verwendet werden. Danach erfolgte ein *Rigid body Refinement* (Refmac) bei dem der *N-lobe* (10-123), *C-lobe* (124-315), C-Terminus (316-350) und PKI(5-24) als getrennte Domänen definiert wurden. Die weitere Verfeinerung wurde mit Refmac (*restrained refinement*) durchgeführt. Meist waren nur geringfügige Änderungen von Proteinseitenketten nötig. Der Einbau von Wasser erfolgte mit einer automatischen Suche in der Differenzelektronendichte (CCP4-Programme peakmax und watpeak). Alle gefundenen Wassermoleküle wurden überprüft und gegebenenfalls entfernt oder weitere manuell hinzugefügt. Zuletzt erfolgte der Einbau des Inhibitors. Die Datei mit den Parametern der Inhibitorgeometrie wurde mit dem CCP4 Monomer Library Sketcher erstellt und anschließend manuell korrigiert.

4.1.4 Enzymkinetik, IC₅₀-Bestimmung und K_i-Bestimmung

Die Bindungsaffinität der verwendeten Inhibitoren wurde auf zwei Arten bestimmt. Zum einen mit einem kinetischen Assay, einem Fluoreszenz-Polarisations Assay (Abschnitt 3.2.12), mit dem IC₅₀-Werte ermittelt wurden. Zum anderen konnte mit einer kalorimetrischen Methode (ITC) (Abschnitt 3.2.13) neben der Bindungskonstante K auch Enthalpie (Δ H) und Entropie (Δ S) bestimmt werden.

Tabelle 4.1 zeigt die Ergebnisse der IC_{50} -Messungen. Die K_i-Werte aus den ITC-Messungen werden zusammen mit den Strukturen der entsprechenden Inhibitor-Komplexe analysiert.

Inhibitor	R01	R02	R03	R05	R11	R12	R14	R15	R21	R22	R23
IC ₅₀ PKA [nM]	8	2	39	47	10	94	4900	3	26	9	12

 Tabelle 4.1
 IC₅₀-Werte der Inhibitoren

Inhibitor	R24	R25	R26	R27	R31	R32	R33	R35	R41	R42	R43
IC ₅₀ PKA [nM]	46	64	15	480	1400	260	1900	2700	1300	19000	1600

4.2 Kokristallstrukturen von Rho-Kinase-Inhibitoren und PKA: Y-27632, HA-1077 und H-1152P

Röntgenstrukturen von Proteinkinase-Inhibitor-Komplexen zeigen die intermolekularen Wechselwirkungen auf, die für die Ligandenbindung verantwortlich sind und ermöglichen so strukturbasiertes Wirkstoffdesign und –optimierung. Bis heute wurden Kristallstrukturen von nur etwa 30 Kinasen gelöst, das sind weniger als 6 % der 518 Kinasen im menschlichen Genom [1]. PKA kann als Modell- oder Ersatzkinase fungieren, wenn nahe verwandte Kinasen nicht exprimiert oder kristallisiert werden können.

Rho-Kinase, eine Serin/Threonin-Kinase der AGC-Gruppe, ist mit den anderen AGC-Familienmitgliedern wie PKA, PKB, PKC und PKG eng verwandt. Bis heute ist noch keine Struktur von Rho-Kinase bekannt. Der hohe Verwandtschaftsgrad (37 % konserviert) und die gut etablierten Kristallisationsbedingungen machen PKA zu einem guten Modell, um den Bindungsmechanismus und die Selektivität von Rho-Kinase-Inhibitoren zu analysieren.

Zur Vereinfachung werde ich den Begriff Rho-Kinase für beide Enzyme dieser Familie benutzen: Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase p160ROCK (Gen: ROCK-I; TrEMBL ID Q13464, [192]) und Rho Kinase (Gen: ROCK-II; TrEMBLE ID Q9UQN5, [193]). Sie weisen einen hohen Grad an Homologie auf. Die Kinasedomänen sind zu 96 % identisch, alle Reste in der ATP-Tasche in Kontakt mit den Inhibitoren sind sogar vollständig identisch. Ein Sequenzalignment mit PKA ist in Abb. 4.3 dargestellt.



Abb. 4.3 Das Sequenzalignment der Kinasedomäne von PKA und Rho-Kinase zeigt identische Reste blau, konservative Austausche beige unterlegt. Die Sekundärstrukturelemente von PKA sind nach [17] eingetragen. Innerhalb der Serin/Threonin Kinasen konservierte Reste sind als rote Buchstaben hervorgehoben. Inhibitor-kontakte sind mit Kästchen markiert.

4.2.1 Allgemeine Struktur

Die Rho-Kinase-Inhibitoren Y-27632, HA-1077 (Fasudil), H-1152P wurden mit PKA und PKI(5-24) als ternäre Komplexe kokristallisiert und die Strukturen gelöst (Tabelle 4.2). Die Raumgruppe ist bei allen drei Kristallen orthorhombisch ($P2_12_12_1$). Die Komplexe mit Y-27632 und H-1152P haben die gleiche Kristallpackung und ähnliche Zellkonstanten (74,1 76,6 81,0), während der HA-1077 Komplex zwar nur leicht unterschiedliche Zellkonstanten (70,3 73,6 79,0), aber andere Kristallkontakte hat.

Alle drei Inhibitoren binden in der ATP-Bindetasche zwischen N- und C-terminaler Domäne. Sie besetzen die Adenin- und Ribose-Tasche, nicht aber die Phosphat-Bindetasche.

Bei H-1152P existiert eine weitere Bindestelle, und zwar in Kontakt mit pThr197 und Aminosäuren der Helix C sowie mit Teilen von PKI und der Helix D eines Symmetrieäquivalents.

	Y-27632	H-1152P	HA-1077
Datensammlung			
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellkonstanten (a, b, c) (Å)	74,03 76,61 80,70	74,2 76,4 81,8	70,33 73,67 79,08
Auflösung (Å)	15,8-2,0	10,9-1,9	20-2,2
Vollständigkeit (%) *	97,8 [88,7]	91,8 [56,0]	82,38 [59,0]
R _{sym} (%) *	0,12 [0,50]	0,06 [0,51]	0,10 [0,34]
Verfeinerung			
Anzahl der Atome	3104	3245	2914
Anzahl der Reflexe	27774	32327	16761
R _{cryst} /R _{Free} (%)	18,1/22,9	17,9/21,7	21,7/29,3
Test-set (%)	10,1	5,0	5,0
Standardabweichung von idealen Werten			
Bindungslängen (Å)	0,016	0,017	0,021
Bindungswinkel (°)	1,440	1,491	1,83
Temperaturfaktoren			
Alle Atome	39,4	25,1	24,4
Haupt-/Seitenkettenatome PKA	37,6/40,0	22,9/25,5	23,1/25,1
Haupt-/Seitenkettenatome PKI	32,9/36,8	21,1/23,9	26,6/29,8
Inhibitor Atome	38,3	33,3	23,3
Solvensmoleküle	50,4	36,6	25,8
Inhibitor Atome (zweites Molekül)	_	21,3	_
Detergens	—	43,4	—

 Tabelle 4.2
 Datensammlung und Verfeinerungsstatistik

* äußerste Schale

4.2.2 Offene und geschlossene Konformation

Liganden induzierte Konformationsänderungen sind für Enzyme allgemein bekannt und auch für PKA bereits beschrieben [25, 31]. Vor allem kann sich die Orientierung von N- und C-lobe relativ zueinander verändern (Abschnitt 2.1.1). Komplexe von PKA mit ATP (1ATP) [20] bzw. AMP-PNP (1CDK) [17] und Mn²⁺ und Pseudosubstrat PKI zeigen eine geschlossene Konformation. Die bisher am weitesten geöffnete Struktur von PKA ist ohne jegliche Liganden (1J3H) [28]. Die Öffnung kann durch den Abstand zwischen Helix C (His87 NE2) und dem Aktivierungsloop (pThr197 O3P) bzw. zwischen dem Glycinloop (Ser53 CA) und dem Aktivierungsloop (Gly186 CA) gemessen werden. Letztere nimmt in der Reihenfolge AMP-PNP, Y-27632, H-1152P, HA-1077 zu (Tabelle 4.3 und Abb. 4.4). Der Glycinloop ist sehr flexibel und kann sich den Liganden anpassen. Diese Flexibilität zeigt sich auch in höheren B-Faktoren. Außerdem gibt es oft mehrere Positionen, die in einem Kristall vorkommen können. Differenzelektronendichten zeigen eine zweite, tiefer liegende Konformation von Gly52, Ser53, Phe54 und Gly55 wie etwa bei Y-27632 oder den Isochinolin-Inhibitoren H7 und H8 [194]. Dieser vordere Teil des Glycinloops wird sonst von den Phosphatgruppen des ATP koordiniert und so fixiert. Dieser Teil der Bindetasche wird von den drei Inhibitoren nicht besetzt. Bei HA-1077 ist die Salzbrücke zwischen Helix C (His87) und Aktivierungsloop (pThr197) aufgebrochen (Abb. 4.4).

Tabelle 4.3 Als einfaches Maß für die Konformation oder Öffnung der Kinase kann der Abstand zwischen bestimmten Atomen dienen. Der Abstand zwischen Helix C (His87) und dem Aktivierungsloop (pThr197), zwischen dem Glycinloop (Ser53) und dem Aktivierungsloop (Gly186) und zwischen Glu170 und Tyr330 ist in Å angegeben. Der PKA-AMP-PNP-Komplex ist in einer geschlossenen Konformation. Der PKA-HA-1077-Komplex weist eine offenere Konformation auf.

Abstand [Å]	His87 NE2 – pThr197 O3P	Ser53 CA – Gly186 CA	Glu170 O – Tyr330 OH
1CDK	2,8	10,9	7,9
Y-27632	2,5	11,0	8,4
H-1152P	2,6	11,0	8,4
HA-1077	4,6	12,4	8,5



Abb. 4.4 Die drei Inhibitoren in der ATP-Bindetasche sind mit der Struktur 1CDK (PKA-PKI-MnAMP-PNP) überlagert.

4.2.3 Inhibitoren in der ATP-Bindetasche

Alle drei Inhibitoren HA-1077, H-1152P und Y-27632 sind, wie die meisten Kinase-Inhibitoren, ATP-kompetitiv und binden in der ATP-Bindetasche. Die Inhibitoren haben Kontakte zum Glycinloop (Leu49, Gly50, Thr51, Val57), zum β -Faltblatt 3 (Ala70), zur *Hinge Region* (Met120, Glu121, Tyr122, Val123, Glu127), zum katalytischen Loop (Glu170, Asn171, Leu173), zum Anfang des Aktivierungsloops (Thr183, Asp184) und zum C-Terminus (Phe327) (Abb. 4.4).

Die gemeinsame Oberfläche der Inhibitoren mit PKA korreliert mit der Bindungsaffinität: H-1152P ($K_D=0,63 \mu M$) mit der höchsten Affinität hat die größte bedeckte Oberfläche; Y-27632 ($K_D=25 \mu M$) mit der niedrigsten Affinität die kleinste. Eine solche Korrelation ist bereits für diverse PKA-Inhibitoren beschrieben [5].

Inhibitor	PDB-Code	Auflösung (Å)	Strukturformel	K _i [μM] (PKA)	K _i [μM] (Rho-Kinase)
HA-1077	1Q8W	2,2		1	0,33
H-1152P	1Q8U	1,9		0,63	0,0016
Y-27632	1Q8T	2,0	N 7 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	25	0,14

Tabelle 4.4 Übersicht über die Röntgenstrukturen von Rho-Kinase-Inhibitoren im Komplex mit PKA und PKI(5-24). Die Inhibitionskonstanten sind der Literatur entnommen [*195, 196*].

Die chemischen Strukturen der Inhibitoren sind in Tabelle 4.4 gezeigt. Sie gehören zu zwei verschiedenen chemischen Klassen: HA-1077 und H-1152P sind Isochinolinsulfonamide mit einem Homopiperazinring. H-1152P ist eine Weiterentwicklung von HA-1077 mit zwei zusätzlichen Methylgruppen - eine am C14-Atom des Isochinolin und eine am C7-Atom des Homopiperazinrings. Dies führt zu höherer Affinität und Selektivität für Rho-Kinase. Y-27632 ist ein Pyridyl-cyclohexancarboxamid.

Die N-haltigen planaren Aromaten (Isochinolin bzw. Pyridin) der Verbindungen liegen in der Adenin-Bindetasche, während die gesättigten Ringe die Ribose-Tasche besetzen.

4.2.4 Analyse der Bindung von HA-1077 an PKA

HA-1077 (Fasudil) war der erste Proteinkinase-Inhibitor, der als Arzneimittel zugelassen wurde. Er ist seit 1995 in Japan auf dem Markt, zugelassen für die Therapie von cerebralen Vasospasmen nach subarachnoiden Hämorrhagien. Fasudil hat gefäßerweiternde Wirkungen [197] und wird auch im Zusammenhang mit Angina Pektoris und Herzkreislauferkrankungen untersucht [198-201]. Die Wirkung von Fasudil wird Rho-Kinase zugesprochen, die an vielen wichtigen biologischen Prozessen beteiligt ist. Dazu zählen die Regulation der Bildung von Aktin- und Myosinfilamenten, Zelladhäsion und -bewegung, Phosphorylierung von Myosin und Kontraktion glatter Muskelzellen [193, 202, 203]. Obwohl die therapeutischen Eigen-

schaften der Hemmung von Rho-Kinase zugesprochen werden, wird sie nur mäßig und nicht selektiv gehemmt ($K_i = 0,33 \mu M$ für Rho-Kinase). Auch andere Kinasen wie PKA, PRK2 und S6K1 werden im μM Bereich inhibiert ($K_i = 1 \mu M$ für PKA) [204].



Abb. 4.5 Bindung von HA-1077 in der Bindetasche (schematisch).

HA-1077 besetzt, wie oben beschrieben, die Adenosin-Bindetasche mit van-der-Waals Kontakten zur *Hinge Region*, dem Glycinloop, β-Faltblatt 3, dem C-Terminus, dem katalytischen Loop und dem Aktivierungsloop (Abb. 4.5). Die meisten Kontakte bestehen zu Val123 (13), Val57 (11) und Thr183 (11) (siehe Tabelle 4.5). Außerdem werden drei Wasserstoffbrücken gebildet: Die H-Brücke zwischen dem Isochinolinstickstoff (N15) und dem Amidstickstoff von Val123 mit 2,8 Å ist analog zur ATP-Bindung, bei der der Adenin-Stickstoff N1 diese H-Brücke bildet. Sie wird von den meisten Kinase-Inhibitoren gebildet. Auch bei PKA-Komplexen mit Y-27632 und H-1152P, sowie anderen Isochinolininhibitoren (H7, H8, H89) [*194*] kommt diese Wasserstoffbrücke vor. Die beiden anderen H-Brücken werden im HA-1077 Komplex vom Homopiperazinstickstoff zu Glu170 (O) (3,3 Å) und Glu127 (OE2) (2,7 Å) gebildet, in Analogie zur Ribose 2'OH und 3'OH Gruppe im AMP-PNP Komplex. Ein ähnlicher Kontakt zu Glu127 wurde zuvor schon im PKA-Staurosporin Komplex beobachtet [*25*], nicht aber bei den anderen Isochinolin-Inhibitoren [*194*].

Aminosäure	Y-27632 Konformation 1	Y-27632 Konformation 2	HA-1077	H-1152P	Kontakte
Leu49	2	2	4(1p*)	8(1p*)	Hauptkette/Seitenkette
Gly50	-	1	2	4(1p*)	Hauptkette
Thr51	3	3	-	5	Hauptkette
Val57	9	10	11	12	Seitenkette
Ala70	4	4	6	7	Seitenkette
Met120	1	1	4	4	Seitenkette
Glu121	2(1p*)	2(1p*)	3(1p*)	3(1p*)	Hauptkette
Tyr122	6	6	7	6	Hauptkette/Seitenkette
Val123	12	12	13	10(1p*)	Hauptkette/Seitenkette
Glu127	-	-	4	4(2p*)	Seitenkette
Glu170	2	2	2	4	Hauptkette
Gln171	6	4	2	2	Hauptkette/Seitenkette
Leu173	5	6	2	12	Seitenkette
Thr183	4(1p*)	6(1p*)	11	7	Seitenkette
Asp184	4	4	4	-	Seitenkette
Phe327	4	4	6	8	Seitenkette
Gesamt	64(2p*)	67(2p*)	81(2p*)	96(5p*)	

Tabelle 4.5 Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen PKA und den Inhibitoren. Fett gedruckte Aminosäuren stehen mit ihren Seitenketten in Kontakt zu den Inhibitoren und unterscheiden sich bei PKA und Rho-Kinase.

*polare Kontakte

4.2.5 Analyse der Bindung von H-1152P an PKA

H-1152P, ein Derivat von HA-1077, ist ein spezifischer Rho-Kinase-Inhibitor mit höherer Affinität zu Rho-Kinase und größerer Selektivität [195]. H-1152P hemmt Rho-Kinase im nanomolaren Bereich (K_i =1,6 nM), während der K_i für PKA bei 0,63 μ M liegt.

Obwohl sich H-1152P nur durch zwei zusätzliche Methylgruppen von HA-1077 unterscheidet, weisen sie stark unterschiedliche Bindungskonstanten für Rho-Kinase auf (Tabelle 4.4). Die K_i-Werte für PKA sind mit 1 μ M (HA-1077) und 0,63 μ M (H-1152P) sind fast gleich. Die Bindung an PKA ist im Isochinolin-Bereich ähnlich, im Homopiperazin-Bereich jedoch unterschiedlich. Dieser Unterschied dürfte größtenteils auf den unterschiedlichen Platzbedarf durch die zusätzlichen Methylgruppen zurückzuführen sein. Die Zahl der van-der-Waals-Kontakte liegt bei H-1152P insgesamt höher, wobei zwar jeweils weniger Kontakte zu Val123 (10) und Thr183 (7), aber mehr zu Leu173 (12), Leu49 (8) und Phe327 (8) gebildet werden. Allerdings findet man nur eine Wasserstoffbrücke, die vom Amidstickstoff von Val123 zum Isochinolin Stickstoff (N16) gebildet wird (3,0 Å). Fünf polare Wechselwirkungen zu anderen Resten in der Bindetasche sind zu weit entfernt (> 3,5 Å), um H-Brücken zu bilden.



Abb. 4.6 H-1152P bindet im Bereich des Adenosins, die Triphosphattasche bleibt unbesetzt. Dünne schwarze Linien zeigen den PKA-PKI-AMP-PNP-Komplex [17]. Die F_o - F_c Elektronendichte (konturiert auf 2 σ) wurde vor dem Einbau des Inhibitors berechnet und zeigt, dass ein Teil des Homopiperazinrings flexibel ist. Die einzige Wasserstoffbrücke in diesem Komplex kann zur *Hinge Region* (Val123) gebildet werden.

Die Elektronendichte des Homopiperazinrings hat Löcher und zeigt eine gewisse Unordnung (Abb. 4.6). Gut geordnet und mit wesentlich niedrigeren B-Faktoren ist hingegen ein zweites Molekül des Inhibitors, das an der Oberfläche des Enzyms bindet.

4.2.6 Zweite Bindestelle von H-1152P

In der Kristallstruktur PKA-H-1152P ist ein zweites Molekül Inhibitor gebunden. Es befindet sich in Kontakt mit Lys189 und pThr197 (Aktivierungsloop) sowie Glu86 und Gln90 (Helix C). Ein Symmetrieäquivalent hat weitere Kontakte zum Inhibitor mit Ile135 und Gly136 (Helix D) und Thr5, Tyr7 und Ala8 von PKI (Abb. 4.7). Außerdem ist das Molekül von zahlreichen Wassermolekülen umgeben. In dieser Region ist die Elektronendichte klar definiert und eine einzige Konformation des Homopiperazinrings sichtbar.

Helix C und Aktivierungsloop, an die der Inhibitor bindet, sind wichtig in der Regulation von Kinasen, weil sich beide Elemente beim Übergang von aktiver zu inaktiver Konformation ändern können (Abschnitt 2.1.2). Außerdem sind Protein-Protein-Wechselwirkungen mit der regulatorischen R-Untereinheit an dieser Stelle beschrieben [205, 206]. Die Reste, die an der Bindung des Inhibitors an dieser Stelle beteiligt sind, sind nicht konserviert zwischen PKA und Rho-Kinase, so dass diese Bindestelle vermutlich nur bei PKA vorhanden ist. Interessant ist diese Stelle, wenn man versucht, mit kleinen Inhibitormolekülen die negative Regulation durch die R-Untereinheiten zu unterbinden.



Abb. 4.7 Die zweite Bindestelle von H-1152P liegt an der Oberfläche des Enzyms in der Nähe von Helix C und Aktivierungsloop und ist in Kontakt mit einem Symmetrieäquivalent (gelb und mit * markiert). In diesem Bereich ist der Inhibitor komplett geordnet, wie die *omit* F_0 - F_c Elektronendichte (konturiert auf 2 σ) zeigt.

4.2.7 Analyse der Bindung von Y-27632 an PKA

Y-27632 wird sehr häufig in der Grundlagenforschung angewendet, um die Stoffwechselwege und Funktionen von Rho-Kinase aufzuklären. Sehr viele Effekte wurden *in vitro* und *in vivo* beobachtet [207]: Y-27632 hemmt die Phosphorylierung von FAK (*Focal Adhesion Kinase*) und Paxillin [208] sowie die Kontraktion glatter Muskelzellen, was zu einer Normalisation des Blutdrucks hypertensiver Ratten führt [209]. Rho-Kinase spielt auch bei der Tumorinvasion ein Rolle [210]. Y-27632 ist ein selektiver Rho-Kinase-Inhibitor mit einem K_i für Rho-Kinase von 140 nM. Trotz seiner vergleichsweise niedrigen Affinität für PKA (K_i=25 μ M) [207]) konnte er mit PKA und PKI(5-24) kokristallisiert werden.



Abb. 4.8 Stereodarstellung der Bindung von Y-27632 an PKA im Vergleich zu AMP-PNP (dünne schwarze Linien). Die omit F_o - F_c -Elektronendichte (grün) ist auf 2 σ konturiert.

Die Position von Y-27632 ist in der Elektronendichte sehr gut definiert, obgleich der Cyclohexanring zwei Sesselkonformationen einnehmen kann, die sich vor allem in der Orientierung der Aminoethylgruppe unterscheiden. Beide Konformationen sind möglich, obwohl die Sesselkonformation 1 weniger geometrische Probleme nach der Verfeinerung zeigt. Allerdings ist dann die Aminoethylgruppe so orientiert, dass sie eine Wasserstoffbrücke weniger ausbilden kann. Die Daten bis 2,0 Å lassen keine genaueren Aussagen zu; deshalb wurden Oberflächen sowie hydrophobe (van-der-Waals) und hydrophile (H-Brücken) Wechselwirkungen für beide Konformationen gleichermaßen analysiert. Sie unterscheiden sich kaum bezüglich ihrer bedeckten Oberfläche (188 vs. 189 Å) und Anzahl der van-der-Waals Kontakte (64 vs. 67). Die H-Brücken werden von Aminoethylstickstoff N17 entweder zu Thr51(O) (2,9Å) in Sesselkonformation 1 oder zu Gln171(OD1) (2,9Å) und Asp184(OD1) (2,9 Å) in Sesselkonformation 2 ausgebildet. Beiden Konformationen gemein ist die H-Brücke zwischen dem Pyridinstickstoff N1 und dem Carbonylsauerstoff von Val123 in der Hinge Region, die auch im Komplex mit ATP und fast allen Inhibitoren auftritt. Zusätzlich existieren indirekte hydrophile Kontakte zu Glu127(OE2) und Leu49(O) über Wassermoleküle.

Die Affinität von Y-27632 zu Rho-Kinase ist ca. 200-fach höher als zu PKA und lässt sich nicht einfach aus der Struktur erklären. Es ist wahrscheinlich, dass der Austausch von Leu49 zu Ile zu verstärkten hydrophoben Wechselwirkungen führt. Gleichzeitig lässt der Austausch Thr183Ala dem Inhibitor mehr Platz und Freiheit, um Interaktionen zu optimieren.

4.2.8 Bindung der Inhibitoren im Vergleich

Die drei Rho-Kinase-Inhibitoren binden mit mäßiger Affinität (K_i-Werte im μ M-Bereich) an PKA [*195, 196*]. Die K_i-Werte korrelieren mit der Anzahl der van-der-Waals Kontakte und mit der Kontaktfläche zwischen Enzym und Inhibitor. Diese Beziehung zwischen Kontaktoberfläche und Affinität von diversen PKA-Inhibitoren ist bereits beschrieben worden [*11*]. Diese Komplexe bestätigen die Korrelation zwischen Oberfläche bzw. hydrophoben Interaktionen und Bindungsstärke. Die einfachste Art hydrophile Wechselwirkungen zu beschreiben, ist die Anzahl der Wasserstoffbrücken zu benennen. Allerdings korrelieren sie nicht mit den Bindungsaffinitäten für PKA. Dies ist typisch für Enzym-Inhibitoren und reflektiert die Existenz kompetierender hydrophiler Wechselwirkungen von Inhibitoren in Lösung.

H-1152P bildet nur eine Wasserstoffbrücke zu PKA, und zwar vom Isochinolinstickstoff zu Val123 in der *Hinge Region*. Auch bei Y-27632 und H-1152P, anderen Isochinolininhibitoren

(H7, H8, H89) [22] und in fast allen Kinase-Inhibitor-Komplexen kommt diese H-Brücke vor. Bei einer Untersuchung der Kinase-Inhibitor-Komplexe in der Proteindatenbank findet man nur zwei Strukturen ohne diese H-Brücke: CK2/Emodin (1F0Q) und p38/BPU (1KV1). Alle anderen Liganden bilden eine oder mehrere H-Brücken zur Hauptkette der *Hinge Region*: immer zum Amidstickstoff der zu Val123 homologen Aminosäure und zusätzlich zu den zu Glu121 (Carbonyl) und Val123 (Carbonyl) homologen Aminosäuren. Diese Interaktion ist trotz der Vielzahl an unterschiedlichen chemischen Strukturen der Inhibitormoleküle fast immer vorhanden und ein Protonenakzeptor an dieser Stelle scheint für gut bindende Inhibitoren essentiell zu sein.



Abb. 4.9 Die Überlagerung von H-1152 (grün) und HA-1077 (weiß) zeigt eine sehr ähnliche Position der Isochinolinringe im Bezug auf die umliegenden Reste. Beide Inhibitoren bilden eine Wasserstoffbrücke zum Amidstickstoff von Val123. Im Gegensatz dazu ist die Position der Homopirperazinringe um fast 1,5 Å verschoben. Die Methylgruppe (C10) verhindert eine HA-1077-ähnliche Position von H-1152P aufgrund eines sterischen Konflikts mit Thr183 (roter Pfeil). Daher können die Wasserstoffbrücken zu Glu127 und Glu170 nur von HA-1077 gebildet werden.

Andere Wasserstoffbrücken, die von ATP zu Resten in der Bindetasche gebildet werden, sind nicht in allen Inhibitorstrukturen zu finden. Die beiden H-Brücken, die von der 2'OH und 3'OH Gruppe der Ribose zum Carboxylatsauerstoff von Glu127 und zum Carbonylsauerstoff von Glu170 gebildet werden, finden ihre Entsprechung nur im HA-1077 Komplex, wo der protonierte Homopiperazinstickstoff diese Wasserstoffbrücken bildet. Im Fall von H-1152P ist dies nicht möglich, da hier der gesamte 7-Ring um ca. 1,5 Å verschoben ist. Die Verschiebung entsteht vermutlich durch die zusätzliche Methylgruppe (C10), die sonst in Konflikt mit Thr183 käme (Abb. 4.9). Somit sind die Abstände zu Glu170 (O) (4,2 Å) und Glu127 (OD1) (3,57 Å) zu groß, um H-Brücken zu bilden. Abbildung 4.9 zeigt die Übereinstimmung der Position der Isochinolinringe und die unterschiedliche Position der Homopiperazinringe mit einer Verschiebung um ca. 1,5 Å. Obwohl H-1152P nur eine H-

Brücke zum Enzym besitzt, führen die beiden zusätzlichen Methylgruppen zu einer erhöhten Anzahl an van-der-Waals Kontakten, einer größeren Kontaktoberfläche und höherer Affinität zu PKA im Vergleich zu HA-1077.

4.2.9 Vergleich zu Rho-Kinase

Die Röntgenstrukturen zeigen die Wechselwirkungen zwischen den Inhibitoren und PKA. Die Kontakte der Inhibitoren bestehen hauptsächlich zu Resten, die zwischen PKA und Rho-Kinase konserviert sind. Dennoch gibt es vier unterschiedliche Aminosäuren, die mit ihrem Seitenketten im Kontakt zu den Inhibitoren stehen: Val123, Glu127, Glu170 und Thr183 (Abb. 4.3 und Tabelle 4.6). Rho-Kinase hat ein Alanin anstelle von Thr183, das mehr Platz für H-1152P bietet, und so auch eventuell der Homopiperazinstickstoff näher an die Wasserstoffbrückenakzeptoren Glu170 und Glu127 rücken könnte. Der Austausch von Leu49 in ein Isoleucin könnte durch eine erhöhte Anzahl von van-der-Waals Kontakten und hydrophoben Wechselwirkungen, insbesondere mit der Methylgruppe am Isochinolin, ein Vorteil für H-1152P sein. Inwiefern die beiden anderen Unterschiede Val123Met und Glu127Asp zur höheren Affinität und Selektivität beitragen, ist schwieriger zu interpretieren. Val123 hat die zweitgrößte Anzahl an van-der-Waals Kontakten zu den Inhibitoren. In den bekannten Strukturen von Proteinkinasen mit einem Methionin in dieser Position zeigen die Seitenketten von der Bindetasche weg, würden also keine Kontakte über C β oder C γ hinaus besitzen. Das Methionin in dieser Position scheint also nicht zu einer höheren Affinität zu Rho-Kinase beizutragen, denn der Effekt wäre eher die Wechselwirkungen zu vermindern. Auch der Austausch Glu127Asp ändert vermutlich wenig. Denn obwohl die Seitenkette eine CH₂-Gruppe kürzer ist, wäre ein Zustandekommen der Wasserstoffbrücke zum Homopiperazinstickstoff sicher noch möglich.

Tabelle 4.6 Die Aminosäuren, die mit ihrer Seitenkette mit den Inhibitoren in Kontakt stehen und bei Rho-Kinase and PKA unterschiedlich sind, sind gezeigt und deren Häufigkeit innerhalb der Familie der Proteinkinasen angegeben.

РКА	Häufigkeit (%)*	Aminosäure	Rho-Kinase	Häufigkeit (%)*
Leu	55,6/49,1	49	Ile	34,1/37,9
Val	19,2/15,5	123	Met	32,1/25,1
Glu	16,9/15,5	127	Asp	38,7/32,2
Thr	13,8/15,5	183	Ala	32,6/28,9

^{*} Zur Analyse der Häufigkeit bestimmter Aminosäuren in bestimmten Positionen wurde eine Datenbank aufgebaut, die auf dem Sequenzalignment nach Hanks, 1991 (Alignment von 391 Kinasen, erster Wert) oder Manning, 2002 (Alignment von 491 Kinasen, zweiter Wert) beruht [1, 4].

Zur Analyse der Häufigkeit bestimmter Aminosäuren in bestimmten Positionen wurde eine Datenbank aufgebaut, die auf dem Sequenzalignment nach Hanks, 1991 (Alignment von 391 Kinasen) oder Manning, 2002 (Alignment von 491 Kinasen) beruht [*1, 4*]. Dazu wurde die Sequenz von PKA durchnummeriert und die Insertionen aller anderen Kinasen gelöscht. An Stellen von Insertionen mussten teilweise Korrekturen manuell vorgenommen werden. Diese bereinigten Sequenzen wurden in eine Microsoft Access Datenbank importiert. So können also nur Kinasen, die in dem jeweiligen Alignment vorkommen, und Aminosäuren, die auch bei PKA vorhanden sind (Sequenz von PKA zwischen 43 und 290), abgefragt werden. Abfragen können sich auf jede beliebige oder auch mehrere Aminosäuren in einer bestimmten Position (Nummerierung nach der PKA-Sequenz) beziehen, sowie beliebige Kombinationen davon sein (Tabelle 4.6).

Wenn man alle Aminosäuren betrachtet, die zwischen PKA und Rho-Kinase unterschiedlich sind und mit ihren Seitenketten zu den Inhibitoren in Kontakt stehen, ist keine dabei, die besonders selten oder außergewöhnlich ist (Tabelle 4.4). Bis auf Leu49 sind die Aminosäuren bei PKA seltener als die entsprechenden bei Rho-Kinase. Dennoch kommt die Kombination der vier Aminosäuren von Rho-Kinase nur bei sechs von 491 Kinasen vor. Abgesehen von Rho-Kinase gehört keine der sechs zur AGC-Familie. Außerhalb der konservierten Kinasedomäne, aber direkt in Kontakt mit den Inhibitoren liegt Phe327 vom C-Terminus, was innerhalb der AGC-Familie häufig vorhanden ist (Abschnitt 2.2.2.4). Betrachtet zusätzlich man diesen weiteren Rest, so wird die Kombination einzigartig für Rho-Kinase.

4.3 Strukturen von PKA und PKAB-Mutanten im Komplex mit Balanolderivaten

4.3.1 Einleitung

Balanol ist ein Naturstoff, der zuerst als Metabolit aus dem Pilz *Verticillium balanoides* [157] und *Fusarium* Arten [158] isoliert wurde (Abb. 4.10). Balanol hemmt PKC und PKA im niedrigen nanomolaren Bereich (K_i =6,4 nM für PKC α , K_i =1,8 nM für PKC β und K_i =3,9 nM für PKA), aber auch andere Serin/Threonin Kinasen im höheren nM Bereich (K_i =74 nM für CaMKII und K_i =742 nM für MAPK). Tyrosinkinasen werden nicht inhibiert [211]. Eine Röntgenstruktur von einem Balanol-PKA-Komplex wurde 1999 veröffentlicht (PDB-Code 1BX6) [26]. Balanolderivate, die PKC inhibieren, sind bereits beschrieben [211-219].

Neue Balanolderivate bzw. Azepanderivate wurden als Inhibitoren für Protein Kinase B (PKB/Akt) synthetisiert [220]. Diese Inhibitoren wurden von Dr. B. Masjost und Dr. W.-G. Friebe (Roche Diagnostics GmbH) zur Verfügung gestellt und mit PKA und PKI(5-24) unter etablierten Bedingungen kokristallisiert. Die Strukturen zeigen den Bindungsmodus und sind wichtig bei der Optimierung der Inhibitoren bezüglich Plasmastabilität und Selektivität gegenüber PKA und PKC [221].

Balanol besteht in seiner chemischen Struktur aus vier Ringen: ein Phenol ist über ein Amid an einen Azepanring gebunden, der über einen Ester mit einem Benzophenon mit Substituenten verknüpft ist (Abb. 4.10). Die Balanolderivate sind vom natürlichen Balanol abgeleitet, haben aber einige Variationen in allen Teilen der Struktur: das Phenol (Ring A) wurde durch ein Pyridin oder Pyrimidin ersetzt, der Esterlinker zwischen Ring B und C wurde zu Amid, Ether, Vinyl oder Amingruppen ausgetauscht, die Substituenten am Benzophenon (Ring D) und der Azepan-Ring (B) wurden verändert.



Abb. 4.10 Die chemische Struktur von natürlichem Balanol

Veränderungen des Rings A vom Phenol zum Pyridin bewirken eine gesteigerte Affinität zu PKB. Das Pyridin oder Pyrimidin ist essentiell für eine Bindung im nM-Bereich. Eine Modifikation des Linkers zwischen Ring B und C ist notwendig, da der Ester plasmainstabil ist und innerhalb weniger Minuten im Blut abgebaut wird. Er soll durch plasmastabile Linker ersetzt werden, die die Affinität nicht verringern dürfen. Veränderungen am Benzophenon sollen zu einer Selektivität für PKB gegenüber PKA und PKC führen. Zuletzt werden Modifikationen an Ring B beschrieben. PKA ist hier sehr sensitiv, während PKC dies eher toleriert.

Diverse Inhibitoren mit Veränderungen in allen Teilen des Moleküls wurden mit PKA kokristallisiert. 22 Röntgenstrukturen wurden gelöst. Tabelle 4.7 gibt einen Überblick über diese Strukturen, die im Folgenden genauer beschrieben werden. Außerdem wurden die Strukturen von 7 ausgewählten Inhibitoren mit PKAB-Mutanten gelöst, und die Strukturen zum Vergleich benutzt (Tabelle 4.8). Insgesamt 29 Strukturen von Balanolderivaten sind in Abb. 4.11 überlagert dargestellt.



Abb. 4.11 29 Strukturen wurden von Komplexen der Balanolderivate mit PKA und PKAB-Mutanten gelöst. Die höchste Auflösung war 1,6 Å und liegt im Durchschnitt bei 2,2 Å.

Inhibitor	Detektor*	Auflösung	R _{cryst}	R _{free}	Zellkonstanten	R _{sym}	Vollständigkeit
R01	Х	2,49	20,0	25,9	74,2/76,3/79,7	0,109	91,2
R02	IP	2,02	18,9	23,3	74,3/76,9/79,9	0,13	81,8
R03	IP	2,9	17,0	23,0	74,6/77,0/80,2	0,21	98,5
R04	CCD	2,3	20,6	25,7	73,2/79,2/80,5	0,058	99,2
R05	IP	2,3	21,7	27,9	72,1/79,3/80,1	0,125	90,3
R11	CCD	2,3	20,4	27,0	73,1/79,4/80,3	0,104	87,2
R12	IP	2,95	16,7	23,0	74,1/76,4/80,0	0,15	99,1
R14	CCD	2,69	21,6	27,7	73,8/77,0/79,9	0,085	99,6
R15	CCD	1,85	19,7	24,2	73,0/79,1/80,4	0,069	96,6
R21	IP	2,04	18,0	21,5	74,9/77,1/80,4	0,09	95,7
R22	IP	2,45	20,0	25,4	72,6/79,4/79,5	0,101	99,4
R23	IP	2,45	18,9	24,2	73,0/79,1/79,1	0,062	98,8
R24	IP	1,86	17,0	20,9	74,6/76,4/80,3	0,082	86,7
R25	IP	1,8	17,4	20,6	74,4/76,3/80,5	0,08	93,7
R26	IP	2,45	17,8	24,7	74,4/76,6/80,2	0,14	97,0
R27	IP	1,99	18,9	23,8	73,3/76,0/80,2	0,077	90,0
R31	CCD	2,05	18,2	23,6	74,1/76,8/79,5	0,081	99,8
R32	CCD	1,90	19,2	24,9	61,4/76,0/78,7	0,094	98,7
R33	CCD	2,47	19,1	25,3	73,8/75,5/79,4	0,095	98,7
R34	CCD	1,68	20,0	23,5	70,7/73,3/78,1	0,164	93,2
R35	IP	2,2	17,2	21,9	74,7/76,9/80,7	0,13	90,0
R42	CCD	2,45	21,6	28,1	73,9/78,1/79,9	0,113	99,8

 Tabelle 4.7
 Übersicht über die gelösten PKA-Strukturen mit Balanolderviaten

* Die mit IP (Mar Image Plate) oder X (Bruker X1000 Flächendetektor) bezeichneten Datensätze wurden an einer rotierenden Anode mit dem entsprechenden Detektor gemessen. Die mit CCD (*Charge Coupled Device*) bezeichneten Datensätze wurden am Synchrotron aufgenommen.



Abb. 4.12 Strukturformeln der Inhibitoren

 Tabelle 4.8
 Übersicht über alle gelösten PKAB-Strukturen mit Balanolderviaten

Inhibitor	PKABx	Detektor	Auflösung	R _{cryst}	R _{free}	Zellkonstanten	R _{sym}	Vollständigkeit
R02	2	IP	2,20	18,3	22,6	74,4/76,6/80,0	0,150	95,0
R03	2	IP	1,95	23,8	27,8	74,6/76,9/80,2	0,100	93,4
R31	4	CCD	2,46	22,2	27,2	49,8/79,6/117,3	0,122	97,4
R12	4	CCD	2,05	18,9	23,8	48,8/79,4/117	0,089	98,1
R35	4	CCD	2,35	18,2	23,7	59,1/78,7/100,9	0,081	99,1
R23	5	CCD	1,64	16,6	19,8	61,7/78,8/78,8	0,094	98,1
R36	5	CCD	3,00	23,9	30,9	72,8/78,9/79,4	0,201	99,1

4.3.2 Plasmastabile Derivate durch Ersatz des Esterlinkers

Der Linker zwischen Ring B und C wurde verändert, um die pharmakokinetischen Eigenschaften zu verbessern. Denn die Esterverbindung R01 ist plasmainstabil und hat eine Halbwertszeit von weniger als einer Minute (Tabelle 4.9). Da solche Verbindungen therapeutisch nicht einsetzbar sind, wurde nach plasmastabilen Derivaten gesucht und eine Reihe von Verbindungen synthetisiert. Diese wurden auf ihre Plasmastabilität und Bindungsaffinität untersucht. Röntgenstrukturen der PKA-Komplexe wurden zur Analyse der beobachteten Veränderungen benutzt.

Inhibitor	R01	R02	R03	R04
Linker	Ester	Amid	Ether	Vinyl
Strukturformel	$\begin{array}{c} & & \\$	HC: N HC HN, NH HC HN, NH HC HN, NH HC	HCI- N HCI- N HN HN HN HN HCI HN HCI HN HCI HCI HN HCI HCI HN HCI HCI HCI HCI HCI HCI HCI HCI HCI HCI	
Τ _½	< 1 min	69 h	29 h	n. b.
IC ₅₀ (PKA) [nM]	5	2	39	360
IC ₅₀ (PKB) [nM]	5	4	355	160

 Tabelle 4.9
 Eigenschaften der Balanolderivate

Tabelle 4.10	Datensammlung u	and Verfeinerung
--------------	-----------------	------------------

	PKA-R01	PKA-R02	PKA-R03	PKA-R04
	Ester	Amid	Ether	Vinyl
Datensammlung				
Raumgruppe	$P2_12_12_1$	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellkonstanten (a, b, c) (Å)	74,2, 76,3, 79,7	74,2, 76,9, 79,9	74,9, 76,5, 80,1	73,2, 79,2, 80,5
Auflösung (Å)	20,93-2,49	14,7-2,0	21,51-2,89	32,2-2,3
Vollständigkeit (%) *	91,2 [54]	81,8 [15,7]	85,0 [75,6]	99,2 [99,9]
R_{sym} (%) *	10,9 [34,9]	12,9 [35,3]	19,4 [59,0]	5,8 [23,2]
Verfeinerung				
Auflösung	2,49	2,0	2,89	2,3
Anzahl der Atome	3107	3138	3065	3053
Anzahl der Reflexe	14088	23778	8616	19351
R _{cryst} /R _{Free} (%)	20,0/25,9	18,1/22,7	18,1/24,1	20,6/25,7
Korrelationskoeffizient Fo-Fc [Free]	92,7 [86,8]	95,7 [93,3]	94,1 [89,1]	93,2 [90,8]
Standardabweichung von idealen W	erten			
Bindungslängen (Å)	0,014	0,012	0,018	0,018
Bindungswinkel (°)	1,471	1,436	1,685	1,602
Temperaturfaktoren				
Alle Atome	20,9	34,5	40,2	43,3
РКА	21,2	34,8	40,4	43,4
PKI	19,6	31,3	39,8	42,1
Inhibitor Atome	10,8	22,0	30,3	32,1
Solvent Moleküle	18,6	36,1	36,8	44,7

* [äußerste Schale]

4.3.2.1 Analyse der Struktur des PKA-R01-Komplexes

Die Struktur des Komplexes von PKA und PKI(5-24) mit R01 war eine der ersten Strukturen und wurde mit einer Auflösung von 2,5 Å gelöst. Die Bindetasche der Inhibitoren kann in drei Bereiche aufgeteilt werden: die Pyridin-, Azepan- und Benzophenon-Bindetasche, die auch ungefähr der Adenin-, Ribose- und Triphosphat-Bindetasche von ATP entsprechen (Abb. 4.13).



Abb. 4.13 Bindung der Balanolderivate in der ATP-Bindetasche. Dargestellt ist der Inhibitor R01 (grün/ orange) und die AMP-PNP-PKA-Struktur (blau/pink) (1CDK), [17] zum Vergleich.

Die Pyridintasche enthält den Pyridinteil und die Amidgruppe, die zum Azepan verbindet. Dieser Bereich wird im Komplex von MnAMP-PNP, PKA und PKI(5-24) (1CDK) [22] vom Adeninteil besetzt und kann die meisten Aromaten aufnehmen. Eine Überlagerung mit 1CDK ist in Abb. 4.13 dargestellt. Van-der-Waals-Wechselwirkungen bestehen in diesem Bereich zwischen dem Inhibitor und Teilen des Glycinloops (Leu49, Val57), des β-Faltblatts 3 (Ala70), der *Hinge Region* (Met120, Tyr122, Val123, Glu127), des katalytischen Loops (Leu173), des Anfangs des Aktivierungsloops (Thr183) und des C-Terminus (Phe327). Der Amidstickstoff von Val123 der *Hinge Region* bildet eine Wasserstoffbrücke (3,3Å) zum Pyridinstickstoff von Inhibitor R01. Diese H-Brücke zu Val123 wird auch im ATP-Komplex gebildet und kommt in den meisten Inhibitorkomplexen vor, scheint also sehr wichtig für die Bindung zu sein (Abschnitt 4.2.8). Zwei weitere Wasserstoffbrücken werden vom Amid des Inhibitors zu Wassermolekülen gebildet, die vom NH zu Glu127 und Leu49 und von CO zu Lys72 und Asp184 weiterleiten (Abb. 4.14). Diese beiden Wassermoleküle sind in den meisten Strukturen mit den Balanolderivaten an dieser Position zu finden.

Das Azepan, das sich über die Ribosetasche erstreckt, sowie der daran anschließende Esterlinker binden in der Azepantasche. Diese wird von Resten des Glycinloops (Gly50, Thr51, Gly52, Val57), des β-Faltblatts 3 (Lys72), des katalytischen Loops (Glu170, Asn171) und des Aktivierungsloops (Asp184) gebildet. Es gibt drei Wasserstoffbrücken zwischen dem Azepan-Stickstoff und Glu170(O) (2,9 Å), Gln171(OE1) (3,1 Å) und Asp184 (OD1 und OD2) (2,9 Å und 3,4 Å).

Die Benzophenontasche wird auf einer Seite durch den flexiblen Glycinloop begrenzt, der im Vergleich zum AMP-PNP-Komplex verschoben wird (Abb. 4.14.). Folglich gibt es van-der-Waals-Kontakte zum Glycinloop (Ser53, Phe54, Gly55, Arg56), aber auch zu β-Faltblatt 3 (Leu74), zum Aktivierungsloop (Gly186, Phe187) und einigen Resten der Helix C (Gln84, His87, Thr88, Glu91). Der Carbonylsauerstoff des Benzophenons bildet eine Wasserstoff-Brücke zum Amidstickstoff von Phe54 an der Spitze des Glycinloops. Der Hydroxyl-substituent am Benzophenon bildet eine starke H-Brücke zu Glu91. Der Abstand liegt bei 2,5 Å und die Elektronendichte ist durchgehend. Das konservierte Glu91 bildet außerdem eine Salzbrücke mit dem ebenfalls konservierten Lys72. Alle H-Brücken sind noch einmal in Abb. 4.14 dargestellt.



Abb. 4.14 Elektronendichte und intermolekulare Wechselwirkungen zwischen PKA und dem Balanol-Derivat R01. Zum Vergleich ist die Struktur 1CDK (PKA-PKI(5-24)-MnAMP-PNP) (dünne schwarze Linien) überlagert.

4.3.2.2 Bindung und Bindungsaffinitäten von Ether-, Amin-, und Vinylderivat

Drei weitere Inhibitoren R02, R03 und R04 mit Amid-, Ether- und Vinyllinker zwischen Azepan und Benzophenon wurden ebenfalls mit PKA kokristallisiert und die Strukturen gelöst. Sie sind mit dem Ester überlagert in Abb. 4.15 dargestellt. Die gebundenen Konformationen sind kaum verändert. Der Linker ist in allen Strukturen trans orientiert, der Torsionswinkel zwischen Azepan und Benzophenon ist antiperiplanar. Diese Konformation ist notwendig, damit sowohl Azepan als auch Benzophenon in ihre Bindetasche zeigen. Deshalb sollten auch Moleküle, die in wässriger Lösung bereits trans orientiert sind, eine höhere Bindungsaffinität besitzen. Dies bestätigen IC₅₀=39 nM). Dies ist damit zu erklären, dass die trans-Konformation in wässriger Lösung nicht bevorzugt vorliegt. Sie einzunehmen, erfordert zusätzliche Energie. Ein NMR-NOESY Experiment zeigte π -stacking der Aromaten (Pyridin und Benzophenon). Dass Inhibitoren, die in einer präorientierten Konformation vorliegen, eine höhere Affinität aufweisen, ist beschrieben [222].



Abb. 4.15 Überlagerung von R01, R02, R03 und R04.

Amid (R02)

Die Bindung von Inhibitor R02 (Amid) und R01 (Ester) sind prinzipiell gleich, wie aus der Überlagerung (Abb. 4.15) zu erkennen ist. Nur die Seitenketten von Asp184, Thr183 und Lys72 zeigen Veränderungen. Die Seitenkette von Asp184 orientiert sich in Richtung des Amid und kann so eine Wasserstoffbrücke zu dessen Amidstickstoff bilden. Die H-Brücke zum Azepan-Stickstoff bleibt dabei erhalten. Lys72 macht neben der H-Brücke zu Glu91 eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe am Benzophenon. Die Seitenkette von Thr183 ist in dieser Struktur so orientiert, dass eine H-Brücke zum Carbonylsauerstoff des Amids am Pyridin gebildet werden kann.

Ether (R03)

Auch hier gilt, dass sich die Strukturen kaum unterscheiden. Die H-Brücke zwischen Lys72 und der Hydroxylgruppe am Benzophenon des Inhibitors ist auch hier vorhanden, so dass der größere Abstand im Fall des Esters die Ausnahme ist. Thr183 nimmt in der Struktur des Inhibitors R03 zwei Konformationen ein, eine analog der Ester-Struktur und die andere analog der Amid-Struktur. Entsprechend kann eine H-Brücke zu einem Wassermolekül oder zum Inhibitor gebildet werden. Die Seitenkette von Thr183 und die des räumlich benachbarten Leu173 sind flexibel und vorwiegend in zwei Orientierungen zu finden. Asp184 ist in der gleichen Position wie beim Ester (R01), da auch der Ethersauerstoff kein H-Donor ist. Der Etherlinker ist flexibler als Ester und Amid und grundsätzlich nicht an die starre planare trans Orientierung gebunden. Dennoch nimmt der Linker eine ähnliche Position ein, denn Azepan und Benzophenon müssen für die Bindung an PKA eine bestimmte Orientierung haben. Nur der Ethersauerstoff ist gegenüber dem Estersauerstoff um 0,4 Å verschoben, die umliegenden Atome liegen in gleichen Positionen.

Vinyl (R04)

22 O

Die Analyse der Struktur von Inhibitor R04 zeigt keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zum Ester und Amid. Für Lys72 und Asp184 gilt das für den Ether R03 Beschriebene. Dennoch ist die Affinität hier deutlich geringer. Dies mag daran liegen, dass die C=C Doppelbindung wesentlich starrer ist.

Tabelle 4.9 Übersicht über mögliche Wasserstoffbrücken, die von den Inhibitoren gebildet werden können. Die entsprechenden Abstände sind angegeben.

	Wasserstoffbrücken			PKA-01	PKA-02	PKA-03	PKA-04
	Absta	nd [Å]		Ester	Amid	Ether	Vinyl
	Inhib	itor - 🛛	Protein				
	N11		Val123 (N)	3,3	3,2	3,1	3,1
N11	O22		Thr183 (OG1)	_	2,8	2,7/—	—
L I	N33		Asp184 (OD1)	2,9	2,7	2,5	2,9
, v	N33		Asp184 (OD2)	3,4	3,4	3,3	
^{//} / NH ³³	N33		Glu170 (O)	2,9	2,9	3,1	2,9
\sim	N33		Asn171 (OD1)	3,1	2,9	3,2	3,1
≥Z ₄₃	X41		Asp184 (OD2)	—	3,0	—	—
	X41		Asp184 (OD1)	—	3,4	—	—
	O62		Phe54 (N)	3,1	3,0	3,3	2,0
	O92		Glu91 (OE1)	2,5	2,6	2,7	2,7
	O92		Lys72 (NZ)		3,1	3,1	3,2
	Inhib	itor - W	asser - Protein				
	O22	X54	Lys72 (NZ)	2,9-2,6	2,9 - 3,4	2,8-2,8	3,1-2,9
			Asp184 (OD1)	- 2,5	-2,7	- 3,2	- 2,9
			Asp184 (OD2)	- 3,1		- 2,9	- 2,9
	N23	X22	Glu127(OE2)	2,9-2,6	2,9 - 2,7	3,1-2,7	3,1-2,6
			Leu49 (O)	- 3,0	- 2,9	- 3,0	- 2,9

4.3.2.3 Vergleich zum natürlichen Balanol

Diese vier Strukturen sollen mit der Struktur des Balanol-PKA-Komplexes (1B6X) [26] verglichen werden. Das natürliche Balanol und die Balanolderivate werden prinzipiell in gleicher Weise gebunden, trotzdem sind ein paar Unterschiede zu bemerken.

Ring A, ein Phenol (Balanol) oder Pyridin (Derivate), bindet in der Adenintasche. Alle Strukturen zeigen gleiche H-Brücke zur *Hinge Region* zum Amidstickstoff von Val123. Balanol kann jedoch auch eine Wasserstoffbrücke zwischen der Phenolgruppe des Inhibitors und den Carbonylsauerstoff von Tyr122 bilden.

Die Benzophenonsubstituenten sind sehr unterschiedlich: natürliches Balanol hat zwei Hydroxylgruppen an Ring C und eine Hydroxyl- und eine Carboxylatgruppe an Ring D. Diese hydrophilen Substituenten sind in einem Netz aus Wasserstoffbrücken eingebunden: zu Gly52, Ser53, Phe54 und Gly55 vom Glycinloop, zu den konservierten Lys72 und Glu91, sowie zu Asp184. Die Derivate besitzen Substituenten nur an Ring D: und zwar die Hydroxylgruppe, ein Fluoratom in der Position der Carboxylatgruppe und eine zusätzliche Methoxygruppe. Die Hydroxylgruppe bildet eine starke Wasserstoffbrücke zu Glu91 und Lys72. Sie ist in fast in allen Strukturen vorhanden. Das Fluor zeigt in die gleiche Richtung wie die Carboxylatgruppe des natürlichen Balanols (zu Ser53), kann aber im Gegensatz zum Carboxylat keine H-Brücke bilden. Die Methoxygruppe erstreckt sich weiter in Richtung Phe187, Gln84 und His87. Dieser Teil der Bindetasche wird von Balanol nicht besetzt. Asp184 vom konservierten DFG-Motiv verdient besondere Beachtung, denn die Seitenkette ist sehr flexibel und zeigt die meisten liganden-induzierten Bewegungen innerhalb der ATP-Tasche. Die Seitenkette mit der Carboxylatgruppe zeigt nach außen, wenn sie die Manganatome in der PKA-PKI-AMP-PNP Struktur (1CDK) koordiniert, zur Hydroxylgruppe am Ring C im Balanol-PKA-Komplex, bei Liganden wie H-1152, Y-27632, H-89 und H-7 oder auch wenn kein Ligand gebunden ist. Bei Liganden wie H-8, HA-1077 oder den Balanolderivaten zeigt die Carboxylatgruppe nach innen und bildet eine Wasserstoffbrücke zum Inhibitor. Bei den Balanolderivaten mit Ester-, Ether- oder Vinyllinker wird eine H-Brücke zum Azepanstickstoff gebildet. Bei den Amidderivaten nimmt Asp184 eine mittlere Position ein und bildet eine H-Brücke zum Amidstickstoff. Thr183 und Leu173 sind auch sehr variabel. Es gibt vorwiegend zwei Positionen der Seitenkette von Thr183, so dass eine Wasserstoffbrücke von der OH-Gruppe entweder zum Inhibitor oder zu einem konservierten Wasser gebildet wird.

4.3.2.4 Vergleich der Komplexe von R02 und R03 mit PKA und PKAB2

Die Inhibitoren R02 und R03 wurden mit PKA und außerdem mit einer PKAB2 Mutante kokristallisiert und die Röntgenstrukturen der Komplexe gelöst.

Bei der PKAB2-Mutante wurden zwei Aminosäuren in der ATP-Bindetasche, die in PKA und PKB unterschiedlich sind, in die entsprechenden Aminosäuren der PKB-Sequenz ausgetauscht. Dies sind Val123Ala und Leu173Met [*223*]. Zuerst wurde die PKAB2 und PKAB3-Mutante ohne Liganden sowie mit Mg-ATP kokristallisiert und drei Strukturen gelöst: PKAB2, PKAB2-MgATP-PKI(5-24), PKAB3 [*223*]. Es zeigte sich, dass Gln181, welches normalerweise über hydrophile Kontakte der Seitenkette an der Oberfläche des Enzyms gebunden ist, durch den Austausch von Val123 zu Alanin die Konformation der Seitenkette ändert und in die Bindetasche hineinklappt. In der Struktur mit ATP sieht man, dass eine Verdrängung aus der Tasche notwendig ist, damit ATP gebunden werden kann. Dies spiegelt sich in höheren K_M-Werten wieder. Dieser Defekt der Mutante lässt sich durch die Mutation von Gln181 in Lysin (wie in PKB) beheben. In der Struktur der PKAB3-Mutante zeigt die Seitenkette des Lysins dann auch ohne Ligand wieder nach außen. Strukturell sieht man bei der ATP-Bindung der PKAB2-Mutante keine wesentlichen Unterschiede zu PKA- oder PKB-ATP-Komplexen [*223*].



Abb. 4.16 Überlagerung der Komplexe von PKA-R01(dunkelviolett) und PKAB2-R01 (hellviolett) sowie PKA-R03 (orange) und PKAB2-R03 (beige).

Im Vergleich ändert sich bei der Bindung von Inhibitor R01 an PKAB2 wenig, auch die IC₅₀-Werte für PKA und PKB sind sehr ähnlich. Auffällig ist nur, dass sich der Pyridinring (Ring A) aus der Ebene dreht. Das gleiche ist bei Inhibitor R03 zu beobachten. Das mag daran liegen, dass sich Leu173 direkt unter dem Aromaten befindet. In der PKAB2 Mutante ist es zu Methionin ausgetauscht. Durch Wechselwirkungen zwischen dem Schwefel und dem Aromaten könnte diese Drehung aus der Ebene bedingt sein. R01 (Ester) und R03 (Ether) haben einen unterschiedlichen Linker zwischen Ring B und C. Hier sehen wir, dass der Ether keine strenge planare Anordnung erfordert und der Sauerstoff der Ethergruppe auch etwas verschoben liegen kann.

4.3.3 Erhöhte Affinität zu PKB durch Austausch des Phenols gegen Pyridin

Ring A ist im Naturstoff Balanol ein Phenol, während die synthetisierten Inhibitoren auch ein 2-Methylphenol, 2,6-Dimethylphenol, Pyridin oder Pyrimidin als Ring A besitzen. Die verschiedenen Strukturen zeigen, dass Phenole in allen PKA-Komplexen anders als die entsprechenden Pyri(mi)dine binden (Abb. 4.18). Sie haben zwar auch in den meisten Fällen unterschiedliche Substituenten am Benzophenon (Tabelle 4.10), da aber die Ringe B und C in gleicher Position liegen, ist der Einfluss der Substituenten auf die Lage von Ring D beschränkt.

Inhibitor	R01	R05	R11	R12	R14	R15
Ring A	N	× ×	но-			HO
Struktur- formel	$\begin{array}{c} & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ &$	$(\mathbf{x}_{i}^{r})_{i}^{r} = (\mathbf{x}_{i}^{r})_{i}^{r} $	$\begin{array}{c} H = \left(\begin{array}{c} \begin{array}{c} \\ \\ \end{array} \right) \left(\begin{array}{c} \\ \\ \\ \end{array} \right) \left(\begin{array}{c} \\ \end{array} \right) \left(\begin{array}{c} \\ \\ \end{array} \right) \left(\begin{array}{c} \\ \end{array} \right) \left(\end{array} \right) \left(\begin{array}{c} \\ \end{array} \right) \left(\end{array} \right) \left(\begin{array}{c} \\ \end{array} \right) \left(\end{array} \right) \left(\end{array} \right) \left(\begin{array}{c} \\ \end{array} \right) \left($		$\begin{array}{c} H_{0} \\ H_{0} \\ H_{1} \\$	
IC ₅₀ (PKA) [nM]	5	46	10	94	4900	3

Tabelle 4.10 Übersicht über eine Reihe von Inhibitoren mit Variation des Rings A.

Alle Kristallstrukturen der Inhibitor-Komplexe wurden überlagert und analysiert. Die Inhibitoren R01 und R05 unterscheiden sich nur in Ring A, der ein Pyridin (R01) oder Pyrimidin (R05) ist. Auch die Konformation des Proteins unterscheidet sich kaum. Dennoch finden wir unterschiedliche IC₅₀-Werte von 5 nM (R01) und 46 nM (R05). In der Abbildung
4.17 sieht man, dass die Amidgruppe zwischen Ring A und Ring B unterschiedlich liegt. Sie ist noch weiter aus der Ebene des Ring A herausgedreht. Auch ein Wassermolekül, das fast immer Wasserstoffbrücken zum Carbonylsauerstoff des Inhibitors, zu Lys72 und Asp184 bildet (siehe auch Tabelle 4.9), fehlt trotz einer guten Auflösung von 2,3 Å.



Abb. 4.17 Vergleich zwischen Pyridin (R01) (magenta) und Pyrimidin (R05) (violett).

Bei den Inhibitoren mit Phenol- oder (Di)methylphenolring ist der Ring A gegenüber den Inhibitoren mit Pyridin oder Pyrimidin deutlich verschoben, während Ring B und C unverändert bleiben. Der Inhibitor R11 mit einem Phenol ohne Methylgruppe nimmt eine mittlere Position ein (Abb. 4.18).



Abb. 4.18 Vergleich von Inhibitoren mit Variationen in Ring A: Pyri(mi)din (R01, R05) (violett), Phenol (R11) (blau), 2,6-Dimethylphenol (R12, R14) (grün) und 2-Methylphenol (R15), gelb.

Der Phenolring entfernt sich von Phe327 tiefer in die Tasche in Richtung Met120. Auch die *Hinge Region* wird nach außen gedrückt (Abb. 4.19). Die phenolische Hydroxylgruppe kann Wasserstoffbrücken zwei verschiedenen Aminosäuren der *Hinge Region* bilden: zum Amidstickstoff von Val123 und zum Carbonylsauerstoff von Glu121. Trägt das Phenol eine oder zwei Methylgruppen in ortho-Position wird der Ring noch etwas weiter in Richtung Met120 verschoben. Dies beruht auf Wechselwirkungen mit Phe327, das die Tasche abschließt. Ist nur eine Methylgruppe (Inhibitor R15) vorhanden, zeigt diese in Richtung Phe327 und nicht in Richtung Met120. Aufgrund des Platzbedarfs des Inhibitors ändert sich die Konformation der Seitenkette von Met120, wenn zusätzlich eine zweite Methylgruppe vorhanden ist (Inhibitor R12, R14) (Abb. 4.19).

Trotz der stark unterschiedlichen Position der Ringe A bis B und Änderungen am Protein in der Adenin-Bindetasche unterscheiden sich die IC_{50} -Werte für PKA zwischen einem vergleichbaren Phenol-Pyridinpaar (R11: 10 nM und R01: 5 nM) kaum. Auch Inhibitor R15 (Methylphenol) zeigt einen IC_{50} -Wert von 3 nM, obwohl hier auch ein anderer Ring D vorhanden ist. Inhibitor R12 kann mit Inhibitor R22 verglichen werden, die sich nur in Ring A (Phenol vs. Pyridin) und Linker zwischen B und C (Ester vs. Amid) unterschieden. Die IC_{50} -Werte liegen um den Faktor 10 auseinander (R12: 94 nM und R22: 9 nM). Offensichtlich vermindert also die zweite Methylgruppe die Affinität zu PKA, die auch die Verschiebung der Seitenkette von Met120 induziert.



Abb. 4.19 Die *C-lobes* aller Strukturen sind überlagert. Die Position des Phenols R11 (blau), der 2-Methylphenole R12 und R14 (grün) und des 2,6-Dimethylphenols R15 (blau) ist gegenüber dem Pyridin R01(magenta) und Pyrimidin R05 (violett) stark verschoben. Veränderungen am Protein betreffen die *Hinge Region* und Met120.

Bei PKB zeigen sich wesentlich größere Unterschiede in der Affinität der Phenol- und Pyridinderivate. Die Phenole inhibieren PKA und PKC im nM Bereich, wohingegen die IC_{50} -Werte für PKB im niedrigen μ M Bereich zu finden sind. Erst durch den Austausch zu Pyridin oder Pyrimidin werden die IC_{50} -Werte für PKB in den nM-Bereich verschoben und liegen dort ähnlich wie für PKA. In Bereich der Bindetasche von Ring A gibt es zwei wichtige Unterschiede in der Sequenz von PKA und PKB: Val123Ala und Leu173Met. Eine Struktur des Komplexes von PKA und einer PKAB4-Mutante mit Inhibitor R12 sind in Abb. 4.20 dargestellt.



Abb. 4.20 Überlagerung von PKA-R12 und PKAB4-R12

Die Strukturen PKAB2-R01 und PKAB2-R03 haben bereits gezeigt, dass die Mutation Leu173Met einen Einfluss auf die Lage von Ring A hat (Abschnitt 4.3.2.4). Ring A wird um etwa 10° aus der Ebene gedreht. Das ist auch bei Inhibitor R12 zu sehen (Abb. 4.21). Auf den ersten Blick sind keine Veränderungen am Protein zu erkennen, mit Ausnahme der Mutationen (Abb. 4.20). Dennoch liegt der IC₅₀-Wert für PKA und PKB um Faktor 10 auseinander. Dies ist nicht auf Anhieb zu erklären, aber bei allen Phenolen konsistent. Durch beide Mutationen kommt es zu verminderten van-der-Waals-Wechselwirkungen. Vermutlich sind Effekte des Schwefels von Met173 verantwortlich, das direkt unter Ring A liegt und dessen Lage beeinflusst. Hinzu kommt die Verschiebung von Met120, die sich ungünstig auf weitere Reste außerhalb der Bindetasche auswirken könnte.



Abb. 4.21 Die Überlagerung von PKA-R12 und PKAB4-R12 (grün) mit PKA-R01 und PKAB2-R01 (violett), wobei die Komplexe mit der PKAB-Mutante in einem etwas helleren Farbton dargestellt sind, zeigt wie sich Ring A aus der Ebene dreht. Zusätzlich sind bei Inhibitor R12 unterschiede im Bereich des Benzophenons zu sehen, wo die beiden weiteren Mutationen liegen.

Die PKAB4-Mutante hat zusätzlich zu den beiden Mutationen der PKAB2-Mutante zwei weitere im Bereich der Benzophenon-Bindetasche: Gln84Glu und Phe187Leu. Veränderungen sind auch in diesem Bereich am Inhibitor (Abb. 4.21) und am Protein zu sehen (Abb. 4.20). Glu84 dreht sich zum Inhibitor, ist aber mit 3,6 Å etwas zu weit entfernt für eine H-Brücke. Außerdem nimmt der Inhibitor den zusätzlichen Platz ein, den Leu187 (statt Phe) in der Tasche lässt. Eine weitere Analyse unterschiedlicher Substituenten am Benzophenon ist im nächsten Kapitel zu finden.

4.3.4 Vergleich verschiedener Benzophenon-Substituenten

Veränderungen im Bereich des Rings A von Balanol kann die Affinität zu PKB erhöhen, so dass die Bindung im nM Bereich liegt. Allerdings wird PKA in den meisten Fällen genauso gehemmt. Weitere Modifikationen können an Ring D vorgenommen werden. Hier ist PKC sensitiv [224], so dass durch geeignete Substituenten in diesem Bereich auch eine Selektivität gegenüber PKC erreicht werden kann.

Inhibitor	R21	R01	R22	R23	R24	R25	R26
Ring D	O ^{CH} ₃ OH	H ₃ C _O OH	OH OH	H ₃ C _N CH ₃	H ₃ C _N ,CH ₃ F OH	CH ₃ N OH	CH ₃ N OH
Struktur- formel		$(\begin{array}{c} \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\$		$\begin{array}{c} H_{2}^{(i)} \\ H_{2}^{(i)} \\ H_{3}^{(i)} \\ \\ H_{3}^{(i)}$	$\begin{array}{c} & \\ & \\ H_{2}C_{2} \\ H_{3}C_{4} \\ & \\ & \\ & \\ & \\ & \\ & \\ & \\ & \\ & \\ $		
IC ₅₀ (PKA) [nM]	26	5	9	12	46	64	150
IC ₅₀ (PKB) [nM]	62	5	53	33	53	24	93

 Tabelle 4.11
 Übersicht über eine Reihe von Inhibitoren mit unterschiedlichen Substituenten am Benzophenon.

Diese acht Inhibitoren sind sich abgesehen von den Substituenten am Benzophenon sehr ähnlich. Die Strukturen der Komplexe mit PKA werden im Folgenden gemeinsam analysiert und verglichen. Sie haben eine Auflösung zwischen 1,8 und 2,49 Å. Eine Überlagerung dieser Strukturen zeigt Abb. 4.22.



Abb. 4.22 A Überlagerung der Inhibitoren R01 (magenta), R02 (hellblau), R21 (blau), R22 (rosa), R23 (hellgrün), R24 (gelb), R25 (dunkelgrün) und R26 (orange) in der ATP-Bindetasche mit den umgebenden Resten. **B** Der Benzophenonteil ist als Stereobild vergrößert dargestellt.

Die Position der Inhibitoren in allen überlagerten Kristallstrukturen stimmt bis auf eine Ausnahme (Inhibitor R25, grün) sehr gut überein. Dort ist der Ring D sehr weit in Richtung des Glycinloops verschoben, wobei der Glycinloop gleichzeitig ebenfalls verschoben wird. Obwohl sich chemische Strukturen von R25 und R26 nur in einem Atom unterscheiden (es handelt sich bei R26 um das Amidanalogon, vgl. Abschnitt 4.3.2), ist die Position in diesem Fall nicht soweit gegenüber den anderen Strukturen verschoben. Auffällig ist, dass in beiden Strukturen die Seitenketten von Ser53 und Phe54 eine veränderte Konformationen gegenüber den anderen Inhibitorstrukturen einnehmen (Abb. 4.23). Diese Abweichungen finden sich in den schlechteren Inhibitionskonstanten beider Inhibitoren wieder (R25: $IC_{50}=64$ nM und R26: $IC_{50}=120$ nM).

Besonders auffällig ist, dass die Hydroxylgruppe am Benzophenon, die allen Inhibitoren gemein ist, auch tatsächlich in einem Punkt konzentriert zu sein scheint (Abb. 4.22). Diese phenolische Gruppe bildet eine sehr enge H-Brücke zu Glu91. Die Abstände liegen meist bei 2,5 Å und die Elektronendichte ist durchgehend. Eine Ausnahme bildet hier wieder Inhibitor

R25, denn der Abstand beträgt hier 3,9 Å. Allerdings befindet sich ein Wassermolekül oder Ion dazwischen, das zu beiden Atomen etwa 2,3 Å Abstand hat (Abb. 4.23).



Abb. 4.23. Deutlich unterschiedliche Position von R25 (grün) gegenüber den anderen Inhibitoren R26 (orange) sowie R21 (blau) und R24 (gelb).

Der Fluorsubstituent hat unterschiedliche Einflüsse auf die Affinität. Im Fall des Inhibitors R21 erhöht er die Affinität zu PKA (von 26 nM auf 8 nM) und PKB (von 62 nM auf 5 nM), im Fall von R23 vermindert er die Affinität (für PKA von 12 nM auf 46 nM). Das Fluor befindet sich im Abstand von ca. 3,5 - 3,6 Å zur Hydroxylgruppe von Ser53. In ortho-Position liegen das Benzophenoncarbonyl und ein weiterer Substituent. Dies ist bei Inhibitor R21 eine Methoxygruppe, bei R23 eine Dimethylaminogruppe. Die Bindetasche ist an dieser Stelle sehr eng, so dass bei R23 eine sehr ungünstige Wechselwirkung innerhalb des Inhibitors entsteht. Eine der beiden Methylgruppen muss sich zum Fluor drehen und ist dann nur 2,8 Å entfernt, während sich die einzelne Methoxygruppe zur anderen Seite wenden kann (siehe Abb. 4.24).



Abb. 4.24 a Vergleich zwischen R01 (magenta) mit und R21 (blau) ohne Fluorsubstituent: Die Position ist sehr ähnlich, aber die Methylgruppe weist in die andere Richtung relativ zum Fluor. **b** Ein sterischer Konflikt tritt auf, wenn zusätzlich zur Dimethylaminogruppe (R23, grün) die Fluorgruppe vorhanden ist (R24, gelb).

In der Überlagerung (Abb. 4.22) sind auch die Bewegungen des Proteins noch einmal gut zu erkennen. Leu173 und Thr183 sind sicherlich die flexibelsten Reste in der Bindetasche. Ihre Seitenketten treten bevorzugt zwei Konformationen auf, zum Teil auch innerhalb eines einzigen Kristalls. Wie bereits beschrieben, ist der Glycinloop so flexibel, dass er sich den Liganden anpassen kann. Vor allem Ser53 und Phe54 sind davon betroffen. Eine besondere Aminosäure ist auch Asp184. Bei allen Inhibitoren mit der Amidgruppe orientiert sich die Seitenkette so, dass eine H-Brücke zum Amidstickstoff möglich ist. Bei allen Inhibitoren mit Estergruppen zeigt sie zum Azepanstickstoff (Abschnitt 4.3.2).

Die Inhibitionskonstanten dieser Inhibitoren unterscheiden sich zwischen PKA und PKB nicht besonders stark. Sie sind teilweise in Kontakt mit Aminosäuren (Phe187 und Gln84), die zwischen PKA und PKB unterschiedlich sind. Diese Unterschiede sollen für selektive Verbindungen weiter ausgenutzt werden und wird im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

4.3.5 Selektivität für PKB durch räumlich anspruchsvolle Benzophenon-Substituenten

Im Bereich der Substituenten von Ring D gibt es zwei Unterschiede in der Sequenz zwischen PKA und PKB. Diese Unterschiede (Phe187Leu und Gln84Glu) machen die Benzophenontasche in PKB größer und verändern die Ladung an der Stelle von Gln84. Dort können räumlich anspruchsvolle Substituenten eine Selektivität für PKB erreichen. Diese beiden Austausche wurden in der PKAB4 und PKAB5 Mutante realisiert.

Die in der Tabelle 4.12 gezeigten Inhibitoren wurden mit PKA und in besonderen Fällen zusätzlich mit PKAB4 oder PKAB5 zum Vergleich kokristallisiert und die Strukturen gelöst (Tabelle 4.13). Bindungskonstanten wurden kalorimetrisch mit ITC (Abschnitt 3.2.1.13) für PKA, PKAB3 und PKAB5 bestimmt, um den Einfluss einzelner Aminosäuren genauer zu analysieren.

Die überlagerten Strukturen zeigen eine ähnliche Position im Bereich der Ringe A, B und C. In der Lage von Ring D und dessen Substituenten treten allerdings größere Unterschiede auf.



Abb. 4.25 Überlagerung der Inhibitoren R23, R31, R32, R33 und R34

Inhibitor	R23	R31	R32	R33	R34
Substituent an Ring D	-N ^{CH} ³ CH ³		-N		
Struktur- formel	$\begin{array}{c} & \\ & \\ & \\ H_{1} C_{1} C_{2} C_{1} C_{1} \\ & \\ & \\ & \\ & \\ & \\ & \\ & \\ & \\ & \\ $			$\begin{array}{c} \underset{l}{{\underset{l}}}{{\underset{l}}} \\ \underset{l}{{\underset{l}}}{{\underset{l}}} \\ \underset{l}{{\underset{l}}}{{\underset{l}}} \\ \underset{l}{{\underset{l}}}{{\underset{l}}}{{\underset{l}}} \\ \underset{l}{{\underset{l}}}}{{\underset{l}}}{}{\underset{l}}}{{\underset{l}}}{}{\underset{l}}}{{\underset{l}}}{{\underset{l}}}{{\underset{l}}}{}{\underset{l}}}{{\underset{l}}}{{\underset{l}}}{{\underset{l}}}}{{\underset{l}}}{}{\underset{l}}}{}{\underset{l}}}{}{\underset{l}}}{{\underset{l}}}{}{\underset{l}}}{}{\underset{l}}}{}{\underset{l}}}{}{\underset{l}}}{}{\underset{l}}}{}{\underset{l}}}{}{\underset{l}}}{}{\underset{l}}}{}{$	$\begin{pmatrix} c \\ c \\ c \\ d \\$
K (PKA) [nM]	34	3300	48	150	n. b.
K (PKAB3) [nM]	40	3770	190	260	n. b.
K (PKAB5) [nM]	17	260	9	8	n. b.

Tabelle 4.12 Strukturformeln der Inhibitoren R23, R31, R32, R33 und R34. Die Bindungskonstanten K_i [nM] wurden mit ITC bestimmt.

 Tabelle 4.13
 Datensammlung- und Verfeinerungsstatistik

РКА	PKAB5	РКА	PKAB4	РКА	РКА	РКА
R23	R23	R31	R31	R32	R33	R34
Rotating	DESY-	DESY-	DESY-	DESY-	DESY-	SLS -
Anode	BW6	BW6	BW6	BW6	BW6	PX
1,54179	1,05	1,05	1,05	1,05	1,05	1,00076
$P2_{1}2_{1}2_{1}$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
73,0 79,1	61,7 78,8	74,1 76,8	40 70 117	61,4 76,0	73,8 75,4	70,7 73,3
79,1	78,8	79,5	49/911/	78,7	79,4	78,1
33-2,45	17-1,64	18-2,05	15-2,46	16 -1,9	17-2,47	23-1,6
98,8	98,1	99,8	97,4	98,7	98,7	93,2
[96,1]	[94,2]	[100]	[87,4]	[96,8]	[96,8]	[100]
10,0 [3,7]	6,1 [1,3]	7,1 [1,6]	4,8 [1,7]	6,2 [1,5]	3,1 [2,3]	1,6 [2,5]
4,3 [3,9]	3,8 [3,7]	5,5 [5,5]	2,7 [3,0]	3,2 [3,1]	4,2 [4,1]	3,6 [3,8]
6,2 [20,8]	9,4 [53,8]	8,1 [44,2]	12,2	9,4 [46,9]	9,3 [33,3]	16,4
			[38,6]			[26,3]
2,45	1,64	2,05	2,46	1,9	2,47	1,6
3040	3328	3200	3078	3245	3100	3421
16412	44150	27600	16210	28049	154881	44536*
18,9/24,2	16,6/19,8	18,2/23,6	22,2/27,2	18,9/24,9	18,8/25,4	20,0/23,5
0,019	0,012	0,016	0,015	0,017	0,015	0,014
1,622	1,345	1,503	1,428	1,520	1,496	1,412
27,3	18,1	29,6	33,9	22,9	37,4	16,5
	PKA R23 Rotating Anode 1,54179 P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ 73,0 79,1 33-2,45 98,8 [96,1] 10,0 [3,7] 4,3 [3,9] 6,2 [20,8] 2,45 3040 16412 18,9/24,2 0,019 1,622 27,3	PKA PKAB5 R23 R23 Rotating DESY- Anode BW6 1,54179 1,05 P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ 73,0 79,1 61,7 78,8 33-2,45 17-1,64 98,8 98,1 [96,1] [94,2] 10,0<[3,7]	PKA R23 PKAB5 R23 PKA R31 Rotating Anode DESY- BW6 DESY- BW6 1,54179 1,05 1,05 P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ 73,0 79,1 61,7 78,8 79,1 78,8 79,5 33-2,45 17-1,64 18-2,05 98,8 98,1 99,8 [96,1] [94,2] [100] 10,0 [3,7] 6,1 [1,3] 7,1 [1,6] 4,3 [3,9] 3,8 [3,7] 5,5 [5,5] 6,2 [20,8] 9,4 [53,8] 8,1 [44,2] 2,45 1,64 2,05 3040 3328 3200 16412 44150 27600 18,9/24,2 16,6/19,8 18,2/23,6 0,019 0,012 0,016 1,622 1,345 1,503 27,3 18,1 29,6	PKA R23PKAB5 R23PKA R31PKAB4 R31Rotating AnodeDESY- BW6DESY- BW6DESY- BW61,541791,051,051,05 $P_{2_12_{12}1}$ $P_{2_12_{12}1}$ $P_{2_12_{12}1}$ $P_{2_12_{12}1}$ $P_{2_12_{12}1}$ 73,079,161,778,874,176,879,178,874,176,879,178,879,515-2,4698,898,199,897,4[96,1][94,2][100][87,4]10,0 [3,7]6,1 [1,3]7,1 [1,6]4,8 [1,7]4,3 [3,9]3,8 [3,7]5,5 [5,5]2,7 [3,0]6,2 [20,8]9,4 [53,8]8,1 [44,2]12,22,451,642,052,4630403328320030781641244150276001621018,9/24,216,6/19,818,2/23,622,2/27,20,0190,0120,0160,0151,6221,3451,5031,42827,318,129,633,9	PKA R23PKAB5 R23PKA R31PKAB4 R31PKA R31Rotating AnodeDESY- BW6DESY- BW6DESY- BW6DESY- BW61,541791,051,051,051,05 $P_{21}2_{12}$ $P_{21}2_{12}$ $P_{21}2_{12}$ $P_{21}2_{12}$ $P_{21}2_{12}$ $P_{21}2_{12}$ $P_{21}2_{12}$ 73,079,1 $61,7$ $78,8$ $79,5$ $79,1$ $78,7$ $61,4$ $78,7$ 33-2,4517-1,6418-2,0515-2,4616-1,998,898,1 $99,8$ 99,897,4 $98,7$ 98,7[96,1] $10,0$ [3,7] $6,1$ [1,3] $7,1$ [1,6] $4,8$ [1,7] $12,2$ $6,2$ [1,5] $4,3$ [3,9] $3,8$ [3,7] $9,4$ [53,8] $5,5$ [5,5] $2,7$ [3,0] $3,2$ [3,1] $32,8$ $6,2$ [20,8] $9,4$ [53,8] $9,4$ [53,8] $8,1$ [44,2] $12,2$ $12,2$ $164129,4 [53,8]4150164124415027600162102804918,9/24,216,6/19,81,82/23,622,2/27,21,89/24,90,0190,0120,0160,0150,0171,6221,3451,5031,4281,42827,318,129,633,922,9$	$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $

*[äußerste Schale]

4.3.5.1 Kokristallstrukturen von R23 mit PKA und PKAB5

Inhibitor R23 hat vergleichbare, nanomolare Bindungskonstanten für PKA (34 nM), PKAB3 (40 nM) und PKAB5 (23 nM). Auch die beiden Kristallstrukturen von Komplexen mit PKA (2,45 Å) und PKAB5 (1,64 Å) sind sehr ähnlich. Nach dem *Molecular Replacement* mit einem PKA-PKI(5-24)-Modell und der Berechnung der ersten Dichte sind der Inhibitor und die veränderten Seitenketten der mutierten Aminosäuren deutlich zu erkennen. Die Mutationen verursachen keine wesentlichen Konformationsänderungen weder des Proteins noch des Inhibitors. Im Vergleich zur inzwischen bekannten PKB-Struktur [73] sieht man, dass die Seitenketten der Rotamer-Konformation in PKB entsprechen. Die Mutanten stellen somit ein verbessertes Modell für PKB dar.

Drei Mutationen liegen in der Pyridin-Bindetasche: Val123Ala, Leu173Met und Gln181Lys. Auch hier ist wie bei Strukturen der PKAB2-Mutante (Abschnitt 4.3.2.4) die Ebene des Rings A vermutlich unter Einfluss des Met173 gekippt. Die beiden anderen Mutationen (Phe187Leu und Gln84Glu) liegen in der Benzophenontasche (Abb. 4.26).

Die Bindung Inhibitor R23 an PKA entspricht im Wesentlichen der Bindung von R02 (Abschnitt 4.3.2.2). Der Einfluss des unterschiedlichen Substituenten am Benzophenon wurde im Abschnitt 4.3.4 analysiert.



Abb. 4.26 Kristallstrukturen von Komplexen des Inhibitor R23 mit PKA (2,45 Å) (grün) und PKAB5 (1,64 Å) (rot) wurden überlagert. Die Bindetasche mit allen Aminosäuren, deren Seitenketten im Bereich von van-der-Waals-Wechselwirkungen liegen, zeigt die gute Übereinstimmung der Strukturen, aber auch die fünf Mutationen.

4.3.5.2 Kokristallstrukturen von R31 mit PKA und PKAB4

Die Benzophenontasche ist im Prinzip sehr groß und wird durch einen großen Teil der Inhibitoren nicht komplett ausgefüllt (Abschnitt 4.2.2.3). Diese Inhibitoren zeigen keine Selektivität zwischen PKA und PKB sondern hemmen beide Enzyme im niedrigen nM-Bereich. Eine Selektivität für PKB kann durch große Substituenten erreicht werden. Denn in der Benzophenontasche gibt es Unterschiede zwischen PKA und PKB: Phe187 ist Leu in PKB, Gln84 ist Glu und Ser53 ist Thr. Prinzipiell kann der Austausch Phe187Leu die Bindetasche vergrößern und sollte große, raumfüllende Substituenten besser aufnehmen können. Ionische oder Coulomb-Wechselwirkungen werden durch den Austausch von Gln84Glu beeinflusst. Auf der Basis dieser Überlegungen wurde Inhibitor R31 synthetisiert. Er trägt an Dimethylamino-Substituenten ein Dimethylpiperidin Stelle des am Benzophenon (Tabelle 4.12). Kokristallstrukturen konnten sowohl von einem Komplex mit PKA (2,05 Å) als auch mit PKAB4 (2,46 Å) gelöst werden. Sie sind in Abb. 4.27 überlagert. Um den Einfluss der Mutationen in der Bindetasche auf die Affinität zu analysieren, wurden die Bindungskonstanten mit ITC für PKA (3300 nM), PKAB3 (3700 nM) und PKAB5 (260 nM) bestimmt. Diese Werte passen zu der Erwartung, dass PKB, nicht aber PKA inhibiert wird. Dass PKA und PKAB3 µM, PKAB5 jedoch nM gehemmt wird, zeigt außerdem, dass die beiden Austausche in der Benzophenontasche nötig sind, um die Affinität des Inhibitors herzustellen. Die drei Mutationen in der Adenin- bzw. Pyridin-Bindetasche scheinen die Affinität nicht wesentlich zu beeinflussen.



Abb. 4.27 Kristallstrukturen von Komplexen des Inhibitor R31 mit PKA (2,05 Å) (blau) und PKAB4 (2,46 Å) (gelb) wurden überlagert.

Die beiden Strukturen zeigen eine unterschiedliche Lage des Benzophenons sowie eine unterschiedliche Ausrichtung des Benzophenonsubstituenten. In der Struktur PKAB4-R31 ist die Orientierung so, wie durch das Modelling vorhergesagt wurde (Abb. 4.27). Die beiden Methylgruppen nutzen den größeren Platz in der Benzophenontasche aus, sind in Richtung

Leu187 orientiert und liegen in Bereich von van-der-Waals-Kontakten zu Gly186 und Leu187. Die sekundäre Aminogruppe orientiert sich so, dass Wasserstoffbrücken zur Seitenkette von Ser53 (2,9 Å) und Glu84 (2,9 Å) möglich sind. Die Rotamer-Konformation von Glu84 ändert sich gegenüber den anderen Strukturen und zeigt mehr in die Bindetasche zum Inhibitor hin (Abb. 4.27). Die Elektronendichte zeigt deutlich die Position der beiden Methylgruppen und des Amins, obwohl nicht alle Atome des flexiblen Piperidinrings aufgelöst sind (Abb. 4.28). Es kommt öfters vor, dass gesättigte Ringe mehrere Konformationen einnehmen können oder flexibel sind (Abschnitt 4.2). Die Nähe der Aminogruppe zum Fluor (2,7 Å) ist analog zu R24 (Abschnitt 4.3.4) ungünstig. Dies kann mit dazu beitragen, dass die Bindungskonstante für PKAB5 um den Faktor 10 schlechter ist als für Inhibitor R23.



Abb. 4.28 Bindung des Benzophenons des Inhibitors R31 an PKAB4. Eine F_0 - F_c -Elektronendichte (bevor der Inhibitor mitverfeinert wurde) ist auf 2.0 σ konturiert.



Abb. 4.29 Bindung des Benzophenons des Inhibitors R31 an PKA. Eine F_o - F_c -Elektronendichte (bevor der Inhibitor mitverfeinert wurde) ist auf 2.0 σ konturiert, mögliche Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien eingezeichnet.

In der Struktur PKA-R31 nimmt der Benzophenonsubstituent eine völlig andere Position ein; er ist um ca. 180° gedreht im Vergleich zur PKAB4-Struktur. Dadurch wird der Glycinloop verschoben, ähnlich wie bei R25 (Abschnitt 4.3.4, Abb. 4.23), nur noch weiter. Dadurch ist auch hier eine direkte Wasserstoffbrücke zu Glu91 (4,3 Å) nicht mehr möglich, ein Wassermolekül oder Ion befindet sich dazwischen, in ähnlicher Position wie bei R25. Aber auch die Wasserstoffbrücke zu Lys72 ist nicht mehr möglich, da der Abstand 3,7 Å beträgt. Die beiden Methylgruppen zeigen jetzt in Richtung Ser53 und Gln84, was zu energetisch ungünstigen Wechselwirkungen führt. Drei Wassermoleküle liegen im Abstand von 2,9 Å bis 3,1 Å vom Piperidinstickstoff. Auch innerhalb des Inhibitors kommt es zu ungünstigen Wechselwirkungen, da der Piperidinstickstoff nur 2,7 Å vom Fluorsubstituent entfern ist. Insgesamt führt die Summe dieser unvorteilhaften Interaktionen zu einer schwachen Bindungskonstante von nur 3,3 μ M.

4.3.5.3 Kokristallstruktur von R32 (Piperidin) und PKA

Inhibitor R32 unterscheidet sich von Inhibitor R23 dadurch, dass der Dimethylaminosubstituent durch einen Piperidinring ersetzt, wurde, der über den Stickstoff an den Benzophenonring gebunden ist (Tabelle 4.12). Auch der Piperidinring allein ist ein größerer Substituent und sollte besser an PKB als an PKA binden. Die Bindungskonstanten liegen für PKA (48 nM) und PKAB3 (190 nM) um den Faktor 5 bis 10 höher als für PKAB5 (9 nM). In der 1,9 Å-Struktur des Inhibitor-Komplexes mit PKA sind Unterschiede zu R23 oder R01 zu sehen. Die Lage des Inhibitors ist ab dem Benzophenon verändert. Da der Abstand zum Glycinloop (gemessen an der Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonylsauerstoff des Benzophenons und dem Amidstickstoff von Phe54) sich nicht ändert, wird dieser gleichermaßen verschoben. Dabei erhöht sich der Abstand zu Glu91 auf 3,0 Å, liegt aber immer noch im Bereich für eine H-Brücke. Der Piperidinring scheint flexibel zu sein, da dort die Elektronendichte im Vergleich zu den anderen Teilen des Inhibitors etwas schwächer ist (Abb. 4.30). Das Pseudosubstratpeptid PKI(5-24), das in allen Strukturen kokristallisiert ist, liegt nahe der Bindetasche. In diesem Fall, wie auch bei anderen Inhibitoren mit großen Benzophenonsubstituenten wie R31, R33 und R34, wird die Seitenkette der P+2 Aminosäure von PKI (His23) verdrängt, da der Inhibitor sich diese Richtung ausdehnt.



Abb. 4.30 A Inhibitor R32 (gelb) B Inhibitor R33 (türkis) C Inhibitor R34 (blau) sind in der Bindetasche mit möglichen H-Brücken und der auf 2.0 σ konturierten F₀-F_c-Elektronendichte (vor der Verfeinerung mit Inhibitor) dargestellt.

4.3.5.4 Kokristallstruktur von R33 (m-Dimethyl-Piperidin) und PKA

Die Struktur von PKA und R33 wurde mit einer Auflösung von 2,47 Å gelöst. Auch in diesem Fall sind die Bindungskonstanten für PKA (150 nM) und PKAB3 (77 nM) etwa um den Faktor 20 bzw. 10 höher als für PKAB5 (8 nM). Die Benzophenon-Bindetasche ist bei PKA zu klein für diesen raumfüllenden Substituenten. Sie zwingt den Piperidinring in eine energetisch ungünstige Halbsessel-Konformation, wobei die Dimethylgruppe zwischen Ser53, PKI(5-24) (*P-site* Ala21) und Phe187 zu liegen kommt (Abb. 4.30). Bei der Bindung an die PKAB5-Mutante oder PKB könnte diese ungünstige Konformation durch die größere

Bindetasche vermieden werden. Die Bindung liegt in der Tat in niedrigen nM-Bereich: K(PKAB5)=8 nM und IC₅₀(PKB)=20 nM.

4.3.5.5 Kokristallstruktur von R34 (p-Dimethyl-Piperidin) und PKA

Die Kristallstruktur von PKA-R34 hat eine Auflösung von 1,6 Å und ist damit die Kokristallstruktur eines Balanolderivats mit der bisher höchsten Auflösung. Der Inhibitor bindet ähnlich wie Inhibitor R23, erstreckt sich aber viel weiter in die Benzophenontasche. Dabei wird durch den großen Substituenten die Position des Aktivierungsloops (von Phe187 bis Thr201) und der Helix C verändert. Phe187 klappt um und verdrängt das benachbarte Cys199. Die Position von Thr197 ist um fast 1 Å verschoben, mit ihm die Bindungspartner Arg165 und Lys198. Die Salzbrücke zu His87 geht allerdings verloren, der Abstand beträgt 3,8 Å, da His87 sich zusammen mit der Helix C wegbewegt, die Kinasedomäne ist weiter geöffnet. Diese weitreichenden Konformationsänderungen scheinen die Bindungsaffinität des Inhibitors für PKA zu vermindern. Der IC₅₀-Wert liegt bei nur 1,7 μ M.

4.3.5.6 Zusammenfassung und Vergleich

Die Inhibitoren R31, R32, R33 und R34 besitzen alle einen Piperidinring am Benzophenon (Ring D) mit Dimethylgruppen in verschiedenen Positionen und ohne. Sie binden alle in unterschiedlicher Weise an PKA und zeigen eine verminderte Bindungsaffinität zu PKA oder PKAB3 im Vergleich zu R01 und R23. Dies kann anhand der Strukturen erklärt werden, die starke Konformationsänderungen im Protein (R31, R32, R34) oder ein ungünstige Konformation des Inhibitors (R31, R33) selbst zeigen. Die hohe Affinität zu PKB und der PKAB5-Mutante ist in den meisten Fällen gegeben, nicht aber bei PKA oder PKAB3. Dies ist durch zwei Austausche Phe187Leu und Gln84Glu bedingt, wobei vermutlich die sterischen Effekte durch Phe187Leu die größere Rolle spielen.

4.3.6 Ersatz des Azepanrings

Auch der Azepanring (Ring B) kann durch andere Ringe oder auch azyklische Gruppen ersetzt werden. Während die Derivate mit 5-Ringen PKA zum Teil noch μ M inhibieren, geht bei den meisten azyklischen Verbindungen die Affinität zu PKA verloren, so dass PKC-selektive Verbindungen erhalten werden [225, 226].

Der Azepanring wurde bei dem Inhibitor R14 durch ein Pyrrolidin und bei R42 durch ein Bicyclo[2.2.1]heptan ersetzt (Tabelle 4.14). Die Strukturen konnten mit einer Auflösung von 2,95 und 2,45 Å gelöst werden. Mehrere Komplexe von weiteren Inhibitoren mit Pyrrolidinringen kristallisierten nicht oder lieferten Strukturen ohne Inhibitor, dies zum Teil auch nach *Soaking* in höher konzentrierten Inhibitorlösungen.

Inhibitor	R01	R42	R14	
Ring B	N _N , NH	z	Z O	
Strukturformel	$ \begin{array}{c} \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\$		$H_{C} \xrightarrow{P_{i}} H_{i} \xrightarrow{P_{i}} H_{i$	
IC ₅₀ (PKA) [nM]	5	19000	4900	
IC ₅₀ (PKB) [nM]	5	5000	2900	
Auflösung der Struktur [Å]	2,5	2,95	2,45	

Tabelle 4.14Strukturformeln der Inhibitoren R23, R31, R32, R33 und R34



Abb. 4.31 Überlagerung der Inhibitor-Komplexe mit R01 (magenta), R14 (blau) und R42 (grün). Seitenansicht und Aufsicht zeigen Verschiebungen beider Linker und des Rings A.



Abb. 4.32 Überlagerung der Inhibitor-Komplexe mit R01 (magenta), R14 (blau) und R42 (grün). Wasserstoffbrücken zum Protein sind einzeichnet.

In Abb. 4.31 und 4.32 sind die überlagerten Strukturen der Komplexe von R01, R14 und R42 mit PKA dargestellt. Bei R14 verschiebt sich Ring A, da es sich um ein Phenol handelt (Abschnitt 4.3.3). Die Position des 5-Rings stimmt mit dem des 7-Rings gut überein. Die möglichen Wasserstoffbrücken sind eingezeichnet. Der Pyrrolidinstickstoff bildet ähnlich wie der Azepanstickstoff Wasserstoffbrücken zum Carbonylsauerstoff von Glu170, Carbonylsauerstoff der Seitenkette von Gln171 und zur Carboxylatsauerstoff von Asp184. Asp184 nimmt dabei eine andere Konformation ein, um die H-Brücke zum Stickstoff des 5-Rings zu ermöglichen. Die Affinität zu PKA liegt trotzdem nur bei 4,9 μ M.

Der Inhibitor R42 (Bicyclus) bindet ebenfalls ähnlich wie die Inhibitoren mit 5- und 7-Ring, allerdings beansprucht er etwas mehr Platz in Richtung Glu127. Da die Ribose-Bindetasche viele polare Aminosäuren (Glu127, Glu170, Asp184) enthält, wäre es sinnvoll, positiv geladene Stickstoffatome (protonierte Amine) als Gegenladung zu haben. Da sie bereits in engstem Kontakt zu den Sauerstoffatomen stehen, wären besonders das Kohlenstoffatom, das fast mit den Aminstickstoffen von R01 oder R14 überlagert (3,1 und 3,3 Å zu Glu170 und Gln171) oder das der 1-Brücke (3,0 Å zu Glu127) geeignet. Gerade diese Wechselwirkungen können auch dazu beitragen, dass der Inhibitor R42 PKA und PKB nur μ M hemmt (IC₅₀(PKA)=19 μ M und IC₅₀(PKB)=5 μ M).

4.3.7 Zusammenfassung

Eine Klasse von PKB bzw. PKA Inhibitoren leitet sich vom Naturstoff Balanol ab. Balanol besteht in seiner chemischen Struktur aus vier Ringen: ein Phenol ist über ein Amid an einen Azepanring gebunden, der über einen Ester mit einem Benzophenon mit Substituenten verknüpft ist. Alle Teile des Moleküls können modifiziert werden, was einen unterschiedlichen Einfluss auf die Affinität zu verschiedenen Kinasen haben kann. Das Phenol (A) besetzt die Adenin-Bindetasche und ist ungünstig für eine PKB-Inhibition. Wird dieser Teil allerdings durch ein Pyridinring ersetzt, steigt die Affinität der Inhibitoren zu PKB. Das Azepan (B) kann durch andere Ringe ersetzt werden, aber sowohl PKA als auch PKB scheinen dies nicht zu tolerieren, die Affinität wird vermindert und liegt im µM-Bereich. Der Benzophenonteil kann durch diverse Substituenten an beiden Ringen (C und D) modifiziert werden, ohne dass große Affinitätsverluste zu PKA und PKB auftreten. Dies steht im Gegensatz zu PKC, die hier sehr sensitiv ist. Die Benzophenontasche ist im Prinzip sehr groß, und wird durch einen großen Teil der Inhibitoren nicht komplett ausgefüllt. Diese Inhibitoren zeigen keine Selektivität zwischen PKA und PKB, sondern hemmen beide Enzyme im niedrigen nM-Bereich. Eine Selektivität für PKB kann durch große Substituenten erreicht werden, denn in der Benzophenontasche gibt es Unterschiede zwischen PKA und PKB: Phe187 ist Leu in PKB und Gln84 ist Glu. Prinzipiell kann der Austausch von Phe187 zu Leu große, raumfüllende Substituenten besser aufnehmen. Elektrostatische Wechselwirkungen werden durch den Austausch von Gln84 zu Glu beeinflusst.



PKC sensitiv

Abb. 4.33 Einfluss verschiedener Modifikationen auf die Affinität zu PKA, PKB und PKC

4.4 Strukturen von PKA und PKAB-Mutanten im Komplex mit Bisindolylmaleimiden

Bisindolylmaleimide (BIM) leiten sich vom universellen Kinase-Inhibitor Staurosporin (Indolo[2,3-a]carbazol) ab. Sie sind offenkettige Derivate, die verschiedene Substituenten am Indolring tragen können (Tabelle 4.15). Sie wurden auf eine Inhibition von PKC hin optimiert und weiterentwickelt. Derivate wie Ruboxystaurin (LY333531) und N-Benzoyl-Staurosporin (PKC412 oder CGP41251) sind bereits in klinischen Phasen [*152, 227, 228*]. Bisher gibt es keine Kristallstruktur von PKC, obwohl die verschiedenen PKC-Isoformen seit vielen Jahren im Fokus der Kinase-Forschung stehen. Kokristallstrukturen von Staurosporin mit PKA und acht weiteren Kinasen (CDK2, CSK, PI3K, PDK1, Chk1, MKK2, GSK-3, Lck) sind beschrieben. Verschiedene Bisindolymaleimide konnten mit PKA und PKAB-Mutanten kokristallisiert werden. Die Kristalle sind wie die Inhibitoren orange-rot gefärbt und ca. 0,5 bis 1 mm groß (Abb. 4.34). Die Raumgruppe ist in den meisten Fällen kubisch, seltener auch orthorhombisch. Tabelle 4.16 gibt einen Überblick über die gelösten Strukturen.



Abb. 4.34 Durch den Inhibitor BIM1 orange-rot gefärbte Kokristalle mit PKAB5 und PKI(5-24). Der Kristall im oberen rechten Eck des Tropfens wurde gefroren und streute am Synchrotron (DESY, Hamburg) bis 2,5 Å.

	R=	Inhibitor	Abkürzung
	-(CH ₂) ₃ -N-(CH ₃) ₂	Bisindolylmaleimid I	BIM1
	2-(1-Methylpyrrolidino)ethyl-	Bisindolylmaleimid II	BIM2
	-(CH ₂) ₃ -NH ₂	Bisindolylmaleimid III	BIM3
	-H	Bisindolylmaleimid IV	BIM4

 Tabelle 4.15
 Strukturformeln von Bisindolylmaleimid-Inhibitoren

Ductoin	T	Detek-	Auf-	р	р	Raum-	Zellleenstenten	р	Vollstän-
Protein	Inhibitor	tor	lösung	K _{cryst}	K _{free}	gruppe	Zenkonstanten	K _{sym}	digkeit
PKAB5	BIM1	CCD	2,55	20,6	24,9	P4 ₁ 32	170,5	0,080	97,1
PKAB5	BIM4	CCD	2,28	17,5	20,9	P4 ₁ 32	169,7	0,077	98,7
РКА	BIM3	IP	3,2	22,0	25,9	P4 ₁ 32	171,4	0,172	99,7
PKAB4	BIM3	CCD	3,15	21,2	29,2	P4 ₁ 32	169,2	0,169	93,0
PKAB2	BIM3	CCD	3,0	20,8	24,0	P4 ₁ 32	169,6	0,100	99,9
PKAB2	BIM3	CCD	1,7	23,9	26,7	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	59,2/79,4/100,6	0,076	94,8
PKAB3	BIM2	CCD	2,5	23,3	29,1	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	82,1/89,0,116,4	0,099	99,8

Tabelle 4.16 Kokristallstrukturen von PKA und PKAB-Mutanten mit PKI und Bisindolylmaleimid-Inhibitoren

Die kubischen Kristalle zeigen eine besondere Proteinstruktur, die im Abschnitt 4.7.2 gesondert beschrieben wird. Die orthorhombische Struktur PKAB3-BIM2 mit zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit zeigt sowohl Protein als auch den gebundenen Liganden in stark unterschiedlichen Konformationen [229]. Die orthorhombische Struktur PKAB2-BIM3 mit einem Molekül in der asymmetrischen Einheit, zeigt eine geschlossene Konformation und ist nur teilweise mit dem Inhibitor besetzt.

In diesem Abschnitt wird nur die Inhibitorbindung von kubischen Kristallen analysiert.

Die unterschiedlichen Bisindolylmaleimide, die sich durch den Substituenten an einem der Indolringe unterscheiden, binden in der kubischen Raumgruppe prinzipiell ähnlich. Sie binden in der Adenosin-Bindetasche mit Kontakten zur Hinge Region (Met120, Glu121, Tyr122, Val/ Ala123, Glu127), zum Glycinloop (Leu49, Val57), zum β-Faltblatt 3 (Ala70), zum Aktivierungsloop (Thr183, Asp184) und zum katalytischen Loop (Glu170, Gln171, Leu/Met173) (Abb. 4.35). Phe327 zeigt normalerweise auch in diese Tasche, was aber mit den in dieser Form gebundenen Inhibitoren nicht zu vereinbaren ist. Der komplette C-Terminus (mit Phe327) verläuft anders (Abschnitt 4.4.2). Die Inhibitoren können mehrere Wasserstoffbrücken zum Protein bilden: vom Maleimidstickstoff zum Carbonylsauerstoff Glu121, von Maleimidcarbonylsauerstoff zum Amidstickstoff von Val/Ala123 und vom anderen Maleimidcarbonylsauerstoff zur Hydroxylgruppe von Thr183. Letztere fehlt im Komplex PKAB5-BIM1, da Thr183 eine andere Rotamer-Konformation einnimmt. Der Substituent am Indol ist nur im Komplex PKAB5-BIM1 aufgelöst, die tertiäre Aminogruppe des Dimethylaminopropylrests, die vermutlich protoniert ist, kann eine Wasserstoffbrücke zur Carboxylatgruppe von Glu127 bilden (2,8 Å). BIM4 trägt keinen Substituenten. BIM3 hat einen Aminopropylrest, der allerdings sowohl im Komplex mit PKA als auch mit PKAB2 ungeordnet ist. Nur das erste Kohlenstoffatom ist noch in der Elektronendichte zu erkennen.



Abb. 4.35 Vier Komplexe von PKA und PKAB-Mutanten mit Bisindolylmaleimid-Inhibitoren. Von hellgrün nach dunkelgrün mit Inhibitoren von rot nach gelb gefärbt sind PKAB5-BIM4, PKAB5-BIM1, PKA-BIM3, PKAB2-BIM3.

PKA ist in einer weiter geöffneten Konformation als in den Komplexen mit den zuvor beschriebenen Balanolderivate oder Rho-Kinase-Inhibitoren. Der Glycinloop im PKA-BIM3-Komplex kann seine Konformation ändern und sich stark in Richtung des Inhibitors krümmen. Dadurch rückt die Seitenkette von Phe54 bis auf 4,4 Å an den Inhibitor heran (Abb. 4.36). Bei den anderen Strukturen in dieser Raumgruppe wurde dies nicht beobachtet. Bei der orthorhombischen PKAB3-BIM2 mit zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit zeigt nur bei Molekül A den Glycinloop in einer ähnlichen Konformation [229].



Abb. 4.36 Die Komplexe PKA-BIM3 (dunkelgrün-orange) und PKAB5-BIM4 (hellgrün-rot) zeigen deutlich unterschiedliche Konformationen des Glycinloops.

4.5 Struktur des Komplexes von PKA und MnADP

Verschiedene Kristallstrukturen von Komplexen aus PKA, Nucleotid und Peptid, beziehungsweise deren Analoga, sind gelöst worden. Sie geben einen Einblick in den Katalysemechanismus (Abschnitt 2.2.3). Die Struktur von PKA mit ADP fehlt noch zum Verständnis des letzten Schrittes des Katalysezyklus, die Freisetzung der Produkte.

Die Kristallansätze wurden mit PKA, MEGA-8, MnCl₂ und einem ATP-Kemptidderivat durchgeführt. Die Röntgenstruktur hat eine Auflösung von 1,68 Å. Sie zeigt allerdings nur ADP und zwei Mn²⁺-Ionen aber kein Peptid. Es muss also eine Reaktion stattgefunden haben und das Phosphopeptid (Produkt) freigesetzt worden sein. ADP und die beiden Mn-Ionen sind mit der *omit* F_0 - F_c Elektronendichte in Abb. 4.37 dargestellt.



Abb. 4.37 Mn-ADP im Komplex mit PKA mit der F_o - F_c Elektronendichte konturiert auf 2σ . Der Glycinloop zeigt zwei alternative Konformationen.

Der MnADP Komplex zeigt eine geschlossene Konformation, ähnlich wie die Komplexe von PKA, AMP-PNP, Mn^{2+} und PKI(5-24)³ (1CDK) oder PKA, ADP, AlF₃, Mg²⁺ und SP20⁴ (1L3R). Die Raumgruppe ist orthorhombisch P2₁2₁2₁ mit neuen Zellkonstanten (a=43,7, b=64,0, c=115,4) und mit einem Molekül in der asymmetrischen Einheit. Der Matthews Koeffizient ist 1,79, der Solvensgehalt liegt bei 30,8 %. Dadurch ist auch die Packung sehr dicht. 160 Aminosäuren sind an Kristallkontakten beteiligt, das sind dreimal soviel wie in der typischen orthorhombischen Raumgruppe (P2₁2₁2₁ mit a=74, b=76 und c=80). Einen Überblick über die Datensammlung und Verfeinerung gibt Tabelle 4.17.

³ PKI(5-24) auch IP20 hat die Sequenz TTYADFIASGRTGRRNAIHD

⁴ SP20 hat die Sequenz TTYADFIASGRTGRRASIHD

Datensammlung	
Beamline DESY Hamburg	BW-6
Wellenlänge (Å)	1.05
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellkonstanten (a, b, c) (Å)	43.7 64.0 115.4
Auflösung (Å)	18.1-1.68
Vollständigkeit (%) [äußerste Schale 1.68-1.77]	83.5 [69.7]
$I/\sigma(I)$ [äußerste Schale 1.68-1.77]	5.4 [1.7]
Multiplizität [äußerste Schale 1.68-1.77]	3.2 [3.6]
R _{sym} [äußerste Schale 1.68-1.77]	0.104 [0.429]
Verfeinerung	
Anzahl der Atome	3229
Anzahl der Reflexe*	27472*
R_{cryst}/R_{Free} (%)	19.6/25.2
Standardabweichung von idealen Werten	
Bindungslängen (Å)	0.019
Bindungswinkel (°)	1.500
Temperaturfaktoren	
Alle Atome	21.8
РКА	20.8
ADP	14.2
Mn	15.3
Solvens	30.1
Ramachandran Plot	
Bevorzugte Bereiche	93,1 %
Zusätzlich erlaubte Bereiche	6,9 %

Tabelle 4.17. Datensammlung und Verfeinerungsstatistik

* aufgrund von Eisringen wurden die Reflexe im Auflösungsbereich von

1,90-1,92, 2,22-2,28 und 2,64-2,70 Å bei der Verfeinerung entfernt

4.5.1 Nucleotid-Bindung

Der PKA-MnADP Komplex hat eine große Ähnlichkeit mit 1CDK und 1L3R.

Der Adeninteil bildet drei Wasserstoffbrücken zum Enzym: von N1 zu Val123(N), von N6 zu Glu121(O) und von N7 zu Thr183(OG1). Alle drei H-Brücken haben in etwa die gleiche Länge wie in den MnAMP-PNP und MgADP-AlF₃ Komplexen. Ähnliche Längen haben auch die Wasserstoffbrücken der Hydroxylgruppen der Ribose zwischen 2'OH und Glu127(OE2) und zwischen 3'OH und Glu170(O). Das konservierte Lys72 bildet H-Brücken zu je einem Sauerstoffatom am α - und β -Phosphat (O1A, O3B) sowie die Salzbrücke zu Glu91.



Abb. 4.38 Stereodarstellung der Bindung von MnADP an PKA. Die Wasserstoffbrücken zwischen PKA und ADP sowie die Koordination der Mn-Ionen sind als gestrichelte Linien dargestellt.

4.5.2 Bindung/Koordination von Mn

In der Struktur sind zwei Mn-Ionen zu sehen. Mn1 koordiniert je ein Sauerstoffatom der α und β - Phosphatgruppe (O2A und O1B) auf der Lys72 abgewandten Seite, zwei Wassermoleküle, Gln171(OD1) und Asp184(OD2). Es liegt eine oktaedrische Anordnung mit Abständen zwischen 2,1 und 2,3Å zum Mangan und Winkel nahe bei 90° vor. Mn2 koordiniert das gleiche Sauerstoffatom (O3B) wie Lys72, drei Wassermoleküle und beide Carboxylatsauerstoffe von Asp184 (OD1 und OD2). Da der Winkel zu den Carboxylatsauerstoffatomen nicht 90° sondern 56° beträgt, wird die oktaedrische Anordnung wird leicht gestört. Die Abstände der Liganden von Mn²⁺ liegen im Bereich von 2,1 bis 2,3 Å (Abb. 4.38).

In 1CDK und 1ATP hat Mn1 nur 5 Bindungspartner, also eine trigonal-bipyramidale Anordnung. Die Liganden sind ein Sauerstoff des α und γ -Phosphats, ein Wasser, Asp184 (OD1) und Asn171 (OD1). Mg1 in der Struktur 1L3R, die ein Übergangszustandsanalogon darstellt, hat sechs Bindungspartner genauso wie PKA-MnADP, die allerdings geometrisch etwas ungleichmäßiger angeordnet sind. Es scheint also bei der Katalyse einen Übergang von einer trigonal-bipyramidalen zu einer oktaedrischen Anordnung der Liganden des Mn stattzufinden.

In der Struktur 1CDK koordiniert Mn2 nur zwei Wassermoleküle, dafür aber noch ein Sauerstoff des γ -Phosphats. In der PKA-ADP-Struktur liegen zwei Wassermoleküle in der Position der Saustoffatome des γ -Phosphats (O1G und O2G). Das eine (in der Position O1G) wird von Mn2 koordiniert, das andere von der Seitenkette von Asn171 und Lys168. Die Position des dritten Sauerstoffs (mit einer H-Brücke zu Ser53 (N)) ist nicht belegt.

4.5.3 Glycinloop

Im Vergleich zu 1CDK sind einige Konformationsänderungen am Protein zu sehen. Der Glycinloop ist flexibel, von Gly52 bis Gly55 können zwei Konformationen vorkommen (Abb. 4.37). Die tiefer liegende, geschlossene Konformation verläuft noch etwas tiefer als bei 1CDK und 1L3R, so dass die Amid-NH-Gruppe von Phe54 und Gly55 zu einem Sauerstoff des β -Phosphats (O2B) in Kontakt steht. Die höher liegende, offene Konformation zeigt keine Wechselwirkungen mit den Phosphatgruppen. Der Kontakt von Ser53(OG1) zum γ -Phosphat (beziehungsweise Fluor) und die H-Brücke von Thr51 zu Arg18 des Peptids fehlen im PKA-MnADP Komplex. Beides kann eine Flexibilität und offene Konformation des Glycinloops begünstigen.

4.5.4 Katalytischer Loop und Peptidbindestelle

Lys168 und Asp166 zeigen veränderte Konformationen im Vergleich zu 1CDK und 1L3R (Abb. 4.39). In 1CDK (und ähnlich auch in 1L3R) bildet die Seitenkette von Lys168 H-Brücken zum γ -Phosphat, Thr201(OG1) und dem Carbonylsauerstoff von Arg17 des Peptids. Thr201 steht in Kontakt mit Asp166. Im PKA-MnADP-Komplex ändern sich die Positionen aller drei erwähnten Aminosäuren um ca. 1-1,5 Å, wobei sich von Thr201 bis Glu203 gleichzeitig die Hauptkette verschiebt. Dies geschieht vermutlich, da das γ -Phosphat und Peptid fehlen. Auch Aminosäuren an der Peptidbindestelle Pro243, Ile246 und Tyr247 sowie die Helix G verändern ihre Lage. Diese Verschiebung in den Bereichen 201 bis 203 und 243 bis 247 sind in ähnlicher Weise bei der Struktur von PKA (Apoenzym) (1JH3) zu sehen.



Abb. 4.39 Veränderungen in der Lage von Asp166, Lys168, Thr201 und Glu203 im Vergleich zwischen PKA-MnADP (orange) und PKA-MnAMP-PNP-PKI (1CDK) (grau) bzw. PKA-ADP-AlF₃-SP20 (1L3R) (grün).

4.5.5 C-Terminus

Der C-Terminus ist im Komplex mit MnADP in zwei Bereichen (318-324 und 328-336) flexibel und teilweise ungeordnet mit Lücken in der Elektronendichte. Dies kann durch die Flexibilität des Glycinloops, der in Kontakt mit dem C-Terminus steht, übertragen oder auch durch das Fehlen des Peptids (Kontakt zwischen R18 des Peptids und Y330 von PKA) verstärkt werden.

4.5.6 Synergistische Bindung von PKI und ATP

Eine Synergie bei der Bindung von PKI und ATP ist bekannt [17, 34]. Eine Analyse der Strukturen kann dies erklären, denn Veränderungen von PKA bei der Bindung von ATP und Peptid betreffen zum Teil die gleichen Aminosäuren (z. B. Ser53, Tyr330, Lys168). Auch bestehen direkte Kontakte zwischen Peptid und ATP (Arg18 – 2'OH). Der Glycinloop wird durch die gleichzeitige Bindung von ATP und Peptid von zwei unterschiedlichen Seiten fixiert.

4.5.7 Katalytischer Zyklus

Die Struktur des PKA-MnADP-Komplexes stellt den letzten Schritt im katalytischen Zyklus dar, nachdem das Phosphopeptid bereits freigesetzt wurde und bevor das freie Apoenzym zurück gewonnen wird. Die Metallatome sind zu diesem Zeitpunkt noch an ihrem Platz. Mn1 ist sogar oktaedrisch mit sechs Bindungspartnern koordiniert. Die Kontakte zum Glycinloop sind geschwächt und machen ihn flexibel. Zusätzlich sind Veränderungen im Bereich der Peptidbindestelle zu sehen.

Da der Phosphattransfer und Produktfreisetzung sehr schnelle Schritte sind, sind auch keine großen strukturellen Änderungen zu erwarten. Die Freisetzung von ADP ist der langsamste und damit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt [230, 231]. Die Bindungskonstante von MnADP beträgt 8 μ M (kalorimetrisch bestimmt mit ITC). Eine Doppelbestimmung mit unterschiedlichen Protein/Ligandkonzentrationen wurde durchgeführt.

4.6 ³¹P-NMR-Untersuchungen zur Flexibilität der Phosphatgruppen

Da die Phosphorylierung eine entscheidende Bedeutung für die Aktivität von Proteinkinasen hat und auch bei der Kristallisation eine große Rolle spielen kann, wurden die Phosphorylierungsstellen von rekombinant hergestellter PKA untersucht. Die Phosphorylierungsstellen von PKA sind Thr197 und Ser338 bei 2P-PKA, zusätzlich Ser10 bei 3P-PKA und Ser10 und Ser139 bei 4P-PKA (Abschnitt 2.2.2.2).

4.6.1 Signalzuordnung

Die ³¹P-NMR Spektren von 2-, 3- und 4-fach-phosphoryliertem Protein bei pH 8,5 zeigen jeweils drei Signale (1,85 ppm, 1,48 ppm und 0,60 ppm) (Abb. 4.40). Die integrierten Peaks stehen im Verhältnis 1:0,5:1 bei 2P-PKA, 1:0,9:0,9 bei 3P-PKA, 1:1,9:2,6 bei 4P-PKA. Die Reinheit wurde mit Massenspektroskopie untersucht und zeigte bei 3- und 4-fach phosphoryliertem Protein jeweils nur kleine Mengen der höher phosphorylierten Form, bei 2-fach phosphoryliertem Protein deutliche Mengen der 3-fach phosphorylierten Formen. Die schmalste Resonanz ist bei 1,48 ppm. Dieser Peak ist bei der 2-fach phosphorylierten Probe deutlich reduziert. Dies scheint von höher phosphorylierten Formen zu stammen. Der Peak kann somit Ser10 zugeordnet werden. Die 4-fach phosphorylierte Probe zeigt eine deutlich stärkere Resonanz bei 0,6 ppm, was von einer Signalüberlappung herrührt.



Abb. 4.40 ³¹P-NMR Spektren von unterschiedlich phosphorylierter PKA bei pH 8,5. Alle drei PKA-Formen zeigen drei Peaks. Die integrierten Peaks stehen im Verhältnis 1:0,5:1 bei 2P-PKA, 1:0,9:0,9 bei 3P-PKA, 1:1,9:2,6 bei 4P-PKA.

Diese Signale konnten durch ein Veränderung des pH-Werts von pH 8,5 auf pH 6,9 getrennt werden (Abb. 4.41). Die vier Resonanzen liegen bei 1,77 ppm, 1,07 ppm, 0,66 ppm und 0,03 ppm und können Thr197, Ser10, Ser338 und Ser139 zugeordnet werden. Der schmalste Peak konnte Ser10 bereits zugeordnet werden. Deutlich unterschiedlich ist die chemische Verschiebung von 1,48 und 1,07 ppm bei Ser10 und von 0,60 und -0,03 ppm bei Ser139 in Abhängigkeit des pH-Werts. Aufgrund der pH-Sensitivität kann man von Lösungsmittel exponierten Aminosäuren ausgehen. pThr197 und pSer338 sind über Wasserstoffbrücken mit den benachbarten Resten eng verbunden. Die pH-sensible Resonanz wird damit Ser139 zugeordnet. Da das Phosphothreonin sich chemisch von Phosphoserin unterscheidet, kann die Resonanz bei 1,77 ppm Thr197 zugeordnet werden, die Resonanz bei 0,6 ppm Ser338.



Abb. 4.41 ³¹P-NMR Spektrum von 4-fach phosphorylierter PKA bei pH 6,9. Die integrierten Peaks stehen im Verhältnis 1,0:1,0:0,9:0,8. Das Spektrum bei pH 6,9 von 4-fach phosphorylierter PKA in Abb. 4.3 zeigt auch das Assignment und die gefitteten Peaks zur Bestimmung der Linienbreite.

4.6.2 ³¹P-Relaxation zur Bestimmung der Flexibilität

Im vorliegenden Fall korreliert die Linienbreite Δv mit der Korrelationszeit τ_c und kann als Maß für die Flexibilität der Phosphatgruppen dienen [60]. Die Korrelationszeiten konnten dadurch wie folgt bestimmt werden: Thr197 ist mit 45 bis 90 ns größer als die Gesamtkorrelationszeit des Proteins, was auf einen Austauschprozess schließen lässt. Ser139 und Ser338 sind relativ starr an das Protein gebunden, die Korrelationszeit von 25 bis 50 ns entspricht dem Gesamtmolekül. Ser10 zeigt die kürzeste Korrelationszeit mit 7 bis 14 ns, die auch wesentlich kürzer als die des Proteins ist. Dies deutet auf eine hohe Flexibilität hin.

Signal	Chemische	Linienbreite	Relaxationszeit	CSA Tensor	CSA Tensor
	Verschiebung [ppm]	[Hz]	T ₂ [ms]	(AMP) τ _c [ns]	(HPA2) τ_c [ns]
Thr197	1.77	56.7 ± 2.6	5.6 ± 0.2	45	90
Ser10	1.07	8.71 ± 0.36	37 ± 1	6.9	14
Ser338	0.66	32.0 ± 1.4	9.9 ± 0.4	25	51
Ser139	-0.03	32.2 ± 1.6	9.9 ± 0.4	25	51

Tabelle 4.18 Gemessene chemische Verschiebung, Linienbreite, Relaxationszeit T_2 und berechnete Korrelationszeiten (AMP oder HPA2 wurden als Modelle für den CSA Tensor benutzt) für PKA bei 300 K und pH 6,9.

4.6.3 Wechselwirkungen mit AMP-PNP

Die Zugabe des ATP-Derivats AMP-PNP zu 3-fach phosphorylierter PKA zeigt drei neue Resonanzen bei -3,4 ppm, -7,9 ppm und -12,6 ppm (Abb. 4.42 A). Sie zeigen die gleiche chemische Verschiebung wie freies AMP-PNP in Lösung (Abb. 4.42 B), zeigen allerdings eine breitere Liniebreite. Außerdem wird auch die Linienbreite von Thr197 vergrößert. Dies deutet daraufhin, dass durch die Bindung von ATP die ohnehin geringe Flexibilität von Thr197 noch weiter vermindert wird.



Abb. 4.42 ³¹P-NMR Spektrum von 3-fach phosphorylierter PKA bei pH 6,9 mit AMP-PNP.

4.7 Besonderheiten in der Struktur

4.7.1 Der N-Terminus von PKA – Die Struktur einer verlängerten Helix A

Der N-Terminus von PKA liegt außerhalb der konservierten katalytischen Domäne und wurde im Abschnitt 2.2.2.3 beschrieben.

Die N-terminale Sequenz enthält mehrere Stellen für posttranslationale Modifikationen: Myristylierung von Gly1, Deamidierung von Asn2 und Phosphorylierung von Ser10 [62]. Das rekombinant in *E. coli* hergestellte Protein ist nicht myristyliert, nicht deamidiert, und zum großen Teil an Ser10 phosphoryliert. Myristylierung steht meist im Zusammenhang mit Membranbindung, aber im Fall von PKA auch mit der Stabilität des Enzyms, denn die Myristylsäure bindet in eine hydrophobe Tasche des *C-lobes* [18]. Nach dieser Sequenz folgt die Helix A (15-32), die typisch für PKA ist und sie von anderen Mitgliedern der AGC-Familie unterscheidet.

Eine verlängerte Helix A ist bisher in zwei Strukturen aufgefallen. In beiden Fällen handelt es sich um die PKAB4-Mutante, die mit unterschiedlichen Inhibitoren kokristallisiert worden war. Dieses Protein war nur 2-fach phosphoryliert. Eine 4-fach phosphorylierte Form dieser Mutante zeigte diese verlängerte Helix A nicht. Das Protein war unter den gleichen Bedingungen kristallisiert worden, zeigt aber eine neue Kristallpackung. Typischerweise sind die ersten 10-15 Aminosäuren ungeordnet und nicht aufgelöst. In dieser Struktur ist zum ersten Mal der komplette N-Terminus zu sehen (Abb. 4.43 und 4.44). Die Helix A ist sehr gut definiert, und beginnt mit der ersten Aminosäure Gly1; nur ein paar Seitenketten sind ungeordnet oder zeigen mehrere Konformationen. Da das Protein in *E. coli* exprimiert wurde, ist Gly1 nicht myristyliert. Das Detergens MEGA-8 liegt dort, wo Myristylsäure sonst bindet. Da sich diese Mutante abgesehen von der fehlenden Phosphorylierung an Ser10 kaum von anderem verwendeten PKA-Protein unterscheidet, hängt dies wahrscheinlich mit dem Auftreten der verlängerten Helix A zusammen.



Abb. 4.43 zeigt die vollständig aufgelöste N-terminale Helix A mit der verfeinerten $2F_0$ - F_c Elektronendichte (konturiert auf 1 σ , blau) und einer *omit* F_0 - F_c Differenzelektronendichte (konturiert auf 2 σ , grün).



Abb. 4.44 Überlagerung von drei Strukturen mit unterschiedlichen Konformationen des N-Terminus: 2-fach phosphorylierte PKAB4 Mutante (rot), 3-fach phosphorylierte PKA (1Q8U) (blau) und 2-fach phosphorylierte und myristylierte PKA (1CMK) (grün).

Rekombinant in *E. coli* hergestelltes Protein ist nicht myristyliert aber mehrfach phosphoryliert. Strukturen mit solchem Protein haben einen ungeordneten N-Terminus. Der geordnete Teil beginnt in verschiedenen Strukturen bei Lys7, pSer10 oder auch erst Val15.

MEGA-8 bei den Kristallansätzen scheint die Helix A zu stabilisieren. Der Octanoylteil ist häufig aufgelöst und bindet an der Stelle, wo Myristylsäure auch bindet. In der Struktur 1Q8U (PKA-PKI-H-1152P) sind die ersten 6 Aminosäuren nicht sichtbar (Abb. 4.44, blau). Der geordnete Teil fängt bei Lys7 an, ist aber strukturell ein *turn*, der in eine andere Richtung zeigt als die Helix A, die selbst bei Ser10 beginnt. Die Phosphatgruppe von Ser10 ist gut geordnet, die sehr hohen B-Faktoren zeigen dennoch eine gewisse Flexibilität an.

Es gibt drei Kristallstrukturen mit myristylierter, 2-fach phosphorylierter PKA aus Säugetiergewebe (1CMK, 1CTP und 1CDK) [*17, 18*]. Die Myristylsäure bindet in eine hydrophobe Tasche im *C-lobe*, die von den Resten der Helix A (Val15, Phe18, Leu19), Phe100, Helix E (Leu152, Glu155, Tyr156) und Helix J (Asp301, Ile303, Tyr306) gebildet wird. Die Helix A beginnt bei Ala6, die ersten Aminosäuren sind ungeordnet, bei 1CMK allerdings dennoch in den Koordinaten enthalten (Abb. 4.44, grün).

Diese Struktur unterscheidet sich von den typischen nicht myristylierten *E. coli* Strukturen in 4 Punkten: 1. Es handelt sich bei der PKAB4-Mutante um eine 4-fache Mutante von PKA.

2. Das Protein ist nur 2-fach phosphoryliert an Thr197 und Ser338, es fehlt also die typische Ser10 Phosphorylierungsstelle. 3. Es liegt eine neue Kristallpackung vor. 4. Der N-Terminus ist komplett geordnet, die Helix A ist verlängert.

Was ist nun Ursache und Folge? Bei der Mutante handelt es sich um die PKAB4-Mutante, die alle 4 Mutationen in der ATP-Bindetasche hat, um PKA PKB-ähnlicher zu machen, nämlich Gln84Glu, Val123Ala, Leu173Met und Phe187Leu. Der K_M-Wert für ATP liegt bei dieser Mutante 12-mal niedriger als bei PKA (siehe Tabelle 4.19). Dies ist auch schon für die PKAB2 Mutante (Val123Ala, Leu173Met) beschrieben, wo die Kombination dieser Austausche ein Umklappen von Gln181 in die ATP-Tasche bewirkt. Gln181 muss bei der Bindung von Liganden heraus geklappt werden, was zusätzliche Energie erfordert. Die Einführung einer weiteren Mutation (Gln181Lys) kann diesen Defekt aber wieder beheben [*223*]. Die Expression von PKAB4 ist reduziert und das Ausmaß der Autophosphorylierung geringer. Dadurch wurde auch 2-fach phosphoryliertes Protein zur Kristallisation verwendet, was durch Massenspektroskopie bestätigt wurde. In der Kristallstruktur sieht man eindeutig, dass Ser338 und Thr197 phosphoryliert sind, nicht aber Ser10 und Ser139.

Tabelle 4.19. K_M -Werte für PKA und PKAB-Mutanten [223].

	РКА	PKAB2	PKAB3	PKAB4
K _M ATP [µM]	12	128	30,6	141

Die Kristalle haben eine neue Packung mit neuen Zellkonstanten in der Raumgruppe P2₁2₁2₁. Es gibt einige Kontakte von N-terminalen Aminosäuren (Gly1, Asn2, Ala3, Ala4, Ala6 und Lys7) zu symmetrieäquivalenten Molekülen, genauer zu Teilen der Helix E1 (Ile210, Leu211, Ser212) und Helix G (Ile244, Tyr247, Glu248, Val251).

Die Mutationen sind alle in der ATP-Bindetasche, weit entfernt vom N-Terminus, und verursachen keine signifikanten strukturellen Änderungen (Abschnitt 4.3.5.1). Sie verändern auch nicht die Kristallpackung, da auch 3- oder 4-fach phosphorylierte PKAB-Mutanten in der bekannten Packung kristallisieren.

Vielmehr ist es so, dass die Phosphorylierung an Ser10 Unordnung induzieren kann (wie auch Peptidexperimente gezeigt haben [62]). Fehlt die Phosphorylierung an Ser10, ist die Helix A verlängert. Zusätzlich kann auch die Myristylsäure die lange Helix A verhindern, denn nur so kann sie in die hydrophobe Tasche binden.

Die Beobachtung dieser Helix Konformation legt nahe, dass der N-Terminus zwischen verschiedenen Zuständen "umschaltbar" ist. In einem Zustand ist der N-Terminus über die Myristylsäure in die hydrophobe Tasche am Enzym gebunden, in einem anderen wird die Myristylsäure durch eine verlängerte Helix A exponiert. Dazwischen können andere ungeordnete Zustände existieren, eventuell durch eine intermediäre Phosphorylierung.



Membranbindung

Abb. 4.45 Schematische Darstellung verschiedener Zustände und Konformationen der Helix A. Typischerweise bindet die Myristylierung in eine hydrophobe Tasche des *C-lobes*, was die Stabilität des Enzyms erhöht. Die Struktur zeigt, dass auch der N-Terminus auch in der Konformation einer verlängerten Helix A vorliegen kann. In einer solchen Konformation würde die Myristylsäure exponiert. Eine Bindung an Membranen ist in dieser Konformation gut vorstellbar, zumal alle Charakteristika (Myristylierungsstelle und basische Aminosäuren für die Bindung sowie eine Phosphorylierungsstelle für die Ablösung) in der N-terminalen Sequenz enthalten sind.

4.7.2 Besondere Dimere – Eingehakte Moleküle

Die unter 4.4 beschriebenen Bisindolylmaleimid-Inhibitoren wurden mit PKA und unterschiedlichen PKAB-Mutanten kokristallisiert und zeigen überwiegend eine kubische Raumgruppe (P4₁32). Das Protein liegt in einer offenen Konformation vor und zeigt eine besondere Paarbildung: jeweils zwei Moleküle sind eingehakt.

4.7.2.1 Strukturlösung

Die Strukturlösung erfolgte mit Molecular Replacement mit dem Programm AMoRe. Bei PKAB5-BIM1 wurde eine Struktur geschlossene Konformation als Suchmodell gewählt. Der R-Faktor lag bei 46 % (Daten bis 3,0 Å). Fünf Rigid body Gruppen wurden definiert (PKA: 10-34, 35-123, 124-310, 325-350; PKI: 5-24) und mit Daten bis 3,0 Å verfeinert. Der R_{crvst} fiel auf 38 % (R_{Free} 40 %). Die erste Elektronendichte zeigte zwischen etwa 310 und 330 einen anderen Verlauf als das Suchmodell. Deshalb wurde der komplette C-Terminus ab 310 gelöscht. Ein restrained refinement mit allen Daten (bis 2,5 Å) senkte den R-Faktor auf 33 % (R_{Free} 36%). Die dann berechnete Elektronendichte zeigte deutlich alle Teile des C-Terminus (bis auf Aminosäuren 317 und 318) sowie den Inhibitor und die Mutation in der Bindetasche. In iterativen Zyklen aus Modellieren und Verfeinern wurden alle Mutationen, fehlenden Aminosäuren (bis auf 317-320) und Wassermoleküle eingebaut, Seitenkettenkonformationen verändert und schließlich der Inhibitor und die letzten fehlenden vier Aminosäuren eingesetzt. Der R-Faktor lag zuletzt bei 20,7 %, RFree bei 25,0 %. Die Struktur PKAB3-BIM2 wurde mit Molecular Replacement mit 1STC (PKA-PKI-Staurosporin) [25] als Suchmodell gelöst und lieferte nach rigid body refinement die gleich Konformation wie PKAB5-BIM1. In den anderen Fällen wurde die verfeinerte Struktur PKAB5-BIM1 als Modell für alle weiteren Strukturen in dieser Raumgruppe benutzt (Tabelle 4.16).



Abb. 4.46 Vier solcher Trimere von Dimeren bauen die Elementarzelle auf. Die zwei- und dreizählige Symmetrieachse sind gut zu erkennen. Jeweils zwei Moleküle sind eingehakt. Die C-Termini sind im linken Stereobild hervorgehoben, die Knotenpunkte sind dadurch besser zu sehen.

4.7.2.2 Eingehakte Moleküle

Mehrere Strukturen von PKA und PKAB-Mutanten mit PKI und verschiedenen Bisindolylmaleimiden kristallisierten in der kubischen Raumgruppe P4₁32 (a=b=c=170 Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^{\circ}$) mit einem Molekül in der asymmetrischen Einheit. Das entspricht einem Solvensgehalt von 70 %. Ein Ausschnitt aus der Elementarzelle ist in Abb. 4.46 dargestellt. Der C-Terminus verläuft anders als in den bisher bekannten Strukturen. Je zwei C-Termini sind eingehakt, es liegen Dimere vor. Im Kristall mit der besten Auflösung (PKAB5-BIM4) ist die Elektronendichte lückenlos durchgängig im ganzen Bereich des C-Terminus. Sie zeigt eindeutig das Einhaken der Moleküle (Abb. 4.47). Die C-Termini lösen sich weiter von der Kinasedomäne, stehen mit dem Nachbarmolekül im Bereich der *Hinge Region* in Kontakt, sind dabei eingehakt und binden dann wieder an den eigenen *N-lobe*.

Der C-Terminus entfernt sich ab Pro316 vom *C-lobe*. Ab Pro321 bestehen Kontakte zum Symmetrieäquivalent. Asn326 bildet zwei Wasserstoffbrücken zum Symmetrieäquivalent, die eine direkt zu Lys49, die andere indirekt über ein Wassermolekül zum Inhibitor. Auch Asp323 und Phe327 haben Kontakte zum Symmetrieäquivalent in der Nähe der *Hinge Region*. Tyr330 steht über ein Wassermolekül in Wechselwirkung mit dem symmetrieäquivalenten Tyr330. Ab Aminosäure Glu332 bestehen wieder Kontakte zum eigenen *N-lobe*. Der weitere Verlauf des C-Terminus entspricht dem aller anderen PKA-Strukturen.



Abb. 4.47 Die Kristallstruktur von PKAB5-BIM4 bei 2,3 Å zeigt zwei eingehakte PKA-Moleküle. A Die C-Termini lösen sich weiter von der Kinasedomäne, stehen in Kontakt mit dem Nachbarmolekül im Bereich der *Hinge Region*, sind dabei eingehakt und binden dann wieder an den eigenen *N-lobe*. B Eine *simulated-annealed omit map* konturiert auf 2,0 σ zeigt eine lückenlos durchgängige Dichte im ganzen Bereich, in dem das Einhaken stattfindet. C Ein vergrößerter Ausschnitt zeigt die Wechselwirkungen im Detail: Asn326 des Symmetrieäquivalents (magenta, *) macht eine Wasserstoffbrücke direkt zu Lys49 und indirekt über ein Wassermolekül zum Inhibitor. Auch Asp323 und Phe327 des Symmetrieäquivalents haben Kontakte in der Nähe der *Hinge Region*.

4.7.2.3 Diskussion

Die Überkreuzungsstellen liegen im Bereich des C-Terminus, der in eine fast lückenlose Dichte (Struktur PKAB5-BIM1) neu modelliert wurde. Die Struktur mit der höchsten Auflösung zeigt in diesem Bereich eine komplett durchgehende Dichte. Wie im Abschnitt 2.2.2.3 beschrieben ist der C-Terminus ein Segment von 50 Aminosäuren, das außerhalb der katalytischen Domäne liegt, aber bei vielen AGC-Kinasen vorkommt. Die letzten vier Aminosäuren bei PKA bilden das hydrophobe Motiv (HM), das in eine hydrophobe Tasche des *N-lobes* bindet. Alle PKA-Strukturen zeigen diese Bindung, in Übereinstimmung mit der konstitutiven Aktivität der freien katalytischen Untereinheit. Bei anderen Kinasen der AGC-Familie folgt auf FXXF eine Phosphorylierungsstelle, die essentiell für eine Bindung und Aktivität der Kinase ist. Eine Bindung und Lösung des hydrophoben Motivs in und aus der Tasche ist beschrieben. Diese Dynamik kann man auch für PKA indirekt in diesen Kristallstrukturen sehen, da zum Einhaken der Moleküle ein Loslösen des HM aus der hydrophoben Tasche, ein Überkreuzen und wieder erneutes Binden des HM in die Tasche stattgefunden haben muss.

In der Proteindatenbank (PDB) gibt es bereits zwei Strukturen mit dieser Raumgruppe. Es sind 1CTP und 1CMK mit einer Auflösung von jeweils 2,9 Å und ohne Verfeinerung der B-Faktoren [18]. 1CMK ist myristyliert und zweifach phosphoryliert. Es enthält Koordinaten für alle Aminosäuren. Der Bereich zwischen 317 und 327 liegt eng am Enzym an, der des benachbarten Symmtrieäquivalents läuft nahe vorbei. Bei 1CTP ist dieser Bereich nicht aufgelöst. Aber auch die meisten geschlossenen Strukturen zeigen einen schlecht geordneten Bereich um Phe318 und von 331 bis 336, sowie höhere B-Faktoren in diesem Bereich. Man vermutet, dass diese Flexibilität notwendig ist, um ATP den Zugang zur Bindetasche zu ermöglichen [31]. In der PKAB5-BIM4 Struktur ist die Dichte durchgehend und eindeutig definiert (Abb. 4.36 B). In den drei anderen, schlechter aufgelösten Strukturen (PKA-BIM3 und PKAB5-BIM1) ist keine durchgehende Elektronendichte im Bereich 317 bis 319 zu sehen. Das mag auch daran liegen, dass an dieser Stelle die zweizählige Symmetrieachse verläuft. Dennoch lässt der Kettenverlauf mit einer Lücke von nur maximal vier Aminosäuren keine andere Möglichkeit, als zu verknoten oder aber in die hydrophobe Tasche des Nachbarmoleküls zu binden (in Abb. 4.48 mit Pfeilen markiert). Zumindest eine gut aufgelöste Struktur zeigt eindeutig das Einhaken.


Abb. 4.48 Ein Molekül mit dem eingehakten Symmetrieäquivalent. Die Oberfläche der konservierten katalytischen Domäne (43-310) ist dargestellt. Die N-terminale Helix A, PKI(5-24) und der C-Terminus sind in der *Ribbon*-Darstellung. Zwischen den Pfeilen sind bei schlechter aufgelösten Strukturen Löcher in der Elektronendichte zu sehen.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION - SRC

5.1 Kristallisation und Datensammlung

5.1.1 Unterschiedliche Proteinkonstrukte

Gereinigte Src Kinasedomäne (257-535) wurde von Dr. H. Koll und E. Schwalb (Roche Diagnostics, Penzberg) bereitgestellt. Das Protein wurde mit einem rekombinanten Baculovirus-Expressions-System in Sf9-Insektenzellen hergestellt. Das Protein entspricht der Maussequenz, die sich allerdings nur an zwei Stellen von der humanen Sequenz in diesem Bereich unterscheidet: Asn342Ser und Ser367Ala (Maus-Mensch-Austausche). Das Protein war nach der Reinigung hauptsächlich monophosphoryliert (ca. 85%) mit geringen Anteilen nicht phosphorylierten und 2-fach phosphorylierten Formen. Deshalb wurden außer dem Wildtypprotein auch verschiedene Mutanten verwendet, bei denen Tyr418 des Aktivierungsloops zu Trp, Ala oder Glu ausgetauscht war. In diesem Fall lag zum größten Teil nicht phosphoryliertes Protein vor. Alle Proben wurden massenspektroskopisch untersucht. Die Aktivität der Mutanten entspricht im Wesentlichen dem Wildtyp und *full-length* Protein.

Spätere Proteinchargen wurden in *E. coli* exprimiert, rückgefaltet und gereinigt. Dieses Protein wurde von Dr. P. Rüger und H. Hertenberger (Roche Diagnostics, Penzberg) zur Verfügung gestellt.

5.1.2 Kristallisation und Datensammlung

Das Protein aus dem Baculovirus-Expression-System wurde vor der Kristallisation gegen einen Puffer aus 20 mM Hepes, 100 mM NaCl, 2 mM DTT pH 7,5 über Nacht dialysiert und ankonzentriert. Das Protein wurde als *sitting* oder seltener als *hanging drops* kristallisiert, sowohl bei 20 °C als auch bei 4 °C. Verschiedene PEG- und Ethylenglycol-Bedingungen wurden mit diversen Screens gefunden. Die Kristalle wuchsen entweder als Stäbchen oder extrem dünne Platten nach *Seeding* innerhalb von 7-20 Tagen zu maximaler Dicke (Abb. 5.1). Die Optimierung der Bedingungen führte zu Kristallen in der Raumgruppe P1 (20 % Ethylenglycol) oder in der Raumgruppe P2₁ (30 % PEG-4000, 0,2 M Natriumacetat, 0,1 M TrisHCl pH 8,5). Unterschiedliche Proteinchargen zeigten ein stark unterschiedliches Kristallisationsverhalten. Protein aus *E. coli* liefert Kristalle in der Raumgruppe P1, allerdings mit unterschiedlichen Zellkonstanten, aus unter Bedingungen von 25 % PEG3350, 0,1 M Hepes pH 7,5. Die Kristalle wurden mit einem Loop geerntet und nach kurzem Eintauchen in 30 % Ethylenglykol direkt im Stickstoffstrom gefroren. Sie wurden am Synchrotron DESY (Hamburg) oder SLS (Villigen) gemessen.



Abb. 5.1 Dünne Kristallplatten wachsen innerhalb von wenigen Wochen zu maximaler Dicke.

5.2 Strukturlösung und Verfeinerung

5.2.1 Unterschiedliche Kristallformen

Insgesamt wurden drei verschiedene Kristallpackungen beobachtet. Die Kristalle der Raumgruppe P1 (a=42, b=63, c=74, α =100, β =91, γ =90) haben mit denen der Raumgruppe P2₁ (a=42, b=63, c=124, β =90) zwei Zellkonstanten gemeinsam. Sie enthalten beide zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheit. Sie zeigen das gleiche Dimer und in einer Ebene die gleiche Packung. Die dritte Raumgruppe ist ebenfalls P1 allerdings mit vier Molekülen in der asymmetrischen Einheit und einer neuen Packung (a=64,5, b=72,6 c=82,4, α =91,8 β =106, γ =105).

Kristallform	1	2	3	
Raumgruppe	P1	P2 ₁	P1	
Moleküle/asym. Einheit	2	2	4	
Matthews Koeffizient	2,7	2,5	2,7	
Solvensgehalt	57 %	51 %	54 %	
Zellkonstanten	a=42, b=63, c=74 α=100°, β=91°, γ=90°	a=42, b=124, c=64 α=90°, β=90°, γ=90°	a=64, b=73, c=83 α=92, β=106, γ=105	
Kristallisations- bedingungen	20 % Ethylenglycol	0,1 M TrisHCl pH 8,0 0,2 M NaAcetat 30 % PEG4000	0,1 M HEPES pH 7,5 25 % PEG3350	

 Tabelle 5.1
 Übersicht über die verschiedenen Kristallformen

5.2.2 Strukturlösung mit Molecular Replacement

Molecular Replacement wurde mit einer Reihe von Suchmodellen aus der Proteindatenbank (PDB) durchgeführt, unter anderem mit (inaktiven) Src und (aktiven) Lck Strukturen, unter Verwendung der CCP4 Programme MolRep und AMoRe. Die beste Lösung ergab ein Hybrid aus Lck (N-terminal) (3LCK, [114]) und Src (C-terminal) (1FMK, [109]). Die erste Struktur wurde in der Raumgruppe P1 mit zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit gelöst.

5.2.3 Verfeinerung

Ausgehend von einem R-Faktor von 41 % nach dem *Molecular Replacement* ergab sich ein R-Faktor von 34 % nach einer *rigid body* Verfeinerung mit Definition des *N-lobes* und des *C-lobes* beider Moleküle als jeweils unterschiedliche *rigid body* Gruppen. Weitere Verfeinerungsschritte (mit dem Programm Refmac) alternierend mit Strukturmodellieren (Moloc), dem Einbau von Wassermolekülen und des Inhibitors verbesserten schrittweise das Modell und ergaben zuletzt einen R-Faktor von 21 %. Dieses verfeinerte Modell wurde als Suchmodell für weitere Strukturen benutzt.

5.2.4 Kristallpackung

5.2.4.1 Das Dimer in P1

Es wurden Strukturen in drei verschiedenen Kristallformen gelöst (Tabelle 5.1). Am häufigsten war die Raumgruppe P1 mit zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit. Diese Kristalle entstanden in Kristallansätzen mit 20 % Ethylenglycol als Präzipitans. Die beiden Moleküle des Dimers sind nicht identisch, sondern unterscheiden sich vor allem in der Öffnung der Kinasedomäne, die durch eine Rotation vom *N-lobe* relativ zum *C-lobe* hervorgerufen wird (siehe auch Abb. 5.8). Die Flexibilität der Kinasedomäne ist nicht ungewöhnlich (Abschnitt 2.1.1). Von PKA gibt es sehr viele unterschiedlich weit geöffnete und geschlossene Strukturen [5].



Abb. 5.2 Die Abbildung zeigt das Dimer in P1 (a=42, b=63, c=74, α =100°, β =91°, γ =90°) mit symmetrieäquivalenten Molekülen (Molekül A: *C-lobe*: orange, *N-lobe*: rot, Inhibitor: gelb; Molekül B: *C-lobe*: cyan, *N-lobe*: blau, Inhibitor: grün). Eine Aufsicht auf die Ebene BC der Einheitszelle zeigt im Bereich der *C-lobes* sehr dichte Kontakte, während zwischen den *N-lobes* kaum Kontakte bestehen.



Abb. 5.3 Die Aufsicht auf die Ebene AB zeigt nochmals die dichte Packung, während die Aufsicht auf die Ebene AC wiederum die schwachen Kontakte entlang der Achse C veranschaulicht.

Abbildungen 5.2 und 5.3 zeigen die Kristallpackung von verschiedenen Seiten. Die Moleküle A und B sowie *C*- und *N*-*lobe* sind unterschiedlich gefärbt. Die Moleküle packen in der Ebene, in der die *C*-*lobes* liegen (entlang a und b), sehr dicht (Abb. 5.2). Zwischen den *N*-*lobes* (entlang c) bestehen kaum Kontakte (Abb. 5.2 und Abb. 5.3). Diese Eigenschaft spiegelt sich in den dünnen Kristallplatten wieder. Die Ebene mit den vielen Kristallkontakten wächst besonders schnell, während in der dritten Raumrichtung kaum Wachstum stattfindet.

5.2.4.2 Das Dimer in $P2_1$

Die Raumgruppe P2₁ wurde mit Kristallen aus PEG-Bedingungen gefunden. Sie enthält zwar auch das gleiche Dimer wie in P1, insgesamt aber 4 Moleküle in der Einheitszelle. Das zweite Dimer entsteht gemäß der Symmetrie in P2₁ durch eine zweifache Schraubenachse senkrecht zur NCS-Achse (Abb. 5.4). In einer Ebene (43 und 63) ist die Packung gleich, in Richtung der dritten Raumrichtung allerdings unterschiedlich.



Abb. 5.4 Schematische Darstellung der Kristallpackungen in der triklinen (P1) und monoklinen (P2₁) Raumgruppe mit je 2 Molekülen (A und B) in der asymmetrischen Einheit. Die Achse a mit ca. 42 Å steht in beiden Fällen senkrecht auf der Papierebene. Das Dimer ist in beiden Raumgruppen vorhanden. Die Ebenen, die von den Achsen 42 und 63 aufgespannt werden, sind identisch.

5.2.4.3 Vier Moleküle in P1

Die dritte Kristallform unterscheidet sich von den ersten beiden, da sie dieses Dimer nicht enthält. Die Raumgruppe ist P1 mit vier Molekülen in der asymmetrischen Einheit, die Zellkonstanten sind a=64,5, b=72,6, c=82,4, α =91,8, β =106, γ =105. Bei dem zur Kristallisation verwendeten Protein handelte es sich um rekombinant in *E. coli* hergestelltes, renaturiertes Protein. Die Kristalle stammen aus Bedingungen mit 0,1M Hepes pH 7,5 und 25 % PEG3350.



Abb. 5.5 Darstellung der Kristallpackung in der triklinen Raumgruppe (P1) mit 4 Molekülen in der asymmetrischen Einheit. Die *N-lobes* sind rot, die *C-lobes* gelb gefärbt. Der Aktivierungsloop ist bei zwei von den vier Molekülen aufgelöst (orange).

5.3 Strukturen der Kinasedomäne von Src

Zur Kristallisation wurde ausschließlich aktives Protein (Wildtyp oder Mutanten) verwendet. Die Aktivität des Proteins wurde mit kinetischen Untersuchungen bestätigt. Das Protein wurde mit verschiedenen Inhibitoren kokristallisiert. Eine Übersicht über die gelösten Strukturen gibt Tabelle 5.2.

Im Folgenden wird die Proteinstruktur beschrieben, anschließend die Inhibitorbindung analysiert.

Tabelle 5.2 Übersicht über die gelösten Src-Kinasedomäne-Inhibitor-Komplexe mit Datensammlung- und Verfeinerungsstatistik

Inhibitor	S01	S01	CGP77675	Purvalanol A	ohne Ligand (AMPPCP)	S05		
Protein	Baculo,	Baculo,	Baculo,	Baculo,	Baculo,	E. coli,		
Trotem	Wildtyp *	Wildtyp *	Wildtyp *	Y418W	Y418W	Wildtyp		
Datensammlung								
Raumgruppe	P1	$P2_1$	P1	P1	P1	P1		
Kristallform	1	2	1	1	1	3		
Zellkonstanten	41,76	41,9	41,53	41,70	41,8	64,5		
$(a, b, c, \alpha, \beta, \gamma)$	62,89	123,9	62,95	63,08	62,5	72,6		
	73,95	63,7	72,79	74,06	73,9	82,4		
	100,4	90	100,4	100,6	100,6	91,8		
	91,4	89,97	90,8	91,1	91,0	106,0		
	90,0	90	90,0	90,1	90,0	104,9		
Wellenlänge (Å)	1,05	1,05	1,05	1,05	1,00075	1,05		
Beam line	BW-6	BW-6	BW-6	BW-6	PX	BW-6		
	DESY	DESY	DESY	DESY	SLS	DESY		
Auflösung (Å)	19,17-2,5	20,0-2,4	20,0-2,3	21,08-2,7	20-1,95	20,9-2,5		
Vollständigkeit (%)	72,8 [69,7]	95,9 [90,0]	96,0 [93,5]	93,0 [95,0]	93,9 [90,4]	95,9 [95,7]		
[letzte Schale]								
I/σ (I) [letzte Schale]	9,2 [5,3]	7,8 [2,5]	9,9 [5,2]	4,6 [1,5]	6,8 [3,7]	1,7 [1,4}		
R _{sym} (%)[letzte Schale]	6,5 [10,4]	6,3 [28,4]	5,3 [13,1]	12,3 [46,9]	13,5 [33,4]	12,0 [48,6]		
Verfeinerung								
Auflösung (Å)	19,17-2,75	20,0-2,4	20-2,3	21,08-2,9	20-1,95	8,00-2,7		
Anzahl der Atome	4205	4166	4683	4386	3912	8596		
Anzahl der Reflexe	15838	23139	29676	14464	48107	30449		
R _{Eaktor} (%)	25,4	25.2	19,4	21,5	21,4	28,3		
R_{Free} (%)	33,3	32,8	24,7	31,4	25,5	35,4		
Test set (%)	5,0	5,1	5,0	4,9	5,0	5,0		
Korrelationskoeffizient	0.04 [0.72]	0.00.50.011	0.00 [0.00]	0.01.00.011	0.00.00	70.0.[70.0]		
Fo-Fc [Free]	0,84 [0,73]	0,89 [0,81]	0,93 [0,89]	0,91 [0,81]	0,92 [90,0]	79,8 [70,0]		
Standardabweichung								
Bindungslängen (Å)	0,013	0,013	0,012	0,016	0,016	0,020		
Bindungswinkel (°)	1,482	1,376	1,701	1,787	1,551	1,942		
Temperaturfaktoren								
Alle Atome	29,9	49.0	39.8	43,2	30,5	52,9		
* 0 1 11	7-	2.5	2.5	7	7-	7-		

* Carboxymethyliert

5.3.1 Die Struktur der Kinasedomäne von Src in Kristallen der Raumgruppe P1 mit zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit

5.3.1.1 Allgemeine Struktur / Konformation

Die zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheit haben in allen Strukturen etwas unterschiedliche Konformationen (siehe auch Abb. 5.8). Die C-terminale Domäne ist in beiden Molekülen sehr gut definiert. Sie ist nach allen Seiten von Symmetrieäquivalenten (ebenfalls *C-lobes*) umgeben. Die N-terminale Domäne ist weniger gut in der Elektronendichte definiert und scheint daher flexibel zu sein, auch deshalb, weil wenige Kontakte zu Nachbarmolekülen existieren, um eine Konformation fest zu verankern. Beide Moleküle sind unterschiedlich weit geöffnet. Kinasen sind flexibel und können in offenen und geschlossenen Konformationen vorliegen (Abschnitt 2.1.1). In Abb. 5.5 ist die Struktur der Kinasedomäne von Src nach B-Faktoren gefärbt. Der *N-lobe* hat sehr viel höhere B-Faktoren im Vergleich zum *C-lobe*. Dies deutet auch auf Flexibilität hin.



Abb. 5.6 A Nach Temperaturfaktoren eingefärbte C α Struktur der Kinasedomäne von Src, wobei der B-Faktor von blau über grün und gelb nach rot hin zunimmt. Der kleinere *N-lobe* zeigt höhere Temperaturfaktoren als der größere *C-lobe*. Die höchsten B-Faktoren findet man im Bereich der Helix C und des Glycinloops. Eine Verschiebung dieser beiden Teile des *N-lobes* ist als Regulierungsmechanismus von Kinasen beschrieben. Der Aktivierungsloop ist ungeordnet und daher in der Elektronendichte nicht zu erkennen. **B** Im Vergleich dazu ist die Struktur 1FMK – inaktives Src mit SH2 und SH3 Domäne – dargestellt. Die Temperaturfaktoren sind insgesamt niedriger, besonders im *N-lobe*.

In der Struktur 1FMK aus der PDB [109], die inaktives Src mit katalytischer, SH2 und SH3-Domäne darstellt, ist die katalytische Domäne durch die SH2 und SH3 Domäne fixiert. Es gibt Untersuchungen, die bei Mitgliedern der Src-Familie die Flexibilität der einzelnen Domänen gegeneinander beschreiben [122]. Bei genauer Analyse der Kristallpackung der Kinasedomäne (siehe auch Abschnitt 5.2.4) zeigt sich, dass die beiden Moleküle in der asymmetrischen Einheit kaum Kontakte im Bereich der *N-lobes* haben. Molekül A (264-270) steht in Kontakt zu Molekül B im Bereich von 257-269 und 315-317. Außerdem gibt es noch eine Wechselwirkung zwischen Molekül A (299) und Molekül B (287). Im Gegensatz dazu sind die *C-lobes* sehr dicht gepackt. Auch dadurch wird die Flexibilität des *N-lobes* erhöht.

5.3.1.2 Helix C, Glycinloop und Aktivierungsloop

Die Helix C und die Spitze des Glycinloops, beide Teile des *N-lobes*, sind fast gar nicht in der Elektronendichte definiert, selbst die Hauptkette ist nur schwach durchgehend. Eine Verschiebung dieser beiden Teile des *N-lobes* ist als Regulierungsmechanismus von Kinasen beschrieben (Abschnitt 2.1.2). Der Aktivierungsloop ist ungeordnet und nur bis Phe407 des DFG-Motivs (in einer Struktur bis Leu412) in der Elektronendichte zu erkennen. Dies ist allerdings häufig bei Kinase-Strukturen zu beobachten, zum Beispiel bei FAK oder Eph2a [*167*].

Die Position der Spitze des Glycinloops ist in der Elektronendichte schwach definiert, während die Inhibitoren, die nur die Adenosin-, nicht aber die Triphosphat-Bindetasche besetzen, und deren unmittelbare Umgebung gut definiert sind. Der Glycinloop scheint also flexibel zu sein, wenn er nicht durch Liganden fixiert wird. So kann er auch eine Vielzahl von Liganden akzeptieren und sich ihnen anpassen, wie bei Staurosporin in CSK, Lck oder PKA.

5.3.1.3 C-Terminus

Der C-Terminus (520-535) kann an Tyr529 phosphoryliert werden und in der phosphorylierten Form an die SH2 Domäne binden, wodurch die Kinase inaktiviert wird. Dieser Teil der Sequenz war beim *Molecular Replacement* gelöscht worden (bis 520), in den ersten berechneten Dichten aber deutlich sichtbar. Der C-Terminus faltet unter dem *C-lobe* in einer Schleife, in der Nähe zu vier Helices, αE (382-362), αF (443-458), αI (510-522) und αH (502-490). Leu535 ist in Kontakt mit Leu362, Thr458, Lys460, Pro487, Glu488, Cys489 sowie Tyr529 (Abbildung 5.7). Dies kann durch das Fehlen der SH2 Domäne und/oder die Kristallpackung bedingt sein. Tyr529 ist nicht phosphoryliert. Auch massenspektroskopische Untersuchungen haben dies bestätigt. Es gibt einige Kontakte in diesem Bereich von Molekül A zu Molekül B sowie von B zu einem Symmetrieäquivalent von A.



Abb. 5.7 Der C-Terminus faltet unter vier Helices (E, F, H, I) des C-lobes.

5.3.1.4 ATP-Bindetasche

Trotz allen Unsicherheiten im *N-lobe* ist der Inhibitor in der Elektronendichte sehr gut definiert und ebenso die umliegenden Reste. Eine Ausnahme bildet der Aktivierungsloop, der nicht aufgelöst ist. Auch Seitenketten der Helix C sind teilweise nicht aufgelöst. Die Salzbrücke zwischen Lys297 und Glu312 (analog Lys72 und Glu91 bei PKA) ist vermutlich nicht vorhanden, da die diese Seitenketten ebenfalls nur teilweise aufgelöst sind.

5.3.2 Die Struktur der Kinasedomäne von Src in Kristallen der Raumgruppe P2₁

Es handelt sich hier um eine monokline Raumgruppe (P2₁) mit a=41,9, b=123,9, c=63,7 und β =89,97° mit einem Dimer in der asymmetrischen Einheit. Die drei fast 90° Winkel sowie gute R_{sym}-Werte nach der Integration der Intensitäten in der orthorhombischen Raumgruppe haben lange zu der falschen Einschätzung beigetragen, es handle sich um einen orthorhombischen Kristall. Beim *Molecular Replacement* ergab sich zwar eine klare Rotationslösung, allerdings in keiner der acht möglichen Raumgruppen (wenn man alle möglichen Kombinationen von Schraubenachsen in Betracht zieht) eine eindeutige und sinnvolle Translationslösung. Dies ergab sich auch mit verschiedenen Suchmodellen und

Domänenteilen. Deshalb wurde neu indiziert und integriert. In der monoklinen Raumgruppe P2₁ konnte die Struktur gelöst werden. Bei den zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit handelt es sich um das gleiche Dimer wie in P1 (Abb. 5.4). Auch die strukturellen Eigenschaften des Proteins stimmen mit den in Abschnitt 5.3.1 beschriebenen überein und werden deshalb nicht noch einmal beschrieben.

Der Inhibitor S01 konnte mit der Kinasedomäne von Src unter verschiedenen Bedingungen kokristallisiert werden. Kristallstrukturen konnten in der Raumgruppe P1 und P2₁ gelöst werden. Zum Vergleich der Struktur wurden alle vier verschiedenen Moleküle (zwei in jeder Kristallform) überlagert (Abb. 5.8). Sie unterscheiden sich nicht wesentlich und stellen die Flexibilität der Kinasedomäne noch einmal dar.



Abb. 5.8 Die Strukturen in der Raumgruppe $P2_1$ (blau) wurden mit denen in der Raumgruppe P1 (grün) überlagert. Die Strukturen unterscheiden sich kaum. Die Flexibilität der Kinasedomäne ist deutlich zu sehen.

5.3.3 Die Struktur der Kinasedomäne von Src in Kristallen der Raumgruppe P1 mit vier Molekülen in der asymmetrischen Einheit

Bei dem zur Kristallisation verwendeten Protein handelte es sich um rekombinant in *E. coli* hergestelltes, rückgefaltetes, autophosphoryliertes Protein. Es wurde ebenfalls von der Firma Roche Diagnostics GmbH zur Kristallisation zur Verfügung gestellt.

Kristalle entstanden in einer neuen Raumgruppe P1 mit neuen Zellkonstanten (a=64,5, b=72,6, c=82,4, α =91,8, β =106, γ =105) und vier Molekülen in der asymmetrischen Einheit.

Auffällig ist dabei, dass die Zellkonstanten von ca. 63 und 72 Å auch hier wieder zu finden sind. Allerdings kommt das Dimer der beiden anderen Raumgruppen nicht vor. Die Kristallpackung ist unterschiedlich (Abschnitt 5.2.4).

5.3.3.1 Aktivierungsloop

Bei zwei von vier Molekülen ist der Aktivierungsloop sehr deutlich zu sehen (Abb. 5.9). Bei den anderen beiden Molekülen ist er wie in den anderen Kristallformen ungeordnet. Die Hauptkette ist komplett durchgängig, die Elektronendichte der meisten Seitenketten ist gut definiert. Gut zu sehen ist die Phosphorylierung an Tyr418. In Kristallstrukturen von Lck ist der Aktivierungsloop ebenfalls phosphoryliert und aufgelöst. Wie das Sequenzalignment zeigt (Abb. 2.8), ist die Sequenz des Aktivierungsloops bei Src und Lck bis auf zwei Aminosäuren identisch. Auch die Konformation ist sehr ähnlich.



Abb. 5.9 Die vier Moleküle in der asymmetrischen Einheit sind auf die *C-lobes* überlagert. Bei zwei Molekülen (grün) ist der Aktivierungsloop geordnet und gut aufgelöst.

5.1.1.1 C-Terminus

In dieser Kristallform ist der Aktivierungsloop aufgelöst. Nicht zu sehen ist dafür der C-Terminus, der in den anderen Kristallformen sehr gut zu sehen war. Alle Moleküle zeigen eine gute Elektronendichte für die Aminosäuren bis einschließlich 526.

5.4 Analyse der Inhibitorbindung

5.4.1 Inhibitor S01

Inhibitor S01 ist den Pyrido-[2,3-d]-pyrimidonen (zum Beispiel PD173955) in der chemischen Struktur ähnlich (Abb. 5.10). Pyrido-pyrimidone sind nM Inhibitoren von Kinasen der Src-Familie aber auch von anderen Tyrosinkinasen [232]. Auch für den Inhibitor S01 liegt die Bindungskonstante im niedrigen nM Bereich.



Abb. 5.10 Strukturformel von Inhibitor S01.

Der Inhibitor S01 wurde in zwei verschiedenen Kristallformen unter zwei verschiedenen Bedingungen mit modifiziertem Src Wildtyp kokristallisiert (Abschnitt 5.3.1 und 5.3.2). Die Strukturen konnten in der Raumgruppe P2₁ mit einer Auflösung von 2,4 Å, in P1 mit einer Auflösung von 2,75 Å gelöst werden (Tabelle 5.2). Alle vier Moleküle aus zwei Kristallen sind überlagert in Abb. 5.8 und die Bindetasche vergrößert in Abb. 5.11 dargestellt.



Abb. 5.11 Überlagerung von vier Molekülen Src-Kinasedomäne aus zwei Kokristallstrukturen mit dem gleichen Inhibitor. Die Abb. zeigt die Inhibitorbindetasche als einen vergrößerten Ausschnitt von Abb. 5.8.

Der Inhibitor bindet anders als die in Abschnitt 4 beschrieben Inhibitoren der AGC-Familie. Er besetzt nur die Adenin-Bindetasche, nicht aber die Triphosphat-Bindetasche. Der flexible Diethylaminoethylrest ist nicht aufgelöst. Kontakte bestehen vor allem zur *Hinge Region* (Ile338, Thr340, Glu341, Tyr342, Met343, Asn344, Lys345, Gly346), aber auch zu Teilen des Glycinloops (Leu275, Val283), des β-Faltblatts 3 (Ala295, Ile296, Lys297), des β-Faltblatts 7 (Leu395) und der Helix C (Met316). Alle diese Aminosäuren bilden eine hydrophobe Tasche. Wasserstoffbrücken werden nur zur *Hinge Region* gebildet: zum Carbonylsauerstoff von Met343 und zum Amidstickstoff von Met343 (Abb. 5.11).



Abb. 5.12 Bindung von Inhibitor S01 an Src. Die F_o - F_c Elektronendichte (berechnet ohne Inhibitoratome) ist auf 2,0 σ konturiert. Die flexible Diethylaminoethylgruppe ist nicht aufgelöst und deshalb nicht dargestellt.

5.4.2 CGP77675



Abb. 5.13 Strukturformel von Inhibitor CGP77675.

Der Inhibitor CGP77675 wurde von Novartis für die Indikation Osteoporose entwickelt. Die IC_{50} -Werte für Src liegen zwischen 5-20 nM, je nach verwendetem Substrat, für verwandte Kinasen 15-20 mal höher [*147*]. Die Strukturformel ist in Abb. 5.13 dargestellt.

Die Struktur des Komplexes von CGP77675 mit der Kinasedomäne von Src wurde in der Kristall-form 1 (P1 mit zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit) mit 2,3 Å Auflösung gelöst (Tabelle 5.1, 5.2). Alle Teile des Inhibitors sind gut in der Elektronendichte definiert.



Abb. 5.14 Inhibitor (Molekül A) mit verfeinerter $2F_o$ - F_c (beige) und *omit* F_o - F_c (braun) Elektronendichte. Mögliche Wasserstoffbrücken zum Protein sind eingezeichnet. Der Inhibitor ist sehr gut definiert, die Dichte in allen Bereichen klar.

Bei Inhibitor CGP77675 handelt es sich um ein 5,7-Diphenyl-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin Derivat. Der Pyrrolo-pyrimidin Teil bindet in der Adenintasche ähnlich wie Adenin mit einer Wasserstoffbrücke zum Amidstickstoff von Met343 sowie zahlreichen van-der-Waals-Kontakten zur Hinge Region (Thr340, Glu341, Tyr342, Met343). Der Aminosubstituent bildet zwei weitere H-Brücken zur Hydroxylgruppe von Thr340 und zum Carbonylsauerstoff von Glu341 (Abb. 5.14). Der Methoxyphenylsubstituent erstreckt sich tiefer in die Bindetasche mit Kontakten zum β-Faltblatt 3 (Ala295, Ile296, Lys297), zur Hinge Region (Thr340, Ile338) und zum Anfang des Aktivierungsloops (Ala405, Asp406). Diese Bindetasche wird durch die Helix C (Met316, Glu312) und Val325 abgeschlossen. In Molekül A dieser Struktur ist die Helix C komplett mit Seitenketten, insbesondere auch Glu312 und Met316 aufgelöst (Abb. 5.14). Der andere Phenylsubstituent zeigt aus der Bindetasche heraus und steht in Kontakt zur Hinge Region (Asn344, Lys345, Gly346), zum Glycinloop (Leu275, Gly286, soweit aus der Adenintasche entfernt, dass er in Kontakt zum Nachbarmolekül B steht (Ser524, Thr525). Es wird sogar eine Wasserstoffbrücke zu Hydroxylgruppe von Thr525 des Nachbarmoleküls gebildet.

Auch in dieser Struktur ist die Kinasedomäne in beiden Molekülen unterschiedlich weit geöffnet. Die Lage der in Inhibitoren ist prinzipiell gleich (Abb. 5.15). Nur im Bereich des 4-Hydroxypiperidinrings und dem Ethyllinker sind zwei unterschiedliche Konformationen zu sehen, die aber in etwa den gleichen Raum einnehmen.



Abb. 5.15 Beide Inhibitoren von Molekül A (dunkler) und Molekül B (heller). Die im Bild vorderen Teile des Inhibitors können unterschiedliche Konformationen einnehmen.

5.4.3 Purvalanol A

Purvalanol A und B sind als Inhibitoren von Cyclin abhängiger Kinase (CDK) mit guter Selektivität bekannt [233, 234]. Die IC₅₀- Werte liegen für CDK im niedrigen nM Bereich, während PKA kaum (μ M) und PKC nicht (>100 μ M) gehemmt wird [233]. Erk1, Erk2, p42MAPK, p44MAPK, CSK und LCK wurden als weitere Targets von Purvalanol gefunden [234-236]. Eine Röntgenstruktur des Komplexes von Purvalanol B mit CDK2 ist beschrieben [233]. Purvalanol A führt in *in vitro* Experimenten zu einem Arrest in der G1 und G2 Phase des Zellzyklus [237]. Die Strukturformeln von Purvalanol A und B unterscheiden sich nur in einer funktionellen Gruppe (Abb. 5.16).



Abb. 5.16 Die Strukturformeln von Purvalanol A und B unterscheiden sich nur in einer funktionellen Gruppe.

Im Screening ist Purvalanol auch als Inhibitor für Src aufgefallen. Zudem konnte ein K_i-Wert von 32 nM bestimmt werden. Eine Kokristallisation mit der Kinasedomäne von Src unter den gleichen Bedingungen (20 % Ethylenglycol) wie oben beschrieben, führte zu kleinen, dünnen Kristallen der bekannten Raumgruppe P1, die bis ca. 2,9 Å streuten. Die Struktur konnte mit *Molecular Replacement* unter Verwendung einer bereits verfeinerten Struktur gelöst werden (Tabelle 5.2).

Purvalanol A bindet in einem Bereich ähnlich wie Inhibitor S01 und CGP77675 mit van-der-Waals-Kontakten zu fast den gleichen Aminosäuren wie die anderen Inhibitoren. Der Inhibitor interagiert mit der *Hinge Region* (Thr340, Glu341, Tyr342, Met343, Asn344, Gly346), β -Faltblatt 3 (Ala295), Teilen des Glycinloops (Leu275, Val283) und dem kurzen β -Faltblatt 7 (Leu395). Die Seitenkette von Lys297 ist ungeordnet, so dass man hier nicht von einem Kontakt sprechen kann. In Molekül A ist ein Teil des Aktivierungsloops bis einschließlich Leu412 aufgelöst.

Die F_o - F_c -Elektronendichte vor dem Einbau des Inhibitors zeigt beide Aromaten, aber von allen Substituenten ist jeweils nur das erste Atom sichtbar (Abb. 5.17). Zwei Wasserstoffbrücken können zur Hinge Region gebildet werden: zur Carbonylgruppe von Met343 sowie zum Amidstickstoff von Met343. Eine weitere H-Brücke vom Inhibitor zu einem Wassermolekül, das wiederum eine H-Brücke zu Asp406 bildet, ist nur in Molekül A zu sehen.



Abb. 5.17 Ausschnitt aus Molekül A zeigt den Inhibitor mit Elektronendichte (F_o - F_c Elektronendichte, konturiert auf 2 σ , grün).

Vergleich mit 1CKP (CDK2-Purvalanol B-Komplex)

Die Konformation der beiden Kinasen CDK2 und Src ist recht unterschiedlich. CDK2 ist stärker geschlossen und die Hauptkette verläuft in der *Hinge Region* anders. Der Purinring liegt in den beiden Strukturen ähnlich. Interessant ist der m-Chlorphenylring, der im Komplex mit Src fast in einer Ebene mit dem Purin liegt, aber im Komplex mit CDK2 um ca. 60° gedreht steht (Abb. 5.18). Dabei wurden auch zwei unterschiedliche Konformationen gefunden, die sich in der Orientierung des Chlors unterschieden. Die zusätzliche Carboxylatgruppe ist nicht in den Koordinaten aus der Proteindatenbank enthalten, ebenso fehlen die Koordinaten der anderen beiden Substituenten. Diese sind nur im Schema mit Wechselwirkungen zum Protein in der Publikation dargestellt [*233*].



Abb. 5.18 Überlagerung des Src-Purvalanol A-Komplex (Molekül A hellblau, Molekül B dunkelblau) mit dem CDK2-Purvalanol B-Komplex (1CKP) (beide Inhibitor Konformationen orange).

5.5 Vergleich zu anderen aktiven und inaktiven Strukturen von Kinasen der Src-Familie

Strukturen von Mitgliedern der Src-Familie in der PDB sind in Tabelle 2.2 und 2.3 zusammengestellt. Jeweils mehrere Strukturen von Src (inaktiv, mit SH3 und SH2 Domäne), Hck (inaktiv, mit SH3 und SH2 Domäne) und Lck (aktiv, nur Kinasedomäne) mit diversen Liganden sind dort zu finden. Einzelne Vertreter dieser Strukturen wurden mit den neuen Strukturen überlagert und verglichen (Abb. 5.19).



Abb. 5.19 Die Struktur der Src Kinasedomäne (blau) ist mit inaktivem Src (gelb), inaktivem Hck (rot) und aktivem Lck (grün) überlagert. Bei den Strukturen der Src Kinasedomäne ist der SH2-SH1-Linker nicht aufgelöst. Der Aktivierungsloop ist nur bei einer Kristallform geordnet und liegt dann so wie bei Lck. Der C-Terminus faltet in einer Schleife unter dem *C-lobe*.

Alle Strukturen zeigen bei einer Überlagerung der C-lobes Unterschiede in der relativen Position des *N-lobes*. Die Strukturen der Src Kinasedomäne sind Strukturen von aktivem Lck ähnlicher als denen des inaktiven Src. Gegenüber der inaktiven Struktur sind die β-Faltblätter des N-lobe um ca. 19° rotiert und auch die Helix C nimmt eine andere Position ein. Bewegungen des *N-lobe* beim Übergang von aktiver zu inaktiver Konformation der Kinase sind beschrieben (Abschnitt 2.1.1). Diese Strukturen haben also in eine deutlich veränderte Orientierung der lobes zu einander, die der aktiver Strukturen ähnlich ist. Aufgrund der Domänenanordnung könnte man also davon ausgehen, dass es sich um eine aktive Konformation handelt. Dies kann man auch erwarten, da katalytisch aktives Protein zur Kristallisation verwendet wurde. Dennoch ist in den Strukturen der Aktivierungsloop und die Seitenketten der katalytisch wichtigen Aminosäuren Lys297 und Glu312 nicht geordnet. Es stellt sich also die Frage, wie aktiv diese Strukturen wirklich sind. ATP oder ATP-Analoga und Substratpeptide wurden ebenfalls zur Kristallisation verwendet. Kristalle entstanden aber nur mit AMP-PCP. Die gelöste Struktur zeigte aber keine Elektronendichte für das Nucleotid. Dies könnte daran liegen, dass eine ATP-gebundene Konformation der Kinase, mit der Kristallpackung nicht vereinbar ist.

5.6 Zusammenfassung

5.6.1 Proteinstruktur

In den meisten Strukturen ist der *C-lobe* gut definiert und stimmt mit der inaktiven Form (z.B. 1FMK) überein. Ebenso wie bei 1FMK ist der Aktivierungsloop nicht geordnet. Nur bei dem Kristall mit vier Molekülen in der asymmetrischen Einheit (Kristallform 3) ist bei zwei Molekülen der Aktivierungsloop zu sehen. Er hat eine Konformation ähnlich wie in aktiven Lck-Strukturen. Die Phosphorylierung an Tyr418 ist gut zu sehen. Der *N-lobe* ist flexibel in seiner Konformation relativ zum *C-lobe*. Dies sieht man unter anderem daran, dass die beiden Moleküle im Kristall unterschiedlich sind und auch von Struktur zu Struktur unterschiedlich weit geöffnet sein können. Das spiegelt die bei vielen Kinasen zu beobachtende Flexibilität wider. Hinzu kommt, dass aufgrund der Kristallpackung kaum Kontakte zwischen Resten des *N-lobe* insgesamt schlechter und in Bereichen der Helix C und des Glycinloops teilweise überhaupt nicht mehr vorhanden ist.

Die Inhibitoren und deren Umgebung sind gut sichtbar, so dass die Strukturen zur Analyse der Wechselwirkungen und für strukturbasiertes Design verwendet werden können.

5.6.2 Inhibitoren

Die beschriebenen Src-Inhibitoren haben verschiedene Grundgerüste und entstammen unterschiedlichen chemischen Klassen. Dennoch haben sie gemein, dass sie nur die Adeninund Ribose-Bindetasche besetzen, nicht aber die Triphosphat-Bindetasche. Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen PKA-Inhibitoren erstrecken sie sich noch weiter aus der Bindetasche heraus, dorthin wo bei PKA der C-Terminus verläuft und die Bindetasche abschließt. Auch können sie sich weiter in die andere Richtung ausdehnen, wo bei PKA Met120 als *Gate-keeper* die Adenintasche abschließt.

Alle Inhibitoren haben die meisten van-der-Waals-Kontakte sowie zwei oder drei Wasserstoffbrücken zur *Hinge Region*: zum Amidstickstoff von Met343, dem Homologen zu Val123 in PKA, sowie eine weitere zu Met343(O) oder Glu341(O). Weitere van-der-Waals Kontakte bestehen zum β -Faltblatt 1 und 2 (Glycinloop), dem β -Faltblatt 3, dem Anfang des Aktivierungsloops und dem kurzen β -Faltblatt 7. Inhibitor CGP77675 hat zusätzlich Kontakte zu einem Nachbarmolekül.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., und Sudarsanam, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome, *Science 298*, 1912-1934.
- 2. Bilwes, A. M., Alex, L. A., Crane, B. R., und Simon, M. I. (1999) Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase, *Cell 96*, 131-141.
- 3. Hanks, S. K., und Hunter, T. (1995) Protein Kinases .6. The Eukaryotic Protein-Kinase Superfamily - Kinase (Catalytic) Domain-Structure and Classification, *Faseb Journal 9*, 576-596.
- 4. Hanks, S. K., und Quinn, A. M. (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members, *Methods in Enzymology 200*, 38-62.
- 5. Engh, R. A., und Bossemeyer, D. (2002) Structural aspects of protein kinase control role of conformational flexibility, *Pharmacology & Therapeutics 93*, 99-111.
- 6. Taylor, S. S., Radzio-Andzelm, E., Madhusudan, Cheng, X. D., Eyck, L. T., und Narayana, N. (1999) Catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase: Structure and dynamics of the active site cleft, *Pharmacology & Therapeutics 82*, 133-141.
- Ogawa, A., Takayama, Y., Sakai, H., Chong, K. T., Takeuchi, S., Nakagawa, A., Nada, S., Okada, M., und Tsukihara, T. (2002) Structure of the carboxyl-terminal Src kinase, Csk, *Journal of Biological Chemistry* 277, 14351-14354.
- 8. Hubbard, S. R., Wei, L., Elis, L., und Hendrickson, W. A. (1994) Crystal-Structure of the Tyrosine Kinase Domain of the Human Insulin-Receptor, *Nature 372*, 746-754.
- 9. Hubbard, S. R. (1997) Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog, *Embo Journal 16*, 5572-5581.
- 10. Cohen, P. (2002) The origins of protein phosphorylation, *Nature Cell Biology* 4, E127-E130.
- 11. Engh, R. A., und Bossemeyer, D. (2001) The protein kinase activity modulation sites: Mechanisms for cellular regulation - Targets for therapeutic intervention in *Advances in Enzyme Regulation*, *41*, 121-149.
- 12. Walsh, D. A., Perkins, J. P., und Krebs, E. G. (1968) An Adenosine 3',5'-Monophosphate-Dependant Protein Kinase from Rabbit Skeletal Muscle, *Journal of Biological Chemistry 243*, 3763ff.
- 13. Montminy, M. (1997) Transcriptional regulation by cyclic AMP, *Annu. Rev. Biochem.* 66, 807-822.
- 14. Montminy, M. R., Gonzalez, G. A., und Yamamoto, K. K. (1990) Characteristics of the cAMP response unit, *Metabolism 39*, 6-12.
- Knighton, D. R., Zheng, J. H., Teneyck, L. F., Ashford, V. A., Xuong, N. H., Taylor, S. S., und Sowadski, J. M. (1991) Crystal-Structure of the Catalytic Subunit of Cyclic Adenosine-Monophosphate Dependent Protein-Kinase, *Science 253*, 407-414.
- 16. Knighton, D. R., Bell, S. M., Zheng, J. H., Teneyck, L. F., Xuong, N. H., Taylor, S. S., und Sowadski, J. M. (1993) 2.0-Angstrom Refined Crystal-Structure of the Catalytic

Subunit of cAMP-Dependent Protein-Kinase Complexed with a Peptide Inhibitor and Detergent, *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 49, 357-361.

- 17. Bossemeyer, D., Engh, R. A., Kinzel, V., Ponstingl, H., und Huber, R. (1993) Phosphotransferase and Substrate Binding Mechanism of the cAMP-Dependent Protein-Kinase Catalytic Subunit from Porcine Heart as Deduced from the 2.0 Angstrom Structure of the Complex with Mn2+ Adenylyl Imidodiphosphate and Inhibitor Peptide PKI(5-24), *Embo Journal 12*, 849-859.
- Zheng, J. H., Knighton, D. R., Xuong, N. H., Taylor, S. S., Sowadski, J. M., und Teneyck, L. F. (1993) Crystal-Structures of the Myristylated Catalytic Subunit of cAMP-Dependent Protein-Kinase Reveal Open and Closed Conformations, *Protein Science 2*, 1559-1573.
- 19. Karlsson, R., Zheng, J. H., Xuong, N. H., Taylor, S. S., und Sowadski, J. M. (1993) Structure of the Mammalian Catalytic Subunit of cAMP-Dependent Protein-Kinase and an Inhibitor Peptide Displays an Open Conformation, *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 49, 381-388.
- Zheng, J. H., Trafny, E. A., Knighton, D. R., Xuong, N. H., Taylor, S. S., Teneyck, L. F., und Sowadski, J. M. (1993) 2.2-Angstrom Refined Crystal-Structure of the Catalytic Subunit of cAMP-Dependent Protein-Kinase Complexed with MnATP and a Peptide Inhibitor, *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography 49*, 362-365.
- Zheng, J. H., Knighton, D. R., Teneyck, L. F., Karlsson, R., Xuong, N. H., Taylor, S. S., und Sowadski, J. M. (1993) Crystal-Structure of the Catalytic Subunit of cAMP-Dependent Protein-Kinase Complexed with MgATP and Peptide Inhibitor, *Biochemistry* 32, 2154-2161.
- 22. Engh, R. A., Girod, A., Kinzel, V., Huber, R., und Bossemeyer, D. (1996) Crystal structures of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in complex with isoquinolinesulfonyl protein kinase inhibitors H7, H8, and H89 Structural implications for selectivity, *Journal of Biological Chemistry* 271, 26157-26164.
- 23. Narayana, N., Cox, S., Xuong, N. H., TenEyck, L. F., und Taylor, S. S. (1997) A binary complex of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase and adenosine further defines conformational flexibility, *Structure* 5, 921-935.
- 24. Narayana, N., Cox, S., Shaltiel, S., Taylor, S. S., und Xuong, N. H. (1997) Crystal structure of a polyhistidine-tagged recombinant catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with the peptide inhibitor PKI(5-24) and adenosine, *Biochemistry 36*, 4438-4448.
- 25. Prade, L., Engh, R. A., Girod, A., Kinzel, V., Huber, R., und Bossemeyer, D. (1997) Staurosporine-induced conformational changes of cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit explain inhibitory potential, *Structure 5*, 1627-1637.
- 26. Narayana, N., Diller, T. C., Koide, K., Bunnage, M. E., Nicolaou, K. C., Brunton, L. L., Xuong, N. H., Ten Eyck, L. F., und Taylor, S. S. (1999) Crystal structure of the potent natural product inhibitor balanol in complex with the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase, *Biochemistry* 38, 2367-2376.
- 27. Madhusudan, Akamine, P., Xuong, N. H., und Taylor, S. S. (2002) Crystal structure of a transition state mimic of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase, *Nature Structural Biology* 9, 273-277.

- 28. Akamine, P., Madhusudan, Wu, J., Xuong, N. H., Ten Eyck, L. F., und Taylor, S. S. (2003) Dynamic features of cAMP-dependent protein kinase revealed by apoenzyme crystal structure, *Journal of Molecular Biology 327*, 159-171.
- 29. Breitenlechner, C., Gassel, M., Hidaka, H., Kinzel, V., Huber, R., Engh, R. A., und Bossemeyer, D. (2003) Protein kinase a in complex with rho-kinase inhibitors Y-27632, fasudil, and H-1152P: Structural basis of selectivity, *Structure 11*, 1595-1607.
- 30. Meinkoth, J. L., Alberts, A. S., Went, W., Fantozzi, D., Taylor, S. S., Hagiwara, M., Montminy, M., und Feramisco, J. R. (1993) Signal-Transduction through the cAMP-Dependent Protein-Kinase, *Molecular and Cellular Biochemistry 128*, 179-186.
- 31. Johnson, D. A., Akamine, P., Radzio-Andzelm, E., Madhusudan, und Taylor, S. S. (2001) Dynamics of cAMP-dependent protein kinase, *Chemical Reviews 101*, 2243-2270.
- 32. Skalhegg, B. S., und Tasken, K. (2000) Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA, *Frontiers in Bioscience* 5, D678-D693.
- 33. Griffioen, G., und Thevelein, J. M. (2002) Molecular mechanisms controlling the localisation of protein kinase A, *Current Genetics 41*, 199-207.
- 34. Herberg, F. W., und Taylor, S. S. (1993) Physiological Inhibitors of the Catalytic Subunit of cAMP-Dependent Protein-Kinase Effect of MgATP on Protein-Protein Interactions, *Biochemistry* 32, 14015-14022.
- 35. Lee, D. C., Carmichael, D. F., Krebs, E. G., und McKnight, G. S. (1983) Isolation of a CDNA Clone for the Type-I Regulatory Subunit of Bovine cAMP-Dependent Protein-Kinase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 80, 3608-3612.
- 36. Lee, J. H., Bechtel, P. J., und Phillips, G. N. (1985) Crystallization and Preliminary-X-Ray Investigation of the Regulatory Subunit of cAMP-Dependent Protein-Kinase, *Journal of Biological Chemistry 260*, 9380-9381.
- 37. Takio, K., Smith, S. B., Krebs, E. G., Walsh, K. A., und Titani, K. (1984) Amino acid sequence of the regulatory subunit of bovine type II adenosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase, *Biochemistry* 23, 4200-4206.
- 38. Titani, K., Sasagawa, T., Ericsson, L. H., Kumar, S., Smith, S. B., Krebs, E. G., und Walsh, K. A. (1984) Amino acid sequence of the regulatory subunit of bovine type I adenosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase, *Biochemistry 23*, 4193-4199.
- 39. Takio, K., Smith, S. B., Krebs, E. G., Walsh, K. A., und Titani, K. (1982) Primary structure of the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle, *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 79, 2544-2548.
- 40. Clegg, C. H., Cadd, G. G., und McKnight, G. S. (1988) Genetic-Characterization of a Brain-Specific Form of the Type-I Regulatory Subunit of cAMP-Dependent Protein-Kinase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 3703-3707.
- 41. Scott, J. D., und McCartney, S. (1994) Localization of A-Kinase through Anchoring Proteins, *Molecular Endocrinology 8*, 5-11.

- 42. Colledge, M., und Scott, J. D. (1999) AKAPs: from structure to function, *Trends in Cell Biology* 9, 216-221.
- 43. Feliciello, A., Gottesman, M. E., und Avvedimento, E. V. (2001) The biological functions of A-kinase anchor proteins, *Journal of Molecular Biology 308*, 99-114.
- 44. Zheng, L., Yu, L., Tu, Q., Zhang, M., He, H., Chen, W., Gao, J., Yu, J., Wu, Q., und Zhao, S. (2000) Cloning and mapping of human PKIB and PKIG, and comparison of tissue expression patterns of three members of the protein kinase inhibitor family, including PKIA, *Biochemical Journal 349*, 403-7.
- 45. Olsen, S. R., und Uhler, M. D. (1991) Inhibition of protein kinase-A by overexpression of the cloned human protein kinase inhibitor, *5*, 1246-1256.
- 46. Olsen, S. R., und Uhler, M. D. (1991) Isolation and characterization of cDNA clones for an inhibitor protein of cAMP-dependent protein kinase, *266*, 11158-11162.
- 47. Scott, J. D., Fischer, E. H., Demaille, J. G., und Krebs, E. G. (1985) Identification of an Inhibitory Region of the Heat-Stable Protein Inhibitor of the cAMP-Dependent Protein-Kinase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 4379-4383.
- 48. Jahnsen, T., Hedin, L., Kidd, V. J., Beattie, W. G., Lohmann, S. M., Walter, U., Durica, J., Schulz, T. Z., Schiltz, E., Browner, M., Lawrence, C. B., Goldman, D., Ratoosh, S. L., und Richards, J. S. (1986) Molecular-Cloning, cDNA Structure, and Regulation of the Regulatory Subunit of Type-II cAMP-Dependent Protein-Kinase from Rat Ovarian Granulosa-Cells, *Journal of Biological Chemistry 261*, 2352-2361.
- 49. Fantozzi, D. A., Taylor, S. S., Howard, P. W., Maurer, R. A., Feramisco, J. R., und Meinkoth, J. L. (1992) Effect of the Thermostable Protein-Kinase Inhibitor on Intracellular-Localization of the Catalytic Subunit of cAMP-Dependent Protein-Kinase, *Journal of Biological Chemistry* 267, 16824-16828.
- Fantozzi, D. A., Harootunian, A. T., Wen, W., Taylor, S. S., Feramisco, J. R., Tsien, R. Y., und Meinkoth, J. L. (1994) Thermostable Inhibitor of cAMP-Dependent Protein-Kinase Enhances the Rate of Export of the Kinase Catalytic Subunit from the Nucleus, *Journal of Biological Chemistry 269*, 2676-2686.
- 51. Hauer, J. A., Barthe, P., Taylor, S. S., Parello, J., und Padilla, A. (1999) Two welldefined motifs in the cAMP-dependermt protein kinase inhibitor (PKI alpha) correlate with inhibitory and nuclear export function, *Protein Science* 8, 545-553.
- 52. Olsen, S. R., und Uhler, M. D. (1989) Affinity Purification of the C-Alpha and C-Beta Isoforms of the Catalytic Subunit of cAMP-Dependent Protein-Kinase, *Journal of Biological Chemistry 264*, 18662-18666.
- 53. Bossemeyer, D. (1994) The Glycine-Rich Sequence of Protein-Kinases a Multifunctional Element, *Trends in Biochemical Sciences 19*, 201-205.
- 54. Schneider, T. (2002) Kinetische und strukturelle Untersuchungen zur Funktion ausgewählter konservierter Aminosäurereste der katalytischen Untereinheit Ca der Proteinkinase A, Dissertation, Universität Bielefeld, Bielefeld
- 55. Yonemoto, W., McGlone, M. L., Grant, B., und Taylor, S. S. (1997) Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in Escherichia coli, *Protein Engineering 10*, 915-925.

- 56. Tonerwebb, J., Vanpatten, S. M., Walsh, D. A., und Taylor, S. S. (1992) Autophosphorylation of the Catalytic Subunit of cAMP-Dependent Protein-Kinase, *Journal of Biological Chemistry* 267, 25174-25180.
- 57. Yonemoto, W., Garrod, S. M., Bell, S. M., und Taylor, S. S. (1993) Identification of Phosphorylation Sites in the Recombinant Catalytic Subunit of cAMP-Dependent Protein-Kinase, *Journal of Biological Chemistry 268*, 18626-18632.
- 58. Herberg, F. W., Yonemoto, W., und Taylor, S. S. (1993) Autophosphorylation Sites on the Catalytic Subunit of cAMP-Dependent Protein-Kinase, *Journal of Cellular Biochemistry*, 269-269.
- 59. Herberg, F. W., Bell, S. M., und Taylor, S. S. (1993) Expression of the Catalytic Subunit of cAMP-Dependent Protein-Kinase in Escherichia-Coli Multiple Isozymes Reflect Different Phosphorylation States, *Protein Engineering* 6, 771-777.
- 60. Seifert, M. H. J., Breitenlechner, C. B., Bossemeyer, D., Huber, R., Holak, T. A., und Engh, R. A. (2002) Phosphorylation and flexibility of cyclic-AMP-dependent protein kinase (PKA) using P-31 NMR Spectroscopy, *Biochemistry* 41, 5968-5977.
- 61. Moore, M. J., Kanter, J. R., Jones, K. C., und Taylor, S. S. (2002) Phosphorylation of the catalytic subunit of protein kinase A Autophosphorylation versus phosphorylation by phosphoinositide-dependent kinase-1, *Journal of Biological Chemistry* 277, 47878-47884.
- 62. Tholey, A., Pipkorn, R., Bossemeyer, D., Kinzel, V., und Reed, J. (2001) Influence of myristoylation, phosphorylation, and deamidation on the structural behavior of the N-terminus of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase, *Biochemistry* 40, 225-231.
- 63. Yonemoto, W., McGlone, M. L., und Taylor, S. S. (1993) N-Myristylation of the Catalytic Subunit of cAMP-Dependent Protein-Kinase Conveys Structural Stability, *Journal of Biological Chemistry 268*, 2348-2352.
- 64. Jedrzejewski, P. T., Girod, A., Tholey, A., Konig, N., Thullner, S., Kinzel, V., und Bossemeyer, D. (1998) A conserved deamidation site at Asn 2 in the catalytic subunit of mammalian cAMP-dependent protein kinase detected by capillary LC-MS and tandem mass spectrometry, *Protein Science* 7, 457-469.
- 65. McLaughlin, S., und Aderem, A. (1995) The Myristoyl-Electrostatic Switch a Modulator of Reversible Protein-Membrane Interactions, *Trends in Biochemical Sciences* 20, 272-276.
- 66. Silverman, L., und Resh, M. D. (1992) Lysine Residues Form an Integral Component of a Novel NH2-Terminal Membrane Targeting Motif for Myristylated pp60(V-Src), *Journal of Cell Biology 119*, 415-425.
- 67. Struppe, J., Komives, E. A., Taylor, S. S., und Vold, R. R. (1998) H-2 NMR studies of a myristoylated peptide in neutral and acidic phospholipid bicelles, *Biochemistry* 37, 15523-15527.
- 68. Gangal, M., Clifford, T., Deich, J., Cheng, X. D., Taylor, S. S., und Johnson, D. A. (1999) Mobilization of the A-kinase N-myristate through an isoform-specific intermolecular switch, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96*, 12394-12399.
- 69. Deblaquiere, J., Walker, F., Michelangeli, V. P., Fabri, L., und Burgess, A. W. (1994) Platelet-Derived Growth-Factor Stimulates the Release of Protein-Kinase-A from the Cell-Membrane, *Journal of Biological Chemistry 269*, 4812-4818.

- 70. Walker, F., Deblaquiere, J., und Burgess, A. W. (1993) Translocation of pp60(C-Src) from the Plasma-Membrane to the Cytosol after Stimulation by Platelet-Derived Growth-Factor, *Journal of Biological Chemistry 268*, 19552-19558.
- 71. Frodin, M., Antal, T. L., Dummler, B. A., Jensen, C. J., Deak, M., Gammeltoft, S., und Biondi, R. M. (2002) A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation, *Embo Journal* 21, 5396-5407.
- 72. Parekh, D. B., Ziegler, W., und Parker, P. J. (2000) Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation, *Embo Journal 19*, 496-503.
- 73. Yang, J., Cron, P., Good, V. M., Thompson, V., Hemmings, B. A., und Barford, D. (2002) Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP, *Nature Structural Biology 9*, 940-944.
- 74. Yang, J., Cron, P., Thompson, V., Good, V. M., Hess, D., Hemmings, B. A., und Barford, D. (2002) Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation, *Molecular Cell 9*, 1227-1240.
- 75. Biondi, R. M., Cheung, P. C. F., Casamayor, A., Deak, M., Currie, R. A., und Alessi, D. R. (2000) Identification of a pocket in the PDK1 kinase domain that interacts with PIF and the C-terminal residues of PKA, *Embo Journal 19*, 979-988.
- 76. Biondi, R. M., und Nebreda, A. R. (2003) Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions, *Biochemical Journal 372*, 1-13.
- 77. Biondi, R. M., Komander, D., Thomas, C. C., Lizcano, J. M., Deak, M., Alessi, D. R., und van Aalten, D. M. F. (2002) High resolution crystal structure of the human PDK1 catalytic domain defines the regulatory phosphopeptide docking site, *Embo Journal* 21, 4219-4228.
- 78. Etchebehere, L. C., VanBemmelen, M. X. P., Anjard, C., Traincard, F., Assemat, K., Reymond, C., und Veron, M. (1997) The catalytic subunit of Dictyostelium cAMPdependent protein kinase - Role of the N-terminal domain and of the C-terminal residues in catalytic activity and stability, *European Journal of Biochemistry 248*, 820-826.
- 79. Batkin, M., Schvartz, I., und Shaltiel, S. (2000) Snapping of the carboxyl terminal tail of the catalytic subunit of PKA onto its core: Characterization of the sites by mutagenesis, *Biochemistry 39*, 5366-5373.
- 80. Whitehouse, S., Feramisco, J. R., Casnellie, J. E., Krebs, E. G., und Walsh, D. A. (1983) Studies on the Kinetic Mechanism of the Catalytic Subunit of the cAMP-Dependent Protein-Kinase, *Journal of Biological Chemistry* 258, 3693-3701.
- 81. Adams, J. A., und Taylor, S. S. (1992) Energetic limits of phosphotransfer in the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase as measured by viscosity experiments, *Biochemistry 31*, 8516-8522.
- 82. Akamine, P., Madhusudan, Wu, J., Xuong, N. H., Eyck, L. F. T., und Taylor, S. S. (2003) Dynamic Features of cAMP-dependent Protein Kinase Revealed by Apoenzyme Crystal Structure, *Journal Of Molecular Biology 327*, 159-171.
- 83. Schwartz, D. E., Tizard, R., und Gilbert, W. (1983) Nucleotide-Sequence of Rous-Sarcoma Virus, *Cell 32*, 853-869.

- 84. Czernilofsky, A. P., Levinson, A. D., Varmus, H. E., Bishop, J. M., Tischer, E., und Goodman, H. M. (1980) Nucleotide-Sequence of an Avian-Sarcoma Virus Oncogene (Src) and Proposed Amino-Acid-Sequence for Gene-Product, *Nature 287*, 198-203.
- 85. Czernilofsky, A. P. (1983) Corrections, *Nature 301*, 736-738.
- 86. Rous, P. (1911) A sarcoma of the fowl transmissible by an agent seperable from the tumor cells, *J. Exp. Med.* 13, 397-411.
- 87. Collett, M. S., und Erikson, R. L. (1978) Protein-Kinase Activity Associated with Avian-Sarcoma Virus Src Gene Product, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 2021-2024.
- 88. Levinson, A. D., Oppermann, H., Levintow, L., Varmus, H. E., und Bishop, J. M. (1978) Evidence That Transforming Gene of Avian-Sarcoma Virus Encodes a Protein-Kinase Associated with a Phosphoprotein, *Cell 15*, 561-572.
- 89. Eckhart, W., Hutchinson, M. A., und Hunter, T. (1979) Activity Phosphorylating Tyrosine in Polyoma T-Antigen Immunoprecipitates, *Cell 18*, 925-933.
- 90. Hunter, T., und Sefton, B. M. (1980) Transforming Gene-Product of Rous-Sarcoma Virus Phosphorylates Tyrosine, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 77, 1311-1315.
- 91. Stehelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J. M., und Vogt, P. K. (1976) DNA Related to Transforming Gene(s) of Avian-Sarcoma Viruses Is Present in Normal Avian DNA, *Nature 260*, 170-173.
- 92. Takeya, T., und Hanafusa, H. (1983) Structure and Sequence of the Cellular Gene Homologous to the RSV Src Gene and the Mechanism for Generating the Transforming Virus, *Cell 32*, 881-890.
- 93. Martin, G. S. (2001) The hunting of the Src, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 467-475.
- 94. Courtneidge, S. A. (2002) Role of Src in signal transduction pathways, *Biochemical Society Transactions* 30, 11-17.
- 95. Haskell, M. D., Slack, J. K., Parsons, J. T., und Parsons, S. J. (2001) c-Src tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor, P190 RhoGAP, and focal adhesion kinase regulates diverse cellular processes, *Chemical Reviews 101*, 2425-2440.
- 96. Thomas, S. M., und Brugge, J. S. (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases, *Annual Review of Cell and Developmental Biology 13*, 513-609.
- 97. Russello, S. V., und Shore, S. K. (2003) SRC in human carcinogenesis, *Frontiers in Bioscience 8*, S1068-S1073.
- 98. Frame, M. C. (2002) Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour, *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer 1602*, 114-130.
- 99. Summy, J. M., und Gallick, G. E. (2003) Src family kinases in tumor progression and metastasis, *Cancer and Metastasis Reviews* 22, 337-358.
- 100. Biscardi, J. S., Tice, D. A., und Parsons, S. J. (1999) c-Src, receptor tyrosine kinases, and human cancer in *Advances in Cancer Research, Vol* 76, 61ff.
- 101. Warmuth, M., Damoiseaux, R., Liu, Y., Fabbro, D., und Gray, N. (2003) Src family kinases: Potential targets for the treatment of human cancer and leukemia, *Current Pharmaceutical Design 9*, 2043-2059.

- 102. Levitzki, A. (1996) SRC as a target for anti-cancer drugs, *Anti-Cancer Drug Design* 11, 175-182.
- 103. Schaller, M. D., Hildebrand, J. D., Shannon, J. D., Fox, J. W., Vines, R. R., und Parsons, J. T. (1994) Autophosphorylation of the Focal Adhesion Kinase, pp125(FAK), Directs SH2 Dependent Binding of pp60(Src), *Molecular and Cellular Biology 14*, 1680-1688.
- 104. Schlaepfer, D. D., und Hunter, T. (1996) Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases, *Molecular and Cellular Biology 16*, 5623-5633.
- 105. Johnson, L. N., Noble, M. E. M., und Owen, D. J. (1996) Active and inactive protein kinases: Structural basis for regulation, *Cell 85*, 149-158.
- 106. Patschinsky, T., Hunter, T., Esch, F. S., Cooper, J. A., und Sefton, B. M. (1982) Analysis of the Sequence of Amino-Acids Surrounding Sites of Tyrosine Phosphorylation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences 79*, 973-977.
- 107. Okada, M., Nada, S., Yamanashi, Y., Yamamoto, T., und Nakagawa, H. (1991) Csk a Protein-Tyrosine Kinase Involved in Regulation of Src Family Kinases, *Journal of Biological Chemistry 266*, 24249-24252.
- 108. Okada, M., und Nakagawa, H. (1989) A Protein Tyrosine Kinase Involved in Regulation of pp60c-Src Function, *Journal of Biological Chemistry 264*, 20886-20893.
- 109. Xu, W. Q., Harrison, S. C., und Eck, M. J. (1997) Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src, *Nature* 385, 595-602.
- 110. Williams, J. C., Wierenga, R. K., und Saraste, M. (1998) Insights into Src kinase functions: structural comparisons, *Trends in Biochemical Sciences 23*, 179-184.
- 111. Xu, W. Q., Doshi, A., Lei, M., Eck, M. J., und Harrison, S. C. (1999) Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism, *Molecular Cell 3*, 629-638.
- 112. Williams, J. C., Weijland, A., Gonfloni, S., Thompson, A., Courtneidge, S. A., Superti-Furga, G., und Wierenga, R. K. (1997) The 2.35 angstrom crystal structure of the inactivated form of chicken Src: A dynamic molecule with multiple regulatory interactions, *Journal of Molecular Biology 274*, 757-775.
- 113. Witucki, L. A., Huang, X., Shah, K., Liu, Y., Kyin, S., Eck, M. J., und Shokat, K. M. (2002) Mutant tyrosine kinases with unnatural nucleotide specificity retain the structure and phospho-acceptor specificity of the wild-type enzyme, *Chemistry & Biology 9*, 25-33.
- 114. Yamaguchi, H., und Hendrickson, W. A. (1996) Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation, *Nature 384*, 484-489.
- 115. Zhu, X. T., Kim, J. L., Newcomb, J. R., Rose, P. E., Stover, D. R., Toledo, L. M., Zhao, H. L., und Morgenstern, K. A. (1999) Structural analysis of the lymphocytespecific kinase Lck in complex with non-selective and Src family selective kinase inhibitors, *Structure with Folding & Design* 7, 651-661.
- 116. Schindler, T., Sicheri, F., Pico, A., Gazit, A., Levitzki, A., und Kuriyan, J. (1999) Crystal structure of Hck in complex with a Src family-selective tyrosine kinase inhibitor, *Molecular Cell 3*, 639-648.

- 117. Sicheri, F., Moarefi, I., und Kuriyan, J. (1997) Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck, *Nature* 385, 602-609.
- 118. Nagar, B., Bornmann, W. G., Pellicena, P., Schindler, T., Veach, D. R., Miller, W. T., Clarkson, B., und Kuriyan, J. (2002) Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571), *Cancer Research 62*, 4236-4243.
- Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P., Miller, W. T., Clarkson, B., und Kuriyan, J. (2000) Structural mechanism for STI-571 inhibition of Abelson tyrosine kinase, *Science 289*, 1938-1942.
- 120. Nagar, B., Hantschel, O., Young, M. A., Scheffzek, K., Veach, D., Bornmann, V., Clarkson, B., Superti-Furga, G., und Kuriyan, J. (2003) Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase, *Cell 112*, 859-871.
- 121. Lamers, M., Antson, A. A., Hubbard, R. E., Scott, R. K., und Williams, D. H. (1999) Structure of the protein tyrosine kinase domain of C-terminal Src kinase (CSK) in complex with staurosporine, *Journal of Molecular Biology 285*, 713-725.
- 122. Young, M. A., Gonfloni, S., Superti-Furga, G., Roux, B., und Kuriyan, J. (2001) Dynamic coupling between the SH2 and SH3 domains of c-Src and Hck underlies their inactivation by C-terminal tyrosine phosphorylation, *Cell 105*, 115-126.
- 123. Harrison, S. C. (2003) Variation on an Src-like theme, Cell 112, 737-740.
- 124. Cowan-Jacob, S. W., Fendrich, G., Liebetanz, J., Fabbro, D., und Manley, P. W. (2003) Crystal structure of unphosphorylated c-Src in complex with an analogue of GleevecTM reveals relative orientations of the SH3, SH2 and kinase domains in the active conformation. *226th ACS National Meeting*, New York, NY
- 125. Schwartzberg, P. L. (1998) The many faces of Src: multiple functions of a prototypical tyrosine kinase, *Oncogene 17*, 1463-1468.
- 126. Resh, M. D. (1994) Myristylation and Palmitylation of Src Family Members the Fats of the Matter, *Cell* 76, 411-413.
- 127. Resh, M. D. (1990) Membrane Interactions of pp60v-Src a Model for Myristylated Tyrosine Protein-Kinases, *Oncogene 5*, 1437-1444.
- 128. Buser, C. A., Sigal, C. T., Resh, M. D., und McLaughlin, S. (1994) Membrane-Binding of Myristylated Peptides Corresponding to the NH2 Terminus of Src, *Biochemistry* 33, 13093-13101.
- 129. Sigal, C. T., Zhou, W. J., Buser, C. A., McLaughlin, S., und Resh, M. D. (1994) Amino-Terminal Basic Residues of Src Mediate Membrane-Binding through Electrostatic Interaction with Acidic Phospholipids, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91*, 12253-12257.
- 130. Fukami, Y., Nagao, T., Iwasaki, T., und Sato, K. (2002) Inhibition and activation of c-Src: the head and tail of a coin, *Pharmacology & Therapeutics 93*, 263-270.
- 131. Fukami, Y., Sato, K., Ikeda, K., Kamisango, K., Koizumi, K., und Matsuno, T. (1993) Evidence for autoinhibitory regulation of the c-src gene product. A possible interaction between the src homology 2 domain and autophosphorylation site, *Journal* of *Biological Chemistry 268*, 1132-40.
- 132. Sato, K., Nagao, T., Kakumoto, M., Kimoto, M., Otsuki, T., Iwasaki, T., Tokmakov, A. A., Owada, K., und Fukami, Y. (2002) Adaptor protein Shc is an isoform-specific

direct activator of the tyrosine kinase c-Src, Journal of Biological Chemistry 277, 29568-76.

- 133. Irby, R. B., Mao, W. G., Coppola, D., Kang, J., Loubeau, J. M., Trudeau, W., Karl, R., Fujita, D. J., Jove, R., und Yeatman, T. J. (1999) Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers, *Nature Genetics 21*, 187-190.
- 134. Cartwright, C. A., Kamps, M. P., Meisler, A. I., Pipas, J. M., und Eckhart, W. (1989) pp60c-Src Activation in Human-Colon Carcinoma, *Journal of Clinical Investigation* 83, 2025-2033.
- 135. Bolen, J. B., Veillette, A., Schwartz, A. M., Deseau, V., und Rosen, N. (1987) Activation of pp60c-Src Protein-Kinase Activity in Human-Colon Carcinoma, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84*, 2251-2255.
- 136. Cartwright, C. A., Coad, C. A., und Egbert, B. M. (1994) Elevated C-Src Tyrosine Kinase-Activity in Premalignant Epithelia of Ulcerative-Colitis, *Journal of Clinical Investigation 93*, 509-515.
- 137. Cartwright, C. A., Meisler, A. I., und Eckhart, W. (1990) Activation of the pp60c-Src Protein-Kinase Is an Early Event in Colonic Carcinogenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 558-562.
- 138. Egan, C., Pang, A., Durda, D., Cheng, H. C., Wang, J. H., und Fujita, D. J. (1999) Activation of Src in human breast tumor cell lines: elevated levels of phosphotyrosine phosphatase activity that preferentially recognizes the Src carboxy terminal negative regulatory tyrosine 530, *Oncogene 18*, 1227-1237.
- 139. Kumble, S., Omary, M. B., Cartwright, C. A., und Triadafilopoulos, G. (1997) Src activation in malignant and premalignant epithelia of Barrett's esophagus, *Gastroenterology* 112, 348-356.
- 140. Lutz, M. P., Esser, I. B. S., Flossmann-Kast, B. B. M., Vogelmann, R., Luhrs, H., Friess, H., Buchler, M. W., und Adler, G. (1998) Overexpression and activation of the tyrosine kinase Src in human pancreatic carcinoma, *Biochemical and Biophysical Research Communications 243*, 503-508.
- 141. Mazurenko, N. N., Kogan, E. A., Zborovskaya, I. B., und Kisseljov, F. L. (1992) Expression of pp60c-Src in Human Small-Cell and Non-Small-Cell Lung Carcinomas, *European Journal of Cancer 28A*, 372-377.
- 142. Muthuswamy, S. K., und Muller, W. J. (1994) Activation of the Src Family of Tyrosine Kinases in Mammary Tumorigenesis in *Advances in Cancer Research, Vol* 64, 111-123.
- 143. Rosen, N., Bolen, J. B., Schwartz, A. M., Cohen, P., Deseau, V., und Israel, M. A. (1986) Analysis of pp60c-Src Protein-Kinase Activity in Human-Tumor Cell-Lines and Tissues, *Journal of Biological Chemistry 261*, 3754-3759.
- 144. van Oijen, M., Rijksen, G., ten Broeck, F. W., und Slootweg, P. J. (1998) Overexpression of c-Src in areas of hyperproliferation in head and neck cancer, premalignant lesions and benign mucosal disorders, *Journal of Oral Pathology & Medicine 27*, 147-152.
- 145. Verbeek, B. S., Vroom, T. M., AdriaansenSlot, S. S., OttenhoffKalff, A. E., Geertzema, J. G. N., Hennipman, A., und Rijksen, G. (1996) c-Src protein expression is increased in human breast cancer. An immunohistochemical and biochemical analysis, *Journal of Pathology 180*, 383-388.

- 146. Metcalf, C. A., van Schravendijk, M. R., Dalgarno, D. C., und Sawyer, T. K. (2002) Targeting protein kinases for bone disease: Discovery and development of Src inhibitors, *Current Pharmaceutical Design 8*, 2049-2075.
- 147. Missbach, M., Jeschke, M., Feyen, J., Muller, K., Glatt, M., Green, J., und Susa, M. (1999) A novel inhibitor of the tyrosine kinase Src suppresses phosphorylation of its major cellular substrates and reduces bone resorption in vitro and in rodent models in vivo, *Bone 24*, 437-449.
- 148. Susa, M., Missbach, M., und Green, J. (2000) Src inhibitors: drugs for the treatment of osteoporosis, cancer or both?, *Trends in Pharmacological Sciences 21*, 489-495.
- 149. Leavitt, S., und Freire, E. (2001) Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry, *Current Opinion in Structural Biology 11*, 560-566.
- 150. Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F., und Lin, L. N. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter, *Anal Biochem* 179, 131–135.
- 151. Böhm, H. J., Klebe, G., und Kubinyi, H. (1996) Wirkstoffdesign Der Weg zum Arzneimittel, Spektrum Akademischer Verlag.
- 152. Cohen, P. (2002) Protein kinases the major drug targets of the twenty-first century?, *Nature Reviews Drug Discovery 1*, 309-315.
- 153. Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S., und Sasaki, Y. (1984) Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C, *Biochemistry* 23, 5036-5041.
- 154. Omura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchiya, H., Takahashi, Y., und Masuma, R. (1977) New Alkaloid Am-2282 of Streptomyces Origin Taxonomy, Fermentation, Isolation and Preliminary Characterization, *Journal of Antibiotics 30*, 275-282.
- 155. Oka, S., Kodama, M., Takeda, H., Tomizuka, N., und Suzuki, H. (1986) Staurosporine, a Potent Platelet-Aggregation Inhibitor from a Streptomyces Species, *Agricultural and Biological Chemistry* 50, 2723-2727.
- 156. Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M., und Tomita, F. (1986) Staurosporine, a Potent Inhibitor of Phospholipid/Ca++Dependent Protein-Kinase, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 135, 397-402.
- Kulanthaivel, P., Hallock, Y., Boros, C., Hamilton, S. M., Janzen, W. P., Ballas, L. M., Loomis, C. R., Jiang, J. B., Katz, J. B., Steiner, J. R., und Clardy, J. (1993) Balanol: A Novel and Potent Inhibitor of Protein Kinase C from the Fungus *Verticillium balanoides.*, J. Am. Chem. Soc. 115, 6452-6453.
- 158. Ohshima, S., Yanagisawa, M., Katoh, A., Fujii, T., Sano, T., Matsukuma, S., Furumai, T., Fujiu, M., Watanabe, K., Yokose, K., und et al. (1994) Fusarium merismoides Corda NR 6356, the source of the protein kinase C inhibitor, azepinostatin. Taxonomy, yield improvement, fermentation and biological activity, J. Antibiot. (Tokyo) 47, 639-47.
- 159. Chabaud-Riou, M., und Firestein, G. S. (2004) Expression and activation of mitogenactivated protein kinase kinases-3 and -6 in rheumatoid arthritis, *American Journal of Pathology 164*, 177-184.

- Lee, J. C., Kumar, S., Griswold, D. E., Underwood, D. C., Votta, B. J., und Adams, J. L. (2000) Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy, *Immunopharmacology* 47, 185-201.
- 161. Methods in Enzymology (1997) Vol 276, Part A, Academic Press.
- 162. Methods in Enzymology(1997) Vol 277, Part B, Academic Press.
- 163. Drenth, J. (1999) *Principles of Protein X-ray Crystallography*, Springer Verlag Publishing.
- 164. Giacovazzo, C. M., H.L. Viterbo, D. (1992) Fundamentals of Crystallography, Oxford Univ. Press.
- 165. Blundell, T. L., und Johnson, L. N. (1976) *PROTEIN CRYSTALLOGRAPHY*, Academic Press.
- 166. Huang, X., Begley, M., Morgenstern, K. A., Gu, Y., Rose, P., Zhao, H. L., und Zhu, X. T. (2003) Crystal structure of an inactive Akt2 kinase domain, *Structure 11*, 21-30.
- 167. Nowakowski, J., Cronin, C. N., McRee, D. E., Knuth, M. W., Nelson, C. G., Pavletich, N. P., Rogers, J., Sang, B. C., Scheibe, D. N., Swanson, R. V., und Thompson, D. A. (2002) Structures of the cancer-related aurora-A, FAK, and EphA2 protein kinases from nanovolume crystallography, *Structure 10*, 1659-1667.
- 168. Sambrook, J., und Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, third ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 169. Wiemann, S., Kinzel, V., und Pyerin, W. (1992) Cloning of the C alpha catalytic subunit of the bovine cAMP- dependent protein kinase, *Biochimica Et Biophysica Acta 1171*, 93-96.
- 170. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72, 248-54.
- 171. Gill, S. C., und Vonhippel, P. H. (1989) Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino-Acid Sequence Data, *Analytical Biochemistry 182*, 319-326.
- 172. McPherson, A. (1985) Crystallization of Macromolecules General-Principles, *Methods in Enzymology 114*, 112-120.
- 173. Jancarik, J., und Kim, S. H. (1991) Sparse-Matrix Sampling a Screening Method for Crystallization of Proteins, *Journal of Applied Crystallography 24*, 409-411.
- 174. Cudney, B., Patel, S., Weisgraber, K., und Newhouse, Y. (1994) Screening and Optimization Strategies for Macromolecular Crystal-Growth, *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 50, 414-4123.
- 175. Stura, E. A., und Wilson, I. A. (1991) Applications of the Streak Seeding Technique in Protein Crystallization, *Journal of Crystal Growth 110*, 270-282.
- 176. Bergfors, T. (2003) Seeds to crystals, Journal of Structural Biology 142, 66-76.
- 177. Moreno, A., und Soriano-Garcia, M. (1999) Crystal-growth kinetics of protein single crystals along capillary tubes in the gel-acupuncture technique, *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography 55*, 577-580.
- 178. Chayen, N. E. (1999) Recent advances in methodology for the crystallization of biological macromolecules, *Journal of Crystal Growth 199*, 649-655.

- 179. Darcy, A., Elmore, C., Stihle, M., und Johnston, J. E. (1996) A novel approach to crystallising proteins under oil, *Journal of Crystal Growth 168*, 175-180.
- 180. Chayen, N. E. (1997) The role of oil in macromolecular crystallization, *Structure 5*, 1269-1274.
- 181. Leslie, A. G. W. (1992) Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data, *Joint CCP4* + *ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography No. 26*.
- 182. Kabsch, W. (1988) Automatic-Indexing of Rotation Diffraction Patterns, *Journal of Applied Crystallography 21*, 67-71.
- 183. Huber, R. (1965) Die Automatisierte Faltmolekülmethode, *Acta Crystallographica 19*, 353-356.
- 184. Vagin, A., und Teplyakov, A. (1997) MOLREP: an automated program for molecular replacement, *Journal of Applied Crystallography 30*, 1022-1025.
- 185. Navaza, J. (1994) Amore an Automated Package for Molecular Replacement, *Acta Crystallographica Section A 50*, 157-163.
- 186. Bailey, S. (1994) The CCP4 Suite Programs for Protein Crystallography, *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography 50*, 760-763.
- 187. Potterton, E., Briggs, P., Turkenburg, M., und Dodson, E. (2003) A graphical user interface to the CCP4 program suite, *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 59, 1131-1137.
- 188. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., und Dodson, E. J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method, *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 53, 240-255.
- 189. Gerber, P. R., und Muller, K. (1995) Mab, a Generally Applicable Molecular-Force Field for Structure Modeling in Medicinal Chemistry, *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 9, 251-268.
- 190. Turk, D. (1992) Weiterentwicklung eines Programms fuer Molekuelgraphik und Elektrondichte-Manipulation und seine Anwendung auf verschiedene Protein-Strukturaufklaerungen, Dissertation, Technische Universität, München
- 191. Seifert, M. H. J. (2002) NMR-spektroskopische Studien zur strukturellen Dynamik des Grün-fluoreszierenden Proteins und der cAMP-abhängigen Protein Kinase, Dissertation, Technische Universität, München
- 192. Ishizaki, T., Maekawa, M., Fujisawa, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Fujita, A., Watanabe, N., Saito, Y., Kakizuka, A., Morii, N., und Narumiya, S. (1996) The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase, *Embo Journal 15*, 1885-1893.
- 193. Takahashi, N., Tuiki, H., Saya, H., und Kaibuchi, K. (1999) Localization of the gene coding for ROCK II Rho kinase on human chromosome 2p24, *Genomics* 55, 235-237.
- 194. Engh, R. A., Girod, A., Kinzel, V., Huber, R., und Bossemeyer, D. (1996) Crystal structures of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in complex with isoquinolinesulfonyl protein kinase inhibitors H7, H8, and H89. Structural implications for selectivity, *J. Biol. Chem.* 271, 26157-64.
- 195. Sasaki, Y., Suzuki, M., und Hidaka, H. (2002) The novel and specific Rho-kinase inhibitor (S)-(+)-2-methyl-1- [(4-methyl-5-isoquinoline)sulfonyl]-homopiperazine as a

probing molecule for Rho-kinase-involved pathway, *Pharmacology & Therapeutics* 93, 225-232.

- 196. Ikenoya, M., Hidaka, H., Hosoya, T., Suzuki, M., Yamamoto, N., und Sasaki, Y. (2002) Inhibition of Rho-kinase-induced myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) phosphorylation in human neuronal cells by H-1152, a novel and specific Rho-kinase inhibitor, *Journal Of Neurochemistry 81*, 9-16.
- 197. Ono-Saito, N., Niki, I., und Hidaka, H. (1999) H-series protein kinase inhibitors and potential clinical applications, *Pharmacology & Therapeutics* 82, 123-131.
- 198. Utsunomiya, T., Satoh, S., Ikegaki, I., Toshima, Y., Asano, T., und Shimokawa, H. (2001) Antianginal effects of hydroxyfasudil, a Rho-kinase inhibitor, in a canine model of effort angina, *British Journal of Pharmacology 134*, 1724-1730.
- 199. Satoh, S., Ikegaki, I., Asano, T., und Shimokawa, H. (2001) Antiischemic properties of fasudil in experimental models of vasospastic angina, *Japanese Journal of Pharmacology* 87, 34-40.
- 200. Shimokawa, H., Morishige, K., Miyata, K., Kandabashi, T., Eto, Y., Ikegaki, I., Asano, T., Kaibuchi, K., und Takeshita, A. (2001) Long-term inhibition of Rho-kinase induces a regression of arteriosclerotic coronary lesions in a porcine model in vivo, *Cardiovascular Research 51*, 169-177.
- 201. Yamamoto, Y., Ikegaki, I., Sasaki, Y., und Uchida, T. (2000) The protein kinase inhibitor fasudil protects against ischemic myocardial injury induced by endothelin-1 in the rabbit, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 35, 203-211.
- 202. Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., und Kaibuchi, K. (1996) Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase), *Journal Of Biological Chemistry 271*, 20246-20249.
- 203. Amano, M., Mukai, H., Ono, Y., Chihara, K., Matsui, T., Hamajima, Y., Okawa, K., Iwamatsu, A., und Kaibuchi, K. (1996) Identification of a putative target for Rho as the serine- threonine kinase protein kinase N, *Science 271*, 648-650.
- 204. Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M., und Cohen, P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors, *Biochemical Journal 351*, 95-105.
- 205. Orellana, S. A., Amieux, P. S., Zhao, X., und McKnight, G. S. (1993) Mutations in the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase interfere with holoenzyme formation without disrupting inhibition by protein kinase inhibitor, *Journal Of Biological Chemistry 268*, 6843-6846.
- 206. Gibbs, C. S., Knighton, D. R., Sowadski, J. M., Taylor, S. S., und Zoller, M. J. (1992) Systematic mutational analysis of cAMP-dependent protein kinase identifies unregulated catalytic subunits and defines regions important for the recognition of the regulatory subunit, *Journal Of Biological Chemistry* 267, 4806-4814.
- 207. Ishizaki, T., Uehata, M., Tamechika, I., Keel, J., Nonomura, K., Maekawa, M., und Narumiya, S. (2000) Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of Rho-associated kinases, *Molecular Pharmacology* 57, 976-983.
- 208. Sinnett-Smith, J., Lunn, J. A., Leopoldt, D., und Rozengurt, E. (2001) Y-27632, an inhibitor of Rho-associated kinases, prevents tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin induced by bombesin: dissociation from tyrosine phosphorylation of p130(CAS), *266*, 292-302.

- 209. Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M., und Narumiya, S. (1997) Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension, *Nature 389*, 990-994.
- 210. Itoh, K., Yoshioka, K., Akedo, H., Uehata, M., Ishizaki, T., und Narumiya, S. (1999) An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells, *Nature Medicine 5*, 221-225.
- 211. Setyawan, J., Koide, K., Diller, T. C., Bunnage, M. E., Taylor, S. S., Nicolaou, K. C., und Brunton, L. L. (1999) Inhibition of protein kinases by balanol: Specificity within the serine/threonine protein kinase subfamily, *Molecular Pharmacology 56*, 370-376.
- 212. Koide, K., Bunnage, M. E., Gomez Paloma, L., Kanter, J. R., Taylor, S. S., Brunton, L. L., und Nicolaou, K. C. (1995) Molecular design and biological activity of potent and selective protein kinase inhibitors related to balanol, *Chem. Biol.* 2, 601-608.
- 213. Gustafsson, A. B., und Brunton, L. L. (1999) Differential and selective inhibition of protein kinase A and protein kinase C in intact cells by balanol congeners, *Mol. Pharmacol.* 56, 377-82.
- Lampe, J. W., Biggers, C. K., Defauw, J. M., Foglesong, R. J., Hall, S. E., Heerding, J. M., Hollinshead, S. P., Hu, H., Hughes, P. F., Jagdmann, G. E., Jr., Johnson, M. G., Lai, Y. S., Lowden, C. T., Lynch, M. P., Mendoza, J. S., Murphy, M. M., Wilson, J. W., Ballas, L. M., Carter, K., Darges, J. W., Davis, J. E., Hubbard, F. R., und Stamper, M. L. (2002) Synthesis and protein kinase inhibitory activity of balanol analogues with modified benzophenone subunits, *J. Med. Chem.* 45, 2624-43.
- 215. Jagdmann, G. E., Defauw, J. M., Lampe, J. W., Darges, J. W., und Kalter, K. (1996) Potent and selective PKC inhibitory 5-membered ring analogs of balanol with replacement of the carboxamide moiety, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6, 1759-1764.
- 216. Hall, S. E., Ballas, L. M., Kulanthaivel, P., Boros, C., Jiang, J. B., Jagdmann, G. E., Jr., Lai, Y.-S., Biggers, C. K., Hu, H., und et al. (1994) Preparation of balanoids as protein kinase C inhibitors. *PCT Int. Appl.*, (Nichols, Gina M., USA; Sphinx Pharmaceuticals Corporation). WO9420062.
- 217. Hu, H., Jagdmann, G. E., Jr., und Mendoza, J. S. (1995) Preparation of substituted fused and bridged bicyclic compound protein kinase C inhibitors. *PCT Int. Appl.*, (Lilly, Eli, and Co., USA). WO9530640.
- 218. Barbier, P., Stadlwieser, J., und Taylor, S. (1997) Novel azepanes and their ring homologs for therapy and prophylaxis of protein kinase mediated diseases. *PCT Int. Appl.*, (F. Hoffmann-La Roche Ag, Schweiz). WO9702249.
- 219. Barbier, P., Huber, I., Schneider, F., Stadlwieser, J., und Taylor, S. (1995) Preparation of 3-amino/hydroxy-4-[4-benzoylphenylcarboxylamino/oxy]azepine and homolog protein kinase inhibitors. *Eur. Pat. Appl.*, (F. Hoffmann-La Roche AG, Schweiz). EP663393.
- 220. Masjost, B., Schumacher, R., und Friebe, W.-G. (2003) Novel azepane derivatives in *PCT Int. Appl.*, (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland). WO 03/076429.
- 221. Breitenlechner, C.B., Wegge, T., Berillon, L., Graul, K., Marzenell, K., Friebe, W.-G., Thomas, U., Schumacher, R., Huber, R., Engh, R. A., und Masjost, B. (2004) Structure-based optimization of novel azepane derivatives as PKB inhibitors, *Journal* of Medicinal Chemistry 47, 1375-1390.
- 222. Lerner, C., Ruf, A., Gramlich, V., Masjost, B., Zurcher, G., Jakob-Roetne, R., Borroni, E., und Diederich, F. (2001) X-ray crystal structure of a bisubstrate inhibitor bound to the enzyme catechol-O-methyltransferase: A dramatic effect of inhibitor preorganization on binding affinity, *Angewandte Chemie-International Edition 40*, 4040ff.
- 223. Gassel, M., Breitenlechner, C. B., Rüger, P., Jucknischke, U., Schneider, T., Huber, R., Bossemeyer, D., und Engh, R. A. (2003) Mutants of Protein Kinase A that Mimic the ATP-binding Site of Protein Kinase B (AKT), *Journal of Molecular Biology 329*, 1021-1034.
- 224. Akamine, P., Madhusudan, Brunton, L. L., Ou, H. D., Canaves, J. M., Xuong, N.-h., und Taylor, S. S. (2004) Balanol Analogues Probe Specificity Determinants and the Conformational Malleability of the Cyclic 3',5'-Adenosine Monophosphate-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit, *Biochemistry* 43, 85-96.
- 225. Defauw, J. M., Murphy, M. M., Jagdmann, G. E., Jr., Hu, H., Lampe, J. W., Hollinshead, S. P., Mitchell, T. J., Crane, H. M., Heerding, J. M., Mendoza, J. S., Davis, J. E., Darges, J. W., Hubbard, F. R., und Hall, S. E. (1996) Synthesis and protein kinase C inhibitory activities of acyclic balanol analogs that are highly selective for protein kinase C over protein kinase A, *Journal of Medicinal Chemistry 39*, 5215-27.
- 226. Lai, Y. S., Mendoza, J. S., Jagdmann, G. E., Jr., Menaldino, D. S., Biggers, C. K., Heerding, J. M., Wilson, J. W., Hall, S. E., Jiang, J. B., Janzen, W. P., und Ballas, L. M. (1997) Synthesis and protein kinase C inhibitory activities of balanol analogs with replacement of the perhydroazepine moiety, *Journal of Medicinal Chemistry 40*, 226-35.
- 227. Gescher, A. (2000) Staurosporine analogues pharmacological toys or useful antitumour agents?, *Critical Reviews In Oncology/Hematology 34*, 127-135.
- 228. Jirousek, M. R., Gillig, J. R., Gonzalez, C. M., Heath, W. F., McDonald, J. H., 3rd, Neel, D. A., Rito, C. J., Singh, U., Stramm, L. E., Melikian-Badalian, A., Baevsky, M., Ballas, L. M., Hall, S. E., Winneroski, L. L., und Faul, M. M. (1996) (S)-13-[(dimethylamino)methyl]-10,11,14,15-tetrahydro-4,9:16, 21- dimetheno-1H, 13Hdibenzo[e,k]pyrrolo[3,4-h][1,4,13]oxadiazacyclohexadecene-1,3(2H)-d ione (LY333531) and related analogues: isozyme selective inhibitors of protein kinase C beta, *Journal of Medicinal Chemistry 39*, 2664-71.
- 229. Gaßel, M., Breitenlechner, C. B., Engh, R. A., und Bossemeyer, D. (2003) Crystal structure of an altered catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in complex with the Pkc-kinase inhibitor Bisindolyl-Maleimide 2 in two different conformations implications for selectivity, *Cellular & Molecular Biol. Lett.* 8, 582.
- 230. Lew, J., Taylor, S. S., und Adams, J. A. (1997) Identification of a partially ratedetermining step in the catalytic mechanism of cAMP-dependent protein kinase: A transient kinetic study using stopped-flow fluorescence spectroscopy, *Biochemistry* 36, 6717-6724.
- 231. Zhou, J., und Adams, J. A. (1997) Participation of ADP dissociation in the ratedetermining step in cAMP-dependent protein kinase, *Biochemistry* 36, 15733-15738.
- 232. Kraker, A. J., Hartl, B. G., Amar, A. M., Barvian, M. R., Showalter, H. D. H., und Moore, C. W. (2000) Biochemical and cellular effects of c-Src kinase-selective pyrido 2,3-d pyrimidine tyrosine kinase inhibitors, *Biochemical Pharmacology* 60, 885-898.

- 233. Gray, N. S., Wodicka, L., Thunnissen, A., Norman, T. C., Kwon, S. J., Espinoza, F. H., Morgan, D. O., Barnes, G., LeClerc, S., Meijer, L., Kim, S. H., Lockhart, D. J., und Schultz, P. G. (1998) Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors, *Science 281*, 533-538.
- 234. Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M., und Cohen, P. (2003) The specificities of protein kinase inhibitors: an update, *Biochemical Journal 371*, 199-204.
- 235. Knockaert, M., Gray, N., Damiens, E., Chang, Y. T., Grellier, P., Grant, K., Fergusson, D., Mottram, J., Soete, M., Dubremetz, J. F., Le Roch, K., Doerig, C., Schultz, P. G., und Meijer, L. (2000) Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors, *Chemistry & Biology* 7, 411-422.
- 236. Knockaert, M., und Meijer, L. (2002) Identifying in vivo targets of cyclin-dependent kinase inhibitors by affinity chromatography, *Biochemical Pharmacology* 64, 819-825.
- 237. Villerbu, N., Gaben, A. M., Redeuilh, G., und Mester, J. (2002) Cellular effects of purvalanol A: A specific inhibitor of cyclin-dependent kinase activities, *International Journal of Cancer* 97, 761-769.