

**NMR-spektroskopische Untersuchungen zur Bindung
kleiner Moleküle an das Zellzyklusprotein CDC25A**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim

Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe - Universität
in Frankfurt am Main

von

Max Stadler
aus Berlin

Frankfurt am Main

2010

(D30)

Dem Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation vorgelegt

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Gutachter: Prof. Dr. Harald Schwalbe, Prof. Dr. Volker Dötsch

Datum der Disputation: 11.2.2011

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ZUSAMMENFASSUNG	VII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Zellbiologische Bedeutung von CDC25A	1
1.1.1 Regulierung der Proteinaktivität.....	1
1.1.2 Zellbiologische Bedeutung der Tyrosinphosphorylierung.....	2
1.1.3 Aufgabe und Regulation von CDC25A.....	7
1.2 Struktur und Funktion von CDC25A.....	13
1.2.1 Struktur	13
1.2.2 Funktion	18
1.3 NMR-Methoden	25
1.3.1 Grundlagen	25
1.3.2 Durchführung von NMR-Experimenten	30
1.3.3 1D Experimente	30
1.3.4 2D Experimente	31
1.3.5 3D Experimente	33
2 MATERIAL UND METHODEN	37
2.1 Molekularbiologische Methoden	37
2.1.1 Gelelektrophoretische Methoden	37
2.1.2 Klonierung.....	38
2.1.3 Proteinexpression	39
2.1.4 Proteinaufreinigung	40
2.1.5 Pufferoptimierung.....	42
2.2 Enzymaktivität	43
2.3 NMR-Spektroskopie.....	43
2.3.1 Probenvorbereitung, Spektrometer, Auswertung	43
2.3.2 1D Spektren.....	44
2.3.3 2D Experimente	45
2.3.4 3D Experimente	45
3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	49
3.1 Molekularbiologie	49

3.1.1	Erstellung der Proteinkonstrukte	49
3.1.2	Expressionsoptimierung.....	50
3.1.3	Stabilität während der Aufreinigung.....	52
3.1.4	Stabilität der NMR-Probe.....	57
3.1.5	Enzymaktivitätstests und Inhibitoren	59
3.2	NMR-Experimente.....	62
3.2.1	1D-NMR-Experimente.....	62
3.2.2	2D-NMR-Experimente.....	68
3.2.3	3D-NMR-Experimente.....	82
ANHANG	89
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	105
LITERATURVERZEICHNIS	111
DANKSAGUNG	121
PUBLIKATIONEN	123
CURRICULUM VITAE	125

Abkürzungsverzeichnis

Alle SI-Einheiten werden mit den üblichen Abkürzungen benannt. Die Aminosäuren werden mit dem üblichen 3-Buchstaben-Code bezeichnet.

°C	Temperatur in Grad Celsius
1D, 2D, ..., nD	ein-, zweidimensional, ..., n-dimensional
AA	Aminosäure (Amino Acid)
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches AdenosinMonoPhosphat
CARA	Software zur Auswertung von NMR-Spektren (Computer Aided Resonance Assignment)
CDC25A	Cell division cycle 25 homolog A (<i>S. pombe</i>)
CDC25A_kat	Katalytische Domäne von CDC25A
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kalbsmagen (Calf Intestinal Phosphatase)
CSP	Veränderungen der chemischen Verschiebung (Chemical Shift Perturbation)
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DesoxyriboNucleic Acid)
DTT	DiThioThreitol
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-Sulfonsäure
ϵ	Molarer Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HSQC	heteronukleare Einquantenkohärenz (Heteronuclear SingleQuantum Coherence)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kB	Kilobasenpaare
L	Liter
LB	Luria-Bertani Medium
MW	Molekulargewicht (Molecular Weight)
MWCO	Molekulargewichts-Ausschlussgrenze für die Passage durch Membranen (Molecular Weight Cut-Off)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure (Nickel-NitriloTriAcetic acid)
NMR	kernmagnetische Resonanz (Nuclear Magnetic Resonance)
OD ₆₀₀	Extinktion bei 600 nm
p.a.	pro analysi

PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H-Ionen-Aktivität
pI	isoelektrischer Punkt
pNPP	<i>para</i> -NitroPhenylPhosphat
ppm	parts per million
pThr	phospho-Threonin
PTK	Proteintyrosinkinase
PTP	Proteintyrosinphosphatase
pTyr	phospho-Tyrosin
rpm	Umdrehungszahl pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-PolyAcrylamidGelElektrophorese
s.u.	siehe unten
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TROSY	Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy
ü.N.	über Nacht
UV	ultra-violett
x	fach
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Viele verschiedene Funktionen der Zelle werden durch posttranslationale Modifikationen von Proteinen reguliert. Die reversible Phosphorylierung der OH-Gruppen der Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin ist eine der Möglichkeiten die Aktivität von Proteinen an- und abzuschalten und Interaktion mit Bindungspartnern zu ermöglichen oder zu verhindern. Die Phosphatase CDC25A übernimmt eine zentrale Rolle in der Steuerung des Zellzyklus, unterliegt selbst wiederum einer differenzierten Kontrolle durch Änderung des Expressionslevel, Phosphorylierung und Lokalisation innerhalb der Zelle. Da eine Überfunktion von CDC25A mit einer Vielzahl von verschiedenen Krebserkrankungen assoziiert ist, wird die Entwicklung starker und selektiver Inhibitoren, die auch *in vivo* wirksam sind, vorangetrieben. Die strukturellen Grundlagen selektiver Inhibition sind allerdings noch unzureichend erforscht.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Grundlagen für eine erfolgreiche Durchführung von NMR-Experimenten gelegt, für die Proteinproben mit hoher Konzentration und Langzeitstabilität benötigt werden. CDC25A kann nicht in der vollen Länge exprimiert werden und wäre als Vollkonstrukt auch zu groß, um effektiv per NMR untersuchbar zu sein. Durch Erzeugung diverser Konstrukte der katalytischen Domäne von CDC25A konnte ein Expressionslevel erreicht werden, der die Erzeugung ausreichender Mengen an Protein praktikabel macht. Neben des oftmals geringen Expressionslevels ist ein weiteres Problem bei NMR-spektroskopischen Untersuchungen vieler Phosphatasen deren geringe Stabilität während der Aufreinigung und in der endgültigen Probe. Durch Optimierung der Pufferbedingungen für den Zellaufschluss in Bezug auf pH-Wert, Salzkonzentration und Art des Kations per „Incomplete Factorial Design“ konnte die Ausbeute an löslichem Protein erheblich gesteigert werden. Die Verwendung dieser Pufferbedingungen während der ersten Aufreinigungsschritte verminderte auch die Tendenz des Proteins während der Chromatografie auszufallen. Die Zusammensetzung des Puffers für die endgültige NMR-Probe wurde schließlich durch das aus der Kristallografie entlehnte Verfahren der Dampfdiffusion ebenso in Hinblick auf pH-Wert, Salzkonzentration und Art des Anions optimiert.

Unter diesen optimierten Pufferbedingungen wurde die katalytische Aktivität des Proteinkonstrukts anhand der Hydrolyse von para-Nitrophenylphosphat nachgewiesen. Acht Substanzen wurden auf Inhibition dieser katalytischen Aktivität getestet. Das natürliche Substrat Phosphotyrosin zeigte eine kompetitive Hemmung, zwei starke und ein schwacher Inhibitor zeigten entsprechend verminderte Reaktionsraten. Von den restlichen 4 Substanzen (Inhibitoren anderer Protein-Tyrosin-Phosphatasen und strukturelle Verwandte) zeigten 3 weitere eine starke Wirkung. Diese hohe Promiskuität gegenüber Inhibitoren stellt ein großes Problem für die strukturgetriebene Wirkstoffentwicklung bei CDC25A und generell aller Phosphatasen dar.

Nach Erhalt der fertigen Proben zeigten erste 2D-NMR-Spektren eine geringer als zu erwartende Zahl von Signalen und starke Überlappungen der sichtbaren Signale. Um auszuschließen, dass Dimerisierung oder unspezifische Aggregation hierfür verantwortlich sind, wurden DOSY-Spektren gemessen. Aus der Eigendiffusionsrate ergibt sich ein hydrodynamischer Radius, der mit durch HYDROPRO simulierten Werten übereinstimmt und sich deutlich von dem des putativen Dimers absetzt. Daher wird davon ausgegangen, dass die Signalverluste im NMR nicht durch Dimerisierung oder Aggregation ausgelöst werden. Um die Bindung von Inhibitoren auch durch NMR-Spektroskopie nachzuweisen, wurden Saturation-Transfer-Difference-Experimente (STD) durchgeführt. In diesen war aber sowohl für das natürliche Substrat Phosphotyrosin als auch für alle im Enzymtest aktiven Inhibitoren kein Effekt nachweisbar. Dies weist auf eine sehr hohe k_{off} -Rate der Bindung an das Protein hin oder auf eine irreversible chemische Modifikation des aktiven Zentrums, die bis zum Zeitpunkt der Messung bereits abgeschlossen war.

Für die strukturbasierte Wirkstoffentwicklung werden spezifische Interaktionspunkte auf der Proteinoberfläche gesucht. Hierfür wurden ^{15}N -HSQC-Spektren mit und ohne Bindungspartner gemessen und die Veränderungen der chemischen Verschiebung bestimmt („chemical shift perturbation“). Es konnten für Phosphotyrosin und die beiden starken Inhibitoren BN82002 und NSC663284 signifikante Veränderungen nachgewiesen werden. Für alle drei Moleküle gab es sowohl komplett einzigartige Veränderungen als auch paarweise übereinstimmende als auch ein Signal das für alle 3 übereinstimmt. Neben den Inhibitoren wurden drei Peptide auf spezifische Interaktion getestet. Das erste entspricht der Zielsequenz des natürlichen Substrats CDK, die anderen beiden sind Teile der Sequenz von CDK an einer nachgewiesenen als auch einer putativen sekundären Interaktionsfläche der beiden Proteine. Auch für die drei Peptide konnten wie für die Inhibitoren individuelle als auch übereinstimmende Signalveränderungen nachgewiesen werden.

Als Voraussetzung für die Bestimmung der Oberflächenkontakte, die für die spezifische Bindung von Substrat, Inhibitoren und Interaktionspeptiden nötig sind, wird eine Zuordnung der Signale des ^{15}N -HSQC-Spektrums zu den Aminosäureresten des Proteins benötigt. Hierzu wurden 3D-Tripelresonanz-NMR-Experimente an ^{15}N , ^{13}C -markierten Proben (zusätzlich auch noch ^2H -markierte Proben zur Unterdrückung von Relaxationseffekten) durchgeführt. Um die Zuordnung zu unterstützen wurden außerdem Proben mit individuell ^{15}N -markierten Aminosäuren hergestellt, um einem Signal im HSQC zumindest den Typ der Aminosäure zuordnen zu können. Aufgrund der trotz Pufferoptimierung, Deuterierung des Proteins und verringerter Signalüberlagerung in den Spektren der individuell markierten Proben zu geringer Anzahl an Signalen konnten nur kurze Bereiche der Aminosäuresequenz zugeordnet werden. Aufgrund dieser Basis konnte kein aussagekräftiges Mapping erzielt werden.

1 Einleitung

1.1 Zellbiologische Bedeutung von CDC25A

1.1.1 Regulierung der Proteinaktivität

Während der Lebensdauer einer Zelle muss die Aktivität der verschiedenen Proteine permanent moduliert werden, um sich wandelnden Bedürfnissen anpassen und verschiedene Signale verarbeiten zu können. Die Aktivität von Proteinen unterscheidet sich von Zelltyp zu Zelltyp, variiert während des Durchlaufens des Zellzyklus und muss auf Grund von extrazellulären Einflüssen angepasst werden.

Eine grundsätzliche Art, die Aktivität eines Proteins zu kontrollieren, ist die Variation der Proteinkonzentration. Durch deren Erhöhung steigt automatisch die Aktivität. So reagieren Mikroorganismen auf eine Temperaturerhöhung durch verstärkte Synthese von „heat-shock“-Proteinen oder stellen bei Veränderung des Nährstoffangebots die für die entsprechenden Stoffwechselwege benötigten Enzyme bereit. Die Kontrolle der Proteinkonzentration kann auf der Ebene der Transkription und der Translation erfolgen, in beiden Fällen durch Modulation der Synthesegeschwindigkeit von mRNA bzw. Protein, als auch der Lebensdauer. So kann der Level an Aktivität durch Zusammenwirken dieser Mechanismen schnell angepasst werden.

Die Aktivierung von Proteinen durch Bindung von kleinen Molekülen oder anderen Proteinen ist sehr typisch in der Signaltransduktion. Ein Beispiel dafür ist das aufgrund eines Stimulus von außen durch die Adenylatzyklase freigesetzte cAMP, das durch Bindung an die Protein Kinase A diese aktiviert. Ein Beispiel aus dem Zellzyklus sind die CDKs (cyclin-dependent kinases), die ohne ein gebundenes Cyclin nicht aktiv sein können.

Neben dem unidirektionalen Transport von Proteinen ins endoplasmatische Retikulum können Proteine zwischen Zellkern und –plasma hin- und hertransportiert werden, die betroffenen Proteine benötigen dafür sowohl ein „nuclear localization signal“ als auch ein „nuclear export signal“. Typischerweise findet dieses „trafficking“ während des Zellzyklus statt, beteiligte Proteine nehmen Aufgaben sowohl im Kern als auch im Zytoplasma wahr, allerdings in zeitlicher Differenzierung. Ein weiteres Beispiel für die Aktivierung durch Lokalisation ist die Rekrutierung an die Zellmembran, hier führt die räumliche Nähe von Protein und Substrat (oder Bindungspartner) zur erhöhten Aktivität.

Eine weitere Möglichkeit der Regulation sind posttranslationale Modifikationen. In diese sehr umfassende Kategorie fallen verschiedenste reversible und irreversible Mechanismen. Strukturelle

Einleitung

Änderungen können erzielt werden durch Spaltung der Aminosäurekette, bzw. der Abspaltung einzelner endständiger Aminosäuren, durch die Bildung von Disulfidbrücken oder die cis-trans-Isomerisierung von Prolinen. Einzelne Aminosäuren können chemisch modifiziert werden, z.B. durch Desaminierung, oder das Protein wird mit einem weiteren gekoppelt, typischerweise mit Ubiquitin. Der größte Anteil an posttranslationalen Modifikationen ist die Addition funktioneller Gruppen, auch hier oftmals reversibel. Einige Beispiele: Acetylierung/Deacetylierung des N-Terminus oder von Lysinen (z.B. Histone), Glykosylierung von Asparagin, Hydroxylysin, Serin oder Threonin, Biotinylierung von Lysin oder Phosphorylierung/Dephosphorylierung von Serin, Threonin oder Tyrosin. Die wichtige Rolle der Tyrosin-Phosphorylierung soll im Folgenden beleuchtet werden.

1.1.2 Zellbiologische Bedeutung der Tyrosinphosphorylierung

Grundsätzlich wird zwischen Serin/Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierung unterschieden und die Kinasen und Phosphatasen nach dieser Substratspezifität eingeteilt. Allerdings lassen sich die Grenzen nicht so klar ziehen, gerade bei den Phosphatasen wird dies deutlich. So werden aufgrund sequentieller und struktureller Ähnlichkeit viele Phosphatasen, die eine erweiterte Substratspezifität aufweisen, zu den Proteintyrosinphosphatasen (PTPs) gezählt. Daher stehen ungefähr 100 PTPs (Alonso, Sasin et al. 2004) nur 20 Proteinserin/threoninphosphatasen (PSTPs) (Gallego und Virshup 2005) gegenüber. Hingegen werden von 500 Proteinkinasen nur 90 den Proteintyrosinkinasen (PTKs) (Hanks und Hunter 1995; Robinson, Wu et al. 2000) zugeordnet. Dieses Missverhältnis an Antagonisten erklärt sich einerseits durch die Substrat-Promiskuität der PSTPs als auch durch die erweiterte Substratspezifität der PTPs, die auch Substrate der anderen Proteinkinasen dephosphorylieren. Aufgrund der geringeren Zahl der PTKs ist die Phosphorylierung von Tyrosin zwar seltener als die von Serin oder Threonin, wird aber in der zellulären Signaltransduktion weitreichend für komplexe Regulationsvorgänge benutzt. Die Wichtigkeit einer funktionierenden Steuerung durch das Wechselspiel von Proteintyrosinkinasen (PTKs) und Proteintyrosinphosphatasen (PTPs) wird durch die Folgen von fehlerhafter Phosphorylierung deutlich. So werden unphysiologische Expressions- oder Aktivitätslevel verschiedenster PTKs oder PTPs unter anderem mit folgenden Krankheiten assoziiert: Krebs, Diabetes, Alzheimer, Parkinson und Fettsucht.

Einteilung und Aufgaben der PTKs und PTPs

PTKs und relevante andere PKs

Mitte der 1980er Jahre führte die schnell zunehmende Zahl an entdeckten humanen Proteinkinasen zur gewagten These, dass im menschlichen Genom mindestens 1001 dieser Proteine zu finden sein müssten (Hunter 1987). Diese Aussage fußte auf der Erkenntnis der Wichtigkeit der Kinasen für die

zelluläre Regulation, sei es in der Verarbeitung von Signalen von außen (Rezeptor-Tyrosin-Kinasen) oder im Metabolismus der Zelle. Basierend auf sequenzieller und struktureller Homologie wurden die Proteinkinasen in Familien eingeordnet, innerhalb dieser ergaben sich auch funktionelle Verwandtschaften (Hanks und Hunter 1995). In Folge des Humangenomprojekts konnten 518 menschliche Proteinkinasen bestimmt werden und die ursprüngliche Einteilung verfeinert werden, nun umfasst sie insgesamt 17 Gruppen, 134 Familien und 201 Subfamilien (Manning, Whyte et al. 2002). Gründe, die PTKs gesondert zu betrachten, sind einerseits strukturelle Besonderheiten, andererseits die Tatsache, dass sie nur bei höheren Eukaryoten vorkommen (Robinson, Wu et al. 2000). Eine Datenbank der humanen Kinasen und eine Übersicht über den Stammbaum lassen sich hier finden: <http://kinase.com/human/kinome/>. Hier sollen nur einige besonders wichtige Kinasen genannt werden, seien sie als Targets, Antagonisten oder Regulatoren von CDC25A von Interesse.

Als erstes sind CDK1 und 2 zu nennen, die primären Substrate der CDC25. Ihre Aktivität ist der zentrale Schrittmotor des Zellzyklus. Sie gehören als „CDK“-Familie in die Gruppe CMGC, welche außerdem die MAP-Kinasen enthält, die das zentrale Element im MAP-Kinase-Signalweg sind und verschiedenste Reize durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren verarbeiten. Ein Beispiel für die MAP-Kinasen ist p38, das auf UV-bedingte DNA-Schädigungen reagiert. Der direkte Gegenspieler von CDC25A ist die Kinase Myt1, die die verschiedenen CDKs durch Phosphorylierung in einem inaktiven Zustand hält. Die CDKs gehören als Familie der „Wee“ (namengebend das Homolog aus *S. cerevisiae*) nicht zu einer der definierten Gruppen, sondern werden zu den „Other Kinases“ gezählt, eine Gruppe, die diverse nicht spezifisch verwandte Kinasen enthält.

Zu den klassischen Tyrosinkinasen gehören die Janus-Kinasen (JAK), die im JAK-STAT-Signaltransduktionsweg eine Stimulation von außen - u.a. durch Interleukin, Zytokine oder auch Erythropoetin - in Transkription von Zielgenen umsetzen. Sie kontrollieren auch die Expression der CDC25-Phosphatasen. In der Gruppe CAMK finden sich 3 Kinasen, für die CDC25 ein Substrat ist: CHK1, CHK2 und MK2, die in Folge von DNA-Schädigungen CDC25 durch Phosphorylierung inaktivieren.

PTPs

Generell lassen sich die 107 PTPs in 4 Klassen oder Familien einteilen, die Einteilung basiert auf der Aminosäuresequenz der katalytischen Domänen (Alonso, Sasin et al. 2004). Klasse 1 bis 3 tragen ein Cystein als aktiven Rest im katalytischen Zentrum, besitzen eine vergleichbare Struktur des aktiven Zentrums und verwenden einen ähnlichen Reaktionsmechanismus. Interessanterweise gehen die einzelnen Klassen jeweils auf einen einzigen gemeinsamen Vorläufer zurück, allerdings mit deutlich unterschiedlicher Funktion. Strukturelle Ähnlichkeiten legen aber den Schluss nahe, dass diese

Einleitung

Vorläufer sich wiederum durch Umsortieren struktureller Elemente aus einem noch ursprünglicheren Faltungsschema entwickelt haben. Die vierte Klasse fällt insofern heraus, da sie ein Aspartat im aktiven Zentrum für die Katalyse nutzt und zusätzlich ein Kation benötigt.

Die 99 Mitglieder der bei weitem umfangreichsten Klasse I der Cystein-basierten PTPs werden weiter unterteilt: Es finden sich einerseits die „klassischen“ PTPs mit strikter Spezifität für Phosphotyrosin, andererseits die VH1-ähnlichen, „dual-specificity“ Phosphatasen (DSPs), mit einem sehr breiten Spektrum an Unterklassen und Substraten. Trotz dieser Diversität an enzymatischer Aktivität sind die strukturellen Ähnlichkeiten aller Mitglieder dieser Klasse deutlich genug, um von einem gemeinsamen Vorfahren abzustammen. Die klassischen PTPs kommen als membranständige (21) und freie (17) Varianten vor und tragen zusätzliche Domänen, die auf die Funktion schließen lassen. Bei fast allen membranständigen PTPs gibt es zusätzliche extrazelluläre Domänen, z.B. Immunoglobulin, Fibronectin oder Carboanhydrase. In ähnlicher Weise tragen fast alle zytoplasmatischen PTPs zusätzliche Protein-Interaktions-Domänen, zum Beispiel SH2-, FERM-, PDZ- oder „Prolin-rich“-Domänen. So wird die Phosphatase-Funktionalität für eine Vielzahl von Regulationsprozessen nutzbar gemacht.

Die Unterklasse der DSPs lässt noch einige Differenzierungen zu. Wichtig sind als erstes die 11 MAP-Kinase-Phosphatasen (MKPs) mit Spezifität für phospho-Tyrosin (pTyr) und phospho-Threonin (pThr), die sich durch eine CH2-Region und weitere MAP-Kinase-Erkennungsmotive auszeichnen. Im Gegensatz zu diesen fehlen bei den „atypischen“ DSPs derartige spezifische Motive, so dass allgemein angenommen wird, dass diese in der Zelle andere Aufgaben wahrnehmen. Aufgrund dieser fehlenden Motive wird VHR hier eingeordnet, obwohl es in einigen Fällen Erk und Jnk (zwei MAP-Kinasen) dephosphorylieren kann (Todd, Tanner et al. 1999). In diese Gruppe fällt auch PIR mit dem äußerst ungewöhnlichen Substrat mRNA. Zwei weitere noch schlecht verstandene Subklassen sind die Slingshots SSH 1 bis 3, die eine Rolle in der Dynamik von Aktin übernehmen und die „phosphatase of regenerating liver“ PRL 1 bis 3, die mit verstärktem Tumorwachstum und –metastasierung assoziiert sind, deren zellulärer Mechanismus aber noch nicht geklärt ist (Bessette, Wong et al. 2007). Die PTPs der CDC14-Gruppe sind beteiligt an der Zellzyklusregulation durch Inaktivierung der CDKs und am Ende der Mitose (Visintin, Craig et al. 1998). Als letztes sind noch die PTEN (Phosphatase und Tensin Homologe) und die Myotubularine zu nennen, die Inositol-phospholipide an der D3-Stelle dephosphorylieren können, jeweils an Plasma- oder inneren Membranen.

Die gesamte Klasse II wird von einem Gen repräsentiert: *ACP1*. Das Genprodukt ist die 18kDa große „low molecular weight protein tyrosine phosphatase“ (LMPTP), welche eine Vielzahl von Substraten dephosphoryliert, allerdings noch keiner eindeutigen zellulären Funktion zugeordnet werden kann.

Die große Verbreitung verwandter „Klasse II“-Phosphatasen bei Prokaryoten und Eukaryoten mit hoher Sequenzübereinstimmung lässt den Schluss zu, dass sich eine vitale Funktion konserviert hat. Beim Menschen sind allelische Varianten der LMPTP mit verschiedensten Krankheiten assoziiert, z.B. Alzheimer, Diabetes oder rheumatoider Arthritis (Bottini, Bottini et al. 2002).

Die 3. Klasse der Cystein-basierten PTPs des Menschen wird von den drei Zellzyklus-Regulatoren CDC25 A, B und C gebildet. Sie dephosphorylieren und aktivieren damit die für das Fortschreiten des Zellzyklus verantwortlichen CDKs (cyclin-dependent kinases) und unterliegen selbst einer strikten Kontrolle. Sie stammen ursprünglich von einem bakteriellen Verwandten der Rhodanese ab und haben die Rolle im Zellzyklus erst spät übernommen. So kann in *S. cerevisiae* der Zellzyklus ohne Phosphorylierung des CDK-Analogs CDC28 fortschreiten. Bemerkenswerterweise wurden hierfür nicht schon vorhandene Klasse I oder II-PTPs für diese Funktion umgewidmet, sondern ein völlig neuer Typus erschaffen. Dies könnte auf einer früheren Assoziation des Vorläufers mit den CDKs beruhen, wirft aber immer noch Fragen auf.

Die Klasse der Aspartat-basierten PTPs besteht aus den Proteinen Eya 1 bis 4, die der Haloacid-Dehalogenase Superfamilie zuzurechnen sind. Neben ihrer pTyr-Dephosphorylierungsaktivität wirken sie außerdem als Transkriptionsfaktor, wobei unklar ist, inwieweit diese beiden Funktionen miteinander verknüpft sind (Jemc und Rebay 2007).

Proteintyrosinphosphorylierung als Drug-Target

Kinasen

Da Kinasen eine zentrale Rolle in der Kontrolle von Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung übernehmen, liegen die Folgen unkontrollierter Aktivität auf der Hand. Ein früh erkanntes Beispiel für dieses Prinzip liefern die grundsätzlich konstitutiven Kinasen, die von onkogenen Viren in der Zelle exprimiert werden (Cohen 2001; Noble, Endicott et al. 2004). Viele Krebsarten werden eindeutig von Mutationen in Kinasen ausgelöst, z.B. bei Nierentumoren (Met-Rezeptor-Kinase) oder Non-Hodgkin-Lymphom (Alk Kinase) (Noble, Endicott et al. 2004). Aber auch viele andere Krankheiten werden durch Überaktivität von Kinasen ausgelöst, z.B. rheumatoide Arthritis, Diabetes oder Arteriosklerose. Insgesamt 250 Kinasen werden über ihre Genloci mit Krankheiten in Verbindung gebracht.

Die Entwicklung von Medikamenten auf Kinase-Inhibitor-Basis hat bereits zu einem Dutzend an Zulassungen für die Therapie verschiedener Krebsarten geführt, als Beispiele genannt seien Gleevac und Avastin. Aber auch andere Krankheitsbilder sind in den Fokus gerückt, so befindet sich mit Ruboxistarin ein Diabetesmedikament in der Phase-3-Entwicklung. Eglen und Reisine bieten eine

Einleitung

gute Zusammenfassung über den derzeitigen Stand von Forschung und Entwicklung (Eglen und Reisine 2009).

Phosphatasen

Im Vergleich zu den PTKs sind die PTPs als drug targets später in den Fokus gerückt, was einerseits an der 10 Jahre früheren Entdeckung der Kinasen lag, als auch an der unterschiedlichen Bedeutung, die beiden Enzymklassen zugewiesen wurde. Lange galten die Phosphatasen als Haushaltsgene, die die Signalbotschaften, die von den Kinasen aktiv und unter Energieverbrauch ausgelöst wurden, wieder in den Grundzustand zurückstellten. Ein weiteres praktisches Problem, das die Wirkstoffentwicklung erschwert, ist die hohe Ladung von PTP-Substraten, die die Membrangängigkeit einschränkt. Schließlich wurde lange angenommen, dass das flache, undistinguerte und innerhalb der Phosphatasen wenig variable aktive Zentrum die Entwicklung hochspezifischer Inhibitoren nicht zulässt. Mittlerweile hat sich eine andere Sichtweise durchgesetzt: Phosphatasen sind ausdrücklich als aktivierende Partner an zellulärer Regulation beteiligt (Alonso, Sasin et al. 2004), mit gleicher Wichtigkeit wie die Kinasen, allerdings ist die Art der Wirkung eine etwas andere. Ein mathematisches Modell der Regulation von Signalkaskaden weist den beiden Enzymen folgende Aufgaben zu: Kinasen kontrollieren die Amplitude des ausgelösten Signals, während Phosphatasen die Rate und die Dauer beeinflussen (Heinrich, Neel et al. 2002). Außerdem wurde erkannt, dass die Phosphatasen selbst einer stringenten Kontrolle unterliegen und außerhalb des aktiven Zentrums einzigartige Proteinoberflächen vorweisen (Alonso, Sasin et al. 2004). Schließlich wurde durch knock-out-Studien PTP1B als negativer Regulator im Insulinsignalweg etabliert, was die PTPs allgemein in den Fokus des Interesses rückte. PTP1B, PTP α , CD45, LMPTP, PRL-3, SHP-1, HePTP, MKP-1 und CDC25A, B und C sind derzeit die wichtigsten Ziele, da sie mit Krankheiten assoziiert sind (Lyon, Ducruet et al. 2002; Bialy und Waldmann 2005; Tautz, Pellecchia et al. 2006). Zusätzlich sind noch MptpA/MptpB aus *Mycobacterium tuberculosis* und YopH aus *Yersinia pestis* von Interesse, da diese eine zentrale Rolle für die Gefährlichkeit (Bialy und Waldmann 2005) dieser humanpathogenen Erreger spielen. Noch sind keine Therapeutika zugelassen, es gibt allerdings einige Phase-2-Studien. Trodusquemine, ein PTP1B-Inhibitor, wird von Genaera Corporation für die Zulassung entwickelt und hat eine Phase-1-Studie im Oktober 2007 erfolgreich durchlaufen¹. ISIS hat einen PTP1B-Inhibitor auf Basis eines Antisense-Oligonukleotids entwickelt, der in einer Phase-2-Studie an Typ-2-Diabetes-Patienten eine Verbesserung der Blutglukosekontrolle und des Cholesterinspiegel bewirkte². Merck-

¹ http://www.genaera.com/press_room.php?page=165

² <http://phx.corporate-ir.net/phoenix.zhtml?c=94554&p=irol-newsArticle&ID=720477&highlight>

Serono führt derzeit Phase-2-Studien mit einem Wirkstoff durch, dessen Profil auf einen PTP1B-Inhibitor zutrifft³. Ein Inhibitor der SHP-1, Natrium-Stibogluconat, wird derzeit von VioQuest Pharmaceuticals für die Therapie von Melanomen, Myelomen und Lymphomen entwickelt und befindet sich gerade in Phase-2-Studien⁴. Da es bereits für die Behandlung von Leishmaniose eingesetzt wird, ist es ein guter Zulassungskandidat, sollte sich die Wirksamkeit bestätigen. Insgesamt hinkt die Wirkstoffentwicklung deutlich hinter den Kinasen her.

1.1.3 Aufgabe und Regulation von CDC25A

Zellzyklus

Die Kinase Myt-1 phosphoryliert die CDKs an Thr14 und Tyr15 (Malumbres und Barbacid 2005), inhibiert diese und verhindert dadurch ein Fortschreiten des Zellzyklus. Dephosphorylierung durch die verschiedenen CDC25-Phosphatasen ist daher eine Voraussetzung für den korrekten Ablauf des Zellzyklus, insbesondere das Überschreiten der beiden Checkpunkte am Übergang G1/S und G2/M wird hierdurch kontrolliert (siehe Abbildung 1).

Das ursprünglich aufgestellte Modell der Zellzyklusregulation sah für jede der drei CDC25-Phosphatasen klar abgegrenzte Aufgaben und Substrate vor. Dieses Bild wurde immer wieder verfeinert und zeigt eine Vielfalt an Kontrollmechanismen und zeitliche Differenzierung der Aktivität. CDC25A gilt als universellste der drei Phosphatasen und ist sowohl am G1/S- als auch am G2/M-Übergang beteiligt. Allerdings gibt es keine vollständige Redundanz der Aufgaben. So ist CDC25B für ein Wiederaufnehmen des Zellzyklus nach einem Arrest in G2 unbedingt nötig und gilt auch generell als Schrittmacher für den G2/M-Übergang durch Aktivierung von CDK1/Cyclin B. Dieses aktiviert dann CDC25A, welches wiederum CDK1/Cyclin B dephosphorylieren kann (Mailand, Podtelejnikov et al. 2002) und durch dieses Feedback den Fortgang der Mitose gewährleistet (Galaktionov und Beach 1991). Bei der Kontrolle des G1/S-Checkpoints ist CDC25A ausschlaggebend. Um den Zellzyklus fortschreiten zu lassen, werden die Substrate CDK2/Cyclin E und CDK2/Cyclin A aktiviert (Blomberg und Hoffmann 1999), mit CDK2/Cyclin E entsteht erneut ein Feedback-Loop. Aufgrund der zentralen Rolle von CDC25A ist seine Aktivität selbst äußerst streng kontrolliert, viele der oben bereits genannten Mechanismen der Regulation lassen sich hier finden.

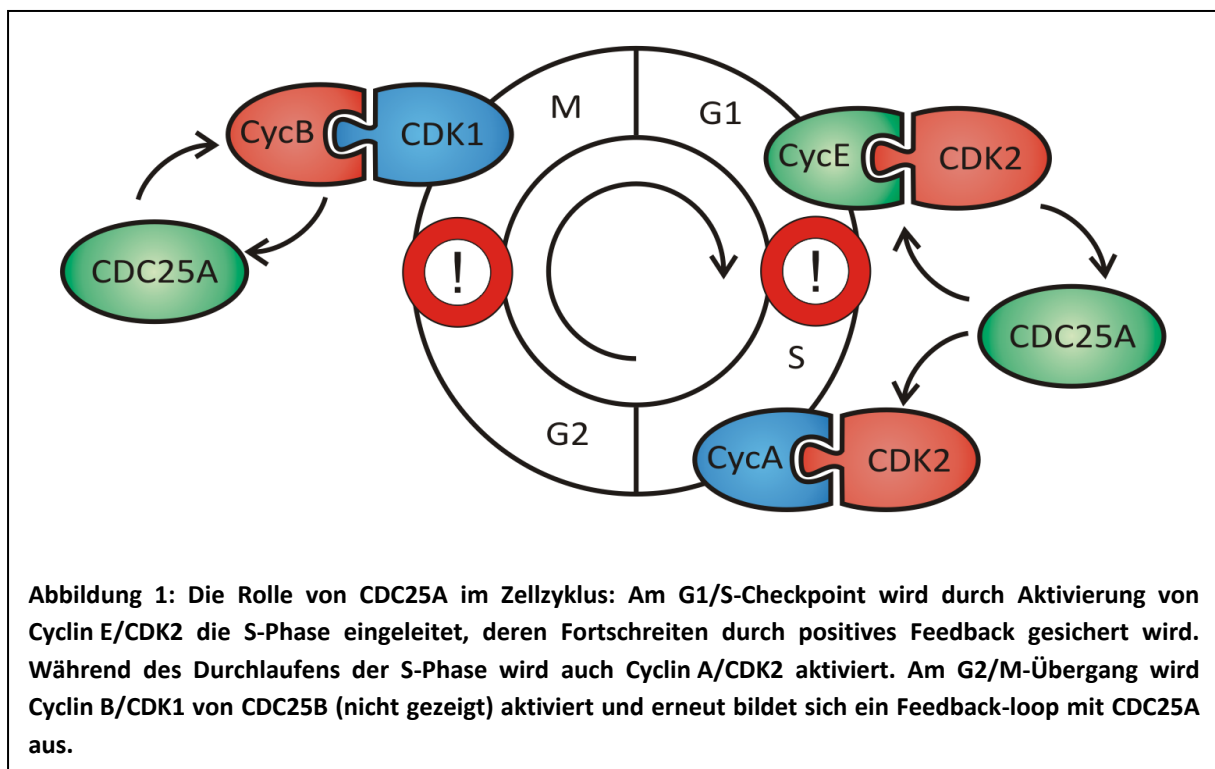
³ <http://www.merck-laserforum.com/servlet/PB/show/1776690/Investor%20Roadshow%20Fall%202007.pdf>.

⁴ http://www.vioquestpharm.com/content/press_11_26_07.html

Apoptose

Zusätzlich zu der zentralen Aufgabe von CDC25A im Zellzyklus gibt es Hinweise darauf, dass CDC25A für die Einleitung der Apoptose wichtig ist. In Folge von c-Myc-Aktivierung steigen durch direkte Transkriptionsinduktion mRNA- und Proteinlevel an. CDC25A ist anscheinend für diesen Apoptoseweg zwingend notwendig und kann auch durch Überexpression ein Fehlen von c-Myc ausgleichen (Galaktionov, Chen et al. 1996). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass Pim-1, ein weiterer Reaktionspartner von c-Myc, durch Regulation von CDC25A die Apoptose einleitet (Mochizuki, Kitanaka et al. 1997). Interessanterweise wurde auch für das wichtige CDC25A-Substrat CDK2 eine Beteiligung in der c-Myc-abhängigen Apoptose gezeigt, ein weiteres Indiz für die Wichtigkeit dieser PTP für den programmierten Zelltod (Deb-Basu, Karlsson et al. 2006).

Im Gegensatz dazu gibt es auch Hinweise darauf, dass CDC25A der Apoptose entgegenwirken kann. So wurde in humanen Krebszellen eine verminderte CDC25A-Aktivität festgestellt, wenn die Apoptose durch TNF- α eingeleitet wurde. Auch konnte in Rattenembryonenzellen der programmierte Zelltod in Folge von Serumentzug durch CDC25A-Überexpression verhindert werden (Fuhrmann, Leisser et al. 2001). Weitere Interaktionspartner in diesem Zusammenhang sind der Apoptose-Promotors ASK-1, der unabhängig von der enzymatischen Aktivität durch CDC25A inhibiert werden kann (Zou, Tsutsui et al. 2001).



Die Entscheidung zwischen pro- und anti-apoptotischer Aktivität könnte durch die sub-zelluläre Lokalisation bedingt sein. Im Zytoplasma kann CDC25A den anti-apoptotischen Akt-Signalweg aktivieren, während es im Zellkern FKHL1, einen pro-apoptotischen Transkriptionsfaktor, durch Dephosphorylierung dort zurück und so aktiv halten kann (Fuhrmann, Leisser et al. 2001; Leisser, Rosenberger et al. 2004).

Regulation

Transkriptionslevel

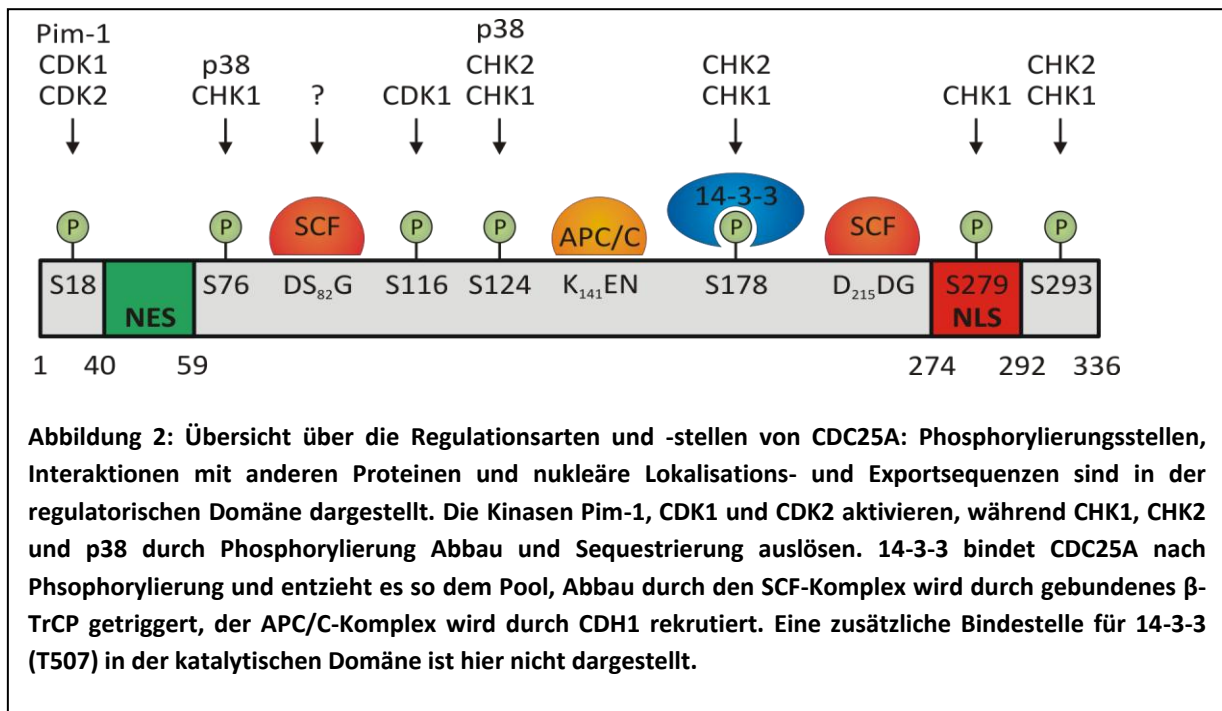
Die CDC25A-mRNA wird in der späten G1-Phase und der frühen S-Phase transkribiert, den höchsten Expressionslevel findet man während der S-Phase. Daran sind als Transkriptionsfaktoren E2F, c-Myc, STAT3 und p53 beteiligt, p21^{waf1} als Kofaktor.

Der für den G1/S-Übergang wichtige Transkriptionsfaktor E2F wirkt in ruhenden Zellen als inhibierender E2F-pRb-Komplex am *cdc25a*-Promotor, wird bei Serum-Induktion freigesetzt und startet so die Expression (Chen und Prywes 1999). Im Falle von E2F-1 wird CDC25A als essentiell angesehen, da fehlende Aktivität dieser PTP eine effiziente Einleitung der S-Phase durch diesen Transkriptionsfaktor unterbindet (Vigo, Muller et al. 1999). Daneben kann c-Myc ebenfalls den Eintritt in die S-Phase auslösen, in Reaktion auf mitogene Signale werden sowohl Cyclin E und CDC25A hochreguliert (Santoni-Rugiu, Falck et al. 2000). Darüber hinaus scheint c-Myc-kontrollierte CDC25A-Expression in der Apoptose eine Rolle zu spielen (s.u.). Der durch Wachstumsfaktoren aktivierte Transkriptionsfaktor STAT3 kann einerseits in Kooperation mit c-Myc die Expression von *cdc25a* induzieren (Barre, Vigneron et al. 2005), andererseits kann durch einen Komplex mit dem Retinoblastoma (Rb) Tumorsuppressor die Transkription verhindert werden. Beide (STAT3 und Rb) werden als Antwort auf reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) hochreguliert, so würde STAT3 CDC25A-Level sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. p21^{Waf1}, eigentlich ein CDK-Inhibitor, wirkt in Kooperation mit E2F und STAT3 als Repressor von *myc* und *cdc25a* (Jaime, Pujol et al. 2002; Vigneron, Cherier et al. 2006). Das Protein p53 wirkt unter verschiedenen Bedingungen als Tumorsuppressor, indem es einen Zellzyklusarrest auslöst, der die Reparatur von DNA-Schäden erlaubt. Dies wird durch die direkte Hochregulation von p21^{Waf1} erreicht, das als CDK-Inhibitor ein Fortschreiten des Zellzyklus unterbindet (el-Deiry, Tokino et al. 1993; Harper, Elledge et al. 1995). Allerdings wird auch die *CDC25A*-Expression durch einen indirekten Mechanismus unterdrückt (Rother, Kirschner et al. 2007), was wiederum die Beteiligung von p21^{Waf1} wahrscheinlich macht.

Einleitung

Aktivität

Neu synthetisiertes CDC25A muss durch Phosphorylierung aktiviert werden. Dies geschieht grundsätzlich durch die Kinase Pim-1, die Zytokin-vermittelte Wachstumssignale weitergibt. In Kooperation mit c-Myc kann dies entweder zur Transformation in Tumorzellen oder zur Apoptose führen (Verbeek, van Lohuizen et al. 1991; Mochizuki, Kitanaka et al. 1997). Während des normalen Zellzyklus (siehe Abbildung 1) wird CDC25A eingangs der S-Phase durch sein eigenes Substrat CDK2/Cyclin E phosphoryliert, dies erzeugt einen Feed-back-Loop, durch den die S-Phase vorangetrieben wird (Hoffmann, Draetta et al. 1994). Am Übergang zur M-Phase wird CDK1/Cyclin B durch den Schrittmacher CDC25B aktiviert, welches im Verlauf der Mitose abgebaut wird. Das aktive CDK1/Cyclin B phosphoryliert CDC25A und erzeugt einen vergleichbaren Loop (Mailand, Podtelejnikov et al. 2002)



Ein Gegenspieler dieser Kinasen ist die Phosphatase CDC14A, welches diese Aktivierung rückgängig macht und am Ende der Mitose einen wichtigen negativen Regulator darstellt (Esteban, Vazquez-Novelle et al. 2006). Ein weiterer Kandidat ist die Kinase P160^{ROCK}, deren Translokation in den Zellkern durch TGF- β ausgelöst wird und die dort CDC25A deaktiviert (Bhowmick, Ghiassi et al. 2003). Ein weiteres beobachtetes Phänomen ist die irreversible Inaktivierung von CDC25A durch reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS), die das Cystein im aktiven Zentrum oxidieren und damit die Aktivität aufheben (Abbildung 3).

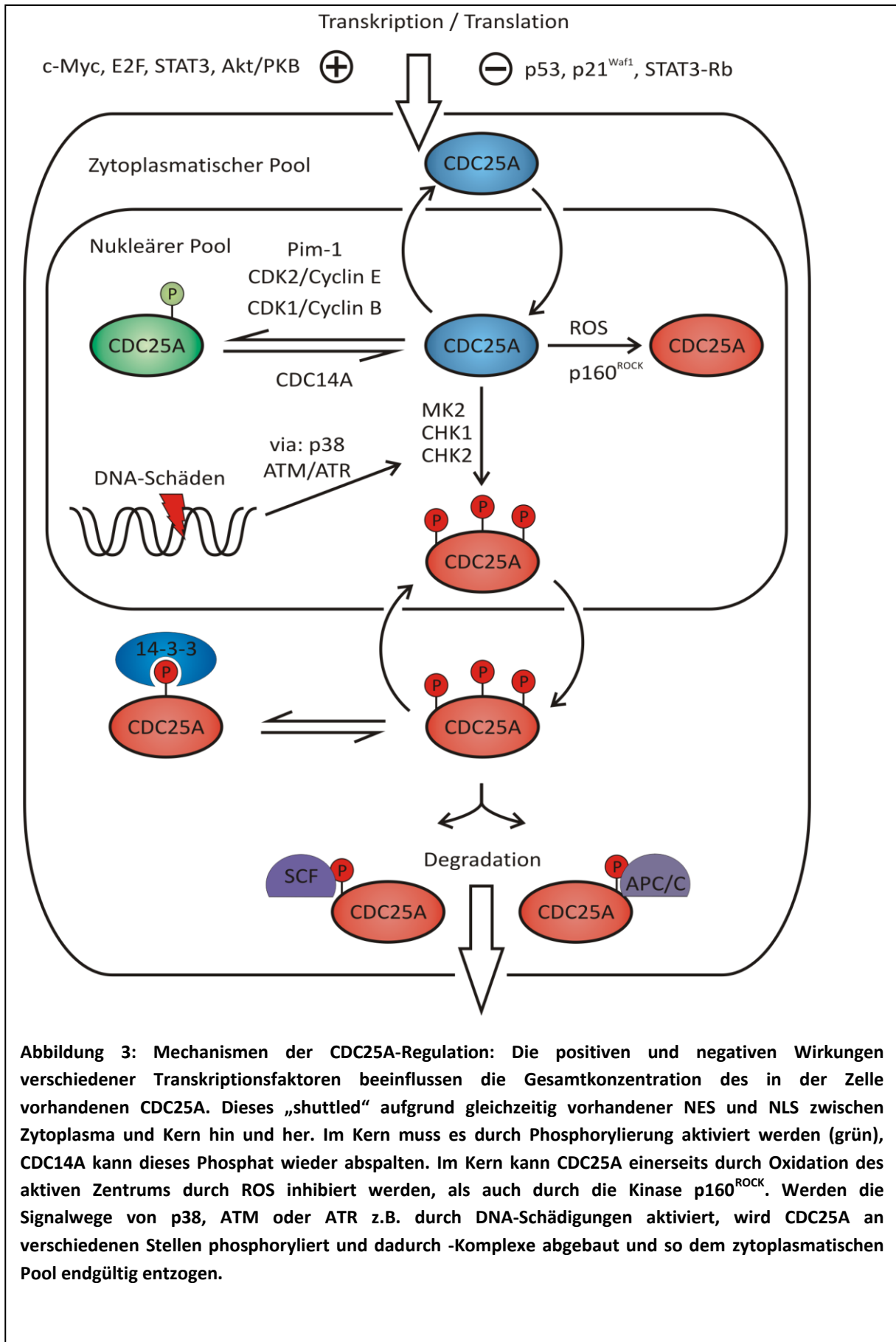


Abbildung 3: Mechanismen der CDC25A-Regulation: Die positiven und negativen Wirkungen verschiedener Transkriptionsfaktoren beeinflussen die Gesamtkonzentration des in der Zelle vorhandenen CDC25A. Dieses „shuttled“ aufgrund gleichzeitig vorhandener NES und NLS zwischen Zytoplasma und Kern hin und her. Im Kern muss es durch Phosphorylierung aktiviert werden (grün), CDC14A kann dieses Phosphat wieder abspalten. Im Kern kann CDC25A einerseits durch Oxidation des aktiven Zentrums durch ROS inhibiert werden, als auch durch die Kinase p160^{ROCK}. Werden die Signalwege von p38, ATM oder ATR z.B. durch DNA-Schädigungen aktiviert, wird CDC25A an verschiedenen Stellen phosphoryliert und dadurch -Komplexe abgebaut und so dem zytoplasmatischen Pool endgültig entzogen.

Einleitung

Lokalisation

Da CDC25A sowohl nukleare Lokalisations- als auch Exportsequenzen (NLS, NES) trägt, ist ein Shuttling zwischen Kern und Zellplasma möglich, die genaue Steuerung dieses Vorgangs ist noch nicht gut untersucht (Kallstrom, Lindqvist et al. 2005). Es gibt Hinweise darauf, dass CDC25A im Zellplasma eher vor Apoptose schützt, während es im Zellkern den Zelltod begünstigt (Fuhrmann, Leisser et al. 2001; Leisser, Rosenberger et al. 2004). Nach Phosphorylierung durch CHK/MK2 kommt es durch das Proteinbindungsprotein 14-3-3 zu einer Sequestrierung von CDC25A ins Zytoplasma, außerdem wird die Bindung von echten Substraten verhindert (Abbildung 2).

Degradation

Aufgrund der hohen Instabilität von CDC25A kann der Proteinlevel sehr gut kontrolliert werden. Sowohl während des normalen Fortgangs des Zellzyklus (Sorensen, Syljuasen et al. 2004) als auch in Reaktion auf DNA-Schädigung oder Inhibition der DNA-Synthese (Molinari, Mercurio et al. 2000) (Mailand, Falck et al. 2000) wird die Menge an Protein durch den Proteasom-Abbauweg kontrolliert. Spezifische Erkennungsmotive auf CDC25A ermöglichen den Abbau auf zwei Wegen, die dafür nötige Ubiquitylierung erfolgt jeweils durch Ubiquitin-E3-Ligase-Komplexe: Entweder durch den „Anaphase-Promoting Complex or Cyclosome“-Komplex (APC/C) oder durch den „Skp1/Cullin/F-box“-Komplex. (Donzelli, Squatrito et al. 2002) (Busino, Donzelli et al. 2003) (Abbildung 2). Üblicherweise ist Phosphorylierung für das Binden notwendig, für SCF gibt es allerdings noch eine DDG-Sequenz (Kanemori, Uto et al. 2005), für die dies nicht nötig ist.

Wichtigkeit als Drug-Target

In Anbetracht der außerordentlich wichtigen Funktion in der Regulation des Zellzyklus von CDC25A ist es nicht überraschend, dass eine fehlerhafte Kontrolle der Aktivität weitreichende Folgen hat. So wurde schon frühzeitig vermutet, dass die CDC25-PTPs eine wichtige Rolle in der Tumorigenese spielen (Galaktionov, Lee et al. 1995). Generell wird angenommen, dass Überexpression von CDC25A oder B zum Überspringen wichtiger Zellzyklus-Checkpoints führt (Bansal und Lazo 2007; Boutros, Lobjois et al. 2007), was zu genomischer Instabilität führt. Eine Überexpression von sowohl CDC25A als auch B findet sich in einer Reihe von verschiedenen menschlichen Krebsarten, oftmals in Kombination, CDC25C scheint dabei aber keine Rolle zu spielen. Zwei gute Übersichten über die Rolle von CDC25 Überexpression in verschiedenen Krebsarten finden sich hier (Kristjansdottir und Rudolph 2004; Boutros, Lobjois et al. 2007).

1.2 Struktur und Funktion von CDC25A

1.2.1 Struktur

Zentrales Element der PTPs-Struktur ist das katalytische Zentrum, dieses ist für die Cystein-basierten Klassen 1 bis 3 konserviert. Für die klassischen und die CDC25-PTPs lautet diese: His-Cys-(X)₅-Arg, allerdings besteht sonst keine Sequenzhomologie. Bei den „low molecular weight phosphatases“ der Klasse 2 fehlt zwar das Histidin am Beginn, allerdings teilt es mit den klassischen PTPs weitere Reste außerhalb des aktiven Zentrums. Innerhalb der drei CDC25-PTPs ist diese Sequenz sogar eindeutig festgelegt, bei allen drei lautet sie: His-Cys-Glu-Phe-Ser-Ser-Glu-Arg.

Domänenstruktur

Die drei CDC25-Phosphatasen besitzen je eine regulatorische (N-Terminus) und eine katalytische (C-Terminus) Domäne. Die regulatorische Domäne, die fast alle Phosphorylierungsstellen, Bindestellen für Signaltransduktionseffektoren, die „Nuclear Localisation Sequence“ und die „Nuclear Export Sequence“ trägt (Abbildung 4), besitzt kaum Sequenzhomologie und ist bei den drei CDC25-Phosphatasen von deutlich unterschiedlicher Länge (von 281 bis 391 Aminosäuren). Die katalytische Domäne (Länge bei CDC25A: 188 Aminosäuren) ist hochkonserviert, sie trägt das aktive Cystein und im Falle von CDC25A und B eine weitere Phosphorylierungsstelle (Chen und Prywes 1999).

Im Sequenzalignment der drei CDC25-PTPs (Abbildung 4) ist diese Zweiteilung deutlich zu erkennen. Über die komplette Länge betrachtet stimmen 20 % der Aminosäurereste überein, bei der regulatorischen Domäne allein sind es allerdings nur noch 6 %, während die katalytische Domäne 50 % Sequenzidentität aufweist und somit deutlich konserviert ist. Beim paarweisen Vergleich sind CDC25A und B stärker miteinander verwandt. Beim Vergleich der regulatorischen Domänen ist außerdem zu beachten, dass verschiedene Spleißvarianten für zusätzliche sequenzielle Diversität sorgen (für CDC25A 2 Isoformen, für B und C je 5).

Betrachtet man das Sequenzalignment der katalytischen Domäne genauer, kann man bereits einige Besonderheiten feststellen. Insgesamt lassen sich 4 Bereiche noch einmal erhöhter Sequenzhomologie erkennen (die Zahlenangaben beziehen sich auf die Konsensussequenz): Der Beginn der Domäne von der einleitenden Aminosäuresequenz Leu-Ile-Gly-Asp (399 bis 402) bis zum Phe435, danach die Bereiche von Asp446 bis Leu464, von Lys486 bis Arg513 (mit aktivem Zentrum) und etwas weniger deutlich Leu521 bis Phe537. Während die erste Sequenz nur innerhalb der CDC25-PTPs konserviert ist, ist der Bereich um das aktive Zentrum natürlich mit den anderen Phosphatasen verwandt. Die zweite und vierte Sequenz sind zwei Homologie-Motive (CH2A und

Einleitung

CH2B), die sich interessanterweise auch in der nicht-katalytischen Domäne der MAP-Kinase-Phosphatasen finden (Keyse 1993).

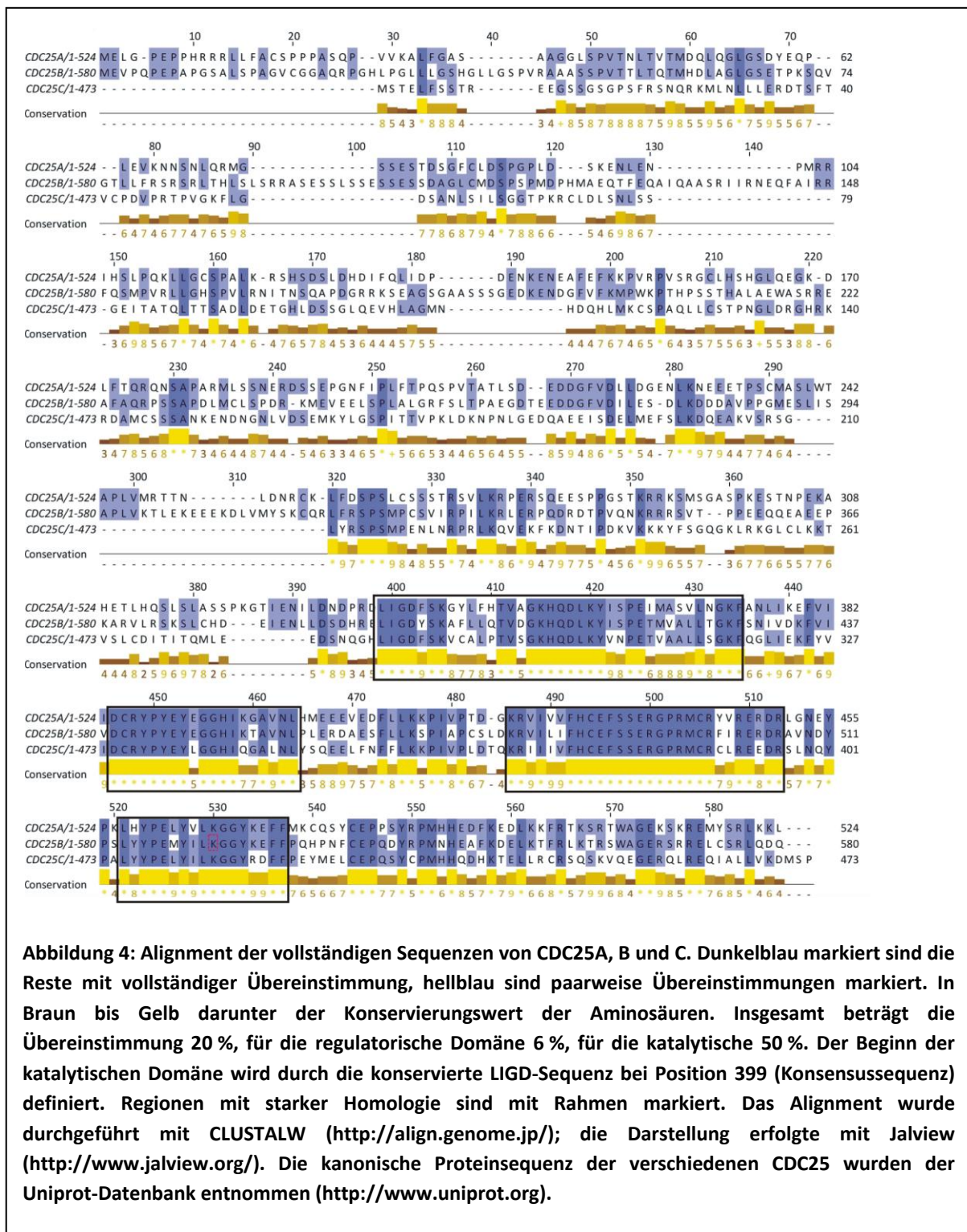
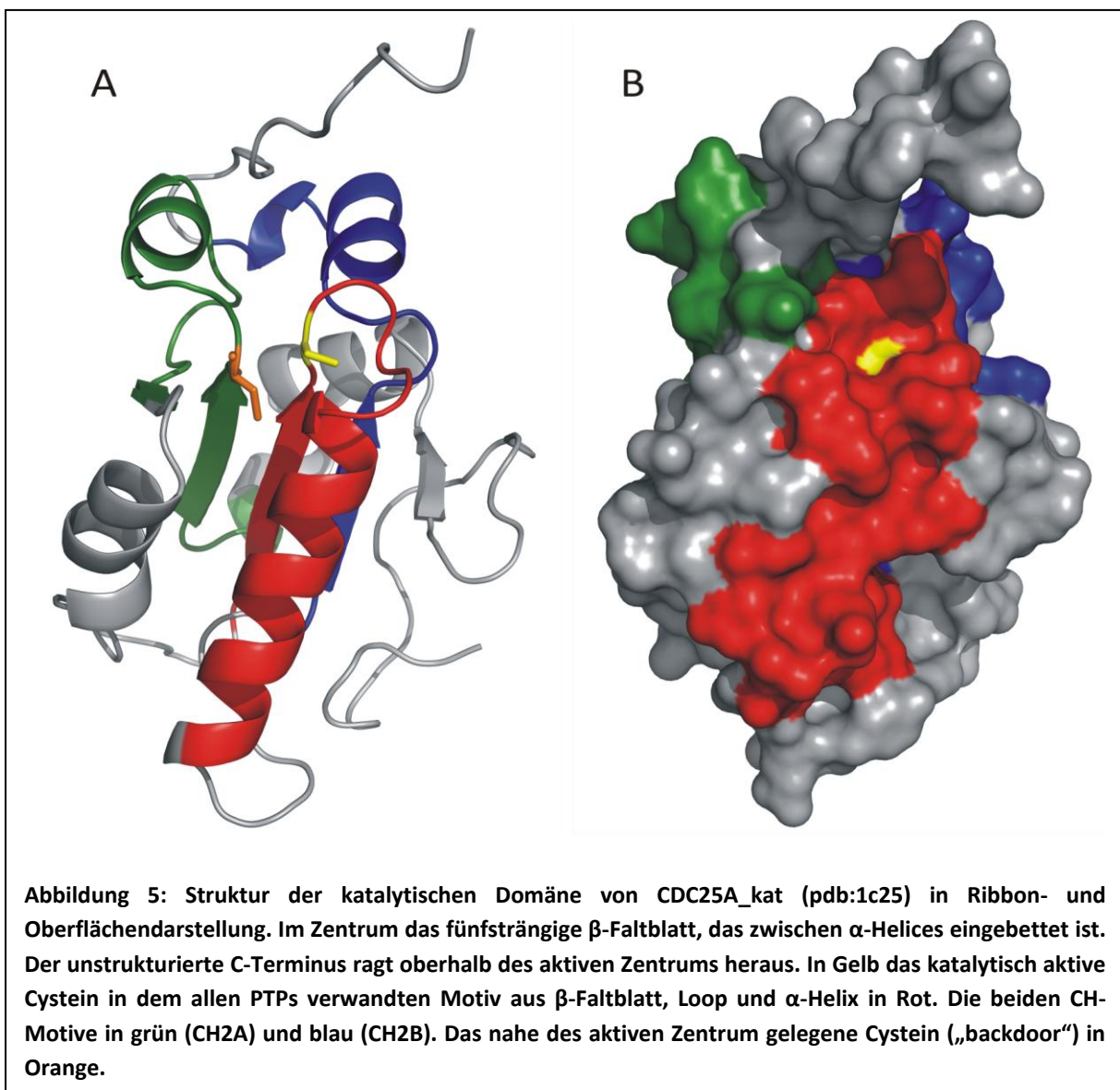


Abbildung 4: Alignment der vollständigen Sequenzen von CDC25A, B und C. Dunkelblau markiert sind die Reste mit vollständiger Übereinstimmung, hellblau sind paarweise Übereinstimmungen markiert. In Braun bis Gelb darunter der Konservierungswert der Aminosäuren. Insgesamt beträgt die Übereinstimmung 20 %, für die regulatorische Domäne 6 %, für die katalytische 50 %. Der Beginn der katalytischen Domäne wird durch die konservierte LIGD-Sequenz bei Position 399 (Konsensussequenz) definiert. Regionen mit starker Homologie sind mit Rahmen markiert. Das Alignment wurde durchgeführt mit CLUSTALW (<http://align.genome.jp/>); die Darstellung erfolgte mit Jalview (<http://www.jalview.org/>). Die kanonische Proteinsequenz der verschiedenen CDC25 wurden der Uniprot-Datenbank entnommen (<http://www.uniprot.org>).

3-dimensionale Struktur

Die ersten Strukturen von PTPs wurden 1994 veröffentlicht, insgesamt 5 Proteine aus 4 Organismen: Humane PTP1B (Barford, Flint et al. 1994), drei „low molecular weight“-PTPs aus Rattenprostata (Lindqvist, Schneider et al. 1994), aus Rinderleber (Su, Taddei et al. 1994) und Rinderherz (Zhang, Van Etten et al. 1994) und Yop51 aus *Yersinia enterocolitica* (Stuckey, Schubert et al. 1994). Zusätzlich zu den Strukturen neuer PTPs wurde eine Vielzahl von Studien veröffentlicht, die die Bindung von Substraten dokumentieren. In dieser Hinsicht am besten untersucht ist PTP1B, mehr als 100 Einträge finden sich in der Protein Data Bank (PDB)⁵. Erst kürzlich wurde eine umfassende Studie zum strukturellen Vergleich von 22 PTPs der Klasse 1 veröffentlicht (Barr, Ugochukwu et al. 2009).



⁵ <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

CDC25A

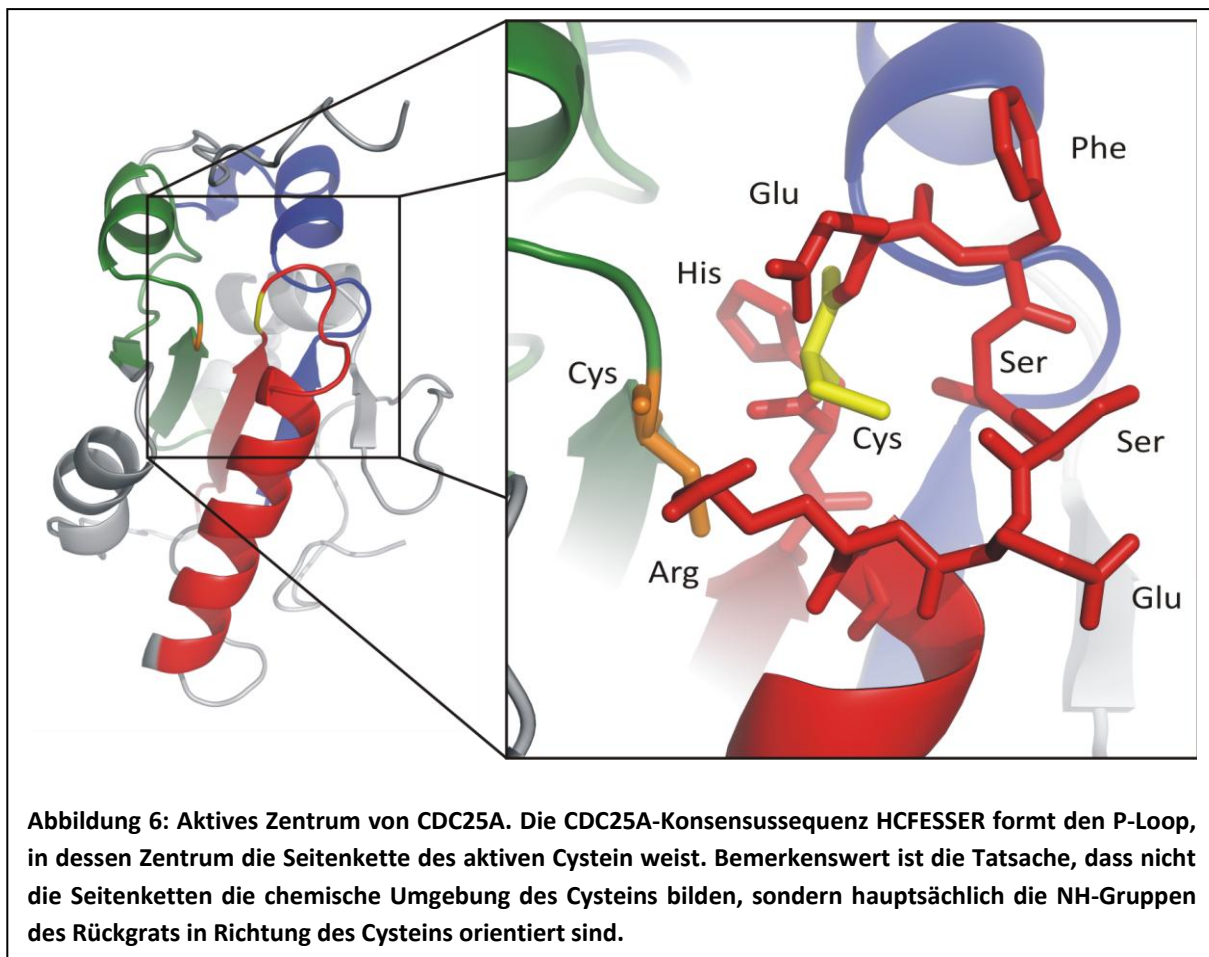
Von den vollständigen CDC25-PTPs wurden bis jetzt noch keine 3D-Strukturen gelöst, die Röntgenstrukturen allein der katalytischen Domänen von CDC25A (Fauman, Cogswell et al. 1998) und CDC25B (Reynolds, Yem et al. 1999) wurden mit kurzem Abstand veröffentlicht, die von CDC25C wurde erst jüngst (September 2010, Code: 3OP3) in der RSCB Protein Data Bank hinterlegt. An CDC25B wurden weiterhin strukturelle Studien durchgeführt, so wurden unterschiedliche Redoxzustände des aktiven Zentrums untersucht (Buhrman, Parker et al. 2005), Mutanten des aktiven Zentrums (Sohn, Parks et al. 2005; Sohn, Buhrman et al. 2007) und eine Mutante einer sekundären Bindungsstelle (Sohn, Buhrman et al. 2007). Zusätzlich wurde eine durch Guanidiniumchlorid induzierte veränderte Kristallform in der PDB hinterlegt (Code: 2uzq). NMR-Strukturen liegen nicht vor, einzig eine NMR-Struktur einer CDC25-Isoform aus *Arabidopsis thaliana* wurde veröffentlicht (Landrieu, da Costa et al. 2004).

Die katalytische Domäne von CDC25A (CDC25A_kat; Reste 337 bis 524⁶) besitzt ein zentrales paralleles β -Faltblatt, dessen fünf Stränge in der Reihenfolge 15423 angeordnet sind und welches leicht verdrillt ist. Oberhalb liegen 2 längere α -Helices und unterhalb 3 kürzere, an die sich ein sehr kurzes, zweisträngiges antiparalleles β -Faltblatt anschließt. Das katalytisch aktive Cystein befindet sich im sogenannten P-Loop zwischen dem zentralen β -Faltblattstrang und der nachfolgenden α -Helix. Neben diesen klaren Sekundärstrukturelementen zeigt CDC25A_kat einige längere ungeordnete Abschnitte, die durchaus größere Entfernungen überbrücken. Abbildung 5 A zeigt die Ribbon-Darstellung von CDC25A_kat mit dem Motiv des aktiven Zentrums in Rot und den konservierten Motiven CH2A und CH2B in grün und blau. Die Proteinoberfläche um das aktive Zentrum (Abbildung 5B) ist eher flach und wenig strukturiert, es gibt keine wirklich ausgeprägte Bindungstasche. Außergewöhnlich ist der unstrukturierte C-Terminus, der über die Bindungstasche hinausragt, andererseits die Nähe des aktiven Cysteins zu einem weiteren Cystein („backdoor“) im Loop im CH2A-Motiv.

In Abbildung 6, der „Stick“-Darstellung des aktiven Zentrums, ist die Konformation des Proteinrückgrats und der Seitenketten deutlich zu erkennen. Die SH-Gruppe des aktiven Cysteins ragt ins Zentrum des Loops, die Seitenketten der anderen Aminosäuren weisen nach außen. Die Tasche um das Cystein wird primär durch die NH-Gruppen des Rückgrats gebildet. Dessen Konformation

⁶ Nummerierung basierend auf der Isoform 1, in der ursprünglichen Veröffentlichung ist die Nummerierung um eins verschoben; pdb-Code: 1c25)

p3 wird anscheinend durch die Seitenketten der konservierten Sequenz so genau definiert, dass auch ein konservativer Aminosäureaustausch die Bindungstasche empfindlich stören würde. Der Abstand des „backdoor“-Cysteins im Loop des CH2A-Motivs zum aktiven Zentrum ist ausreichend gering, um eine Disulfidbrücke mit dem katalytischen Cystein ausbilden zu können. In einigen Kristallen wurde tatsächlich an dieser Stelle eine Elektronendichte beobachtet, die einer Disulfidbrücke entspricht (Fauman, Cogswell et al. 1998). Für CDC25B wurde eine schrittweise Oxidation unter Beteiligung des „backdoor“-Cysteins nachgewiesen, die teilweise reversibel ist (Buhrman, Parker et al. 2005). Aufgrund von Indizien bei in-vivo-Studien wird davon ausgegangen, dass Zellzyklus-Regulation durch ROS tatsächlich direkt an CDC25 ansetzt (Rudolph 2005). Dies wurde auch für das CDC25-Analog Mih1p aus *S. cerevisiae* in vivo gezeigt (Seth und Rudolph 2006). Des Weiteren wurde nitrosativer Stress als direkter Regulator von CDC25 nachgewiesen (Tomko und Lazo 2008).



Vergleich mit anderen Phosphatasen

Die geringe allgemeine Sequenzhomologie der PTPs der Klassen 1 bis 3 einerseits, die starke Konservierung des aktiven Zentrums andererseits, wirft die Frage nach Unterschieden und

Einleitung

Gemeinsamkeiten struktureller Parameter wie allgemeiner Fold, Topologie und Eigenschaften des aktiven Zentrums auf. Als Beispiele werden CDC25A_kat (pdb-Code: 1c25), VHR (pdb-Code:1vhr) und die LMW-PTP (pdb-Code: 5pnt) verglichen. Die beiden wichtigsten Klassifizierungsmodelle für die Verwandtschaft von Proteinen basierend hauptsächlich auf den Tertiärstrukturen sind SCOP⁷ und CATH⁸. Beide Datenbanken sortieren diese in die Klasse der α/β -Proteine ein, danach wird allerdings schnell differenziert. Im Falle der CATH-Klassifizierung, die in vier Hauptebenen unterteilt, ergibt sich folgendes: Die übergeordnete Klasse, die auf der Zusammensetzung der Sekundärstrukturelemente beruht, ist für alle drei „alpha beta“. Die zweite Ebene, die Architektur, beruht auf der Orientierung der Sekundärstrukturelemente zueinander, wobei die Verknüpfung bewusst außen vor gelassen wird. Hier beginnt die Differenzierung, VHR wird bereits in die Kategorie „Alpha-Beta Complex“ sortiert, während die anderen beiden als „3-Layer(aba) Sandwich“ klassifiziert werden. VHR wird dann die Topologie „Protein-Tyrosine Phosphatase; Chain A“ zugewiesen und in die homologe Superfamilie der „Protein tyrosine phosphatase superfamily“ eingeordnet. Diese letzte Kategorisierung basiert sowohl auf struktureller als auf sequentieller Verwandtschaft der Proteine. Die Topologie LMW-PTP ist der „Rossmann fold“, der bei verschiedensten Proteinen vorliegt und dem daher bei 137 gelösten Strukturen 118 Superfamilien angehören. CDC25_kat schließlich hat die Topologie „Oxidized Rhodanese, domain 1“, die gleichzeitig eine eigene Superfamilie bildet. Das bedeutet, dass alle Proteine mit diesem Fold auch evolutionär stark verwandt sind.

Die unmittelbare Umgebung des aktiven Zentrums, das β -Faltblatt-Loop- α -Helix-Motiv ist bei allen Phosphatasen vorhanden und das aktive Zentrum hat eine sehr ähnliche Konformation. Allerdings gibt es bei den Klasse 1-Phosphatasen ein wichtiges Strukturmerkmal, das bei den CDC25-PTPs fehlt: Den WPD-Loop, der nahe des aktiven Zentrums liegt und verschiedene Konformationen zwischen offen und geschlossen einnehmen kann (Barr, Ugochukwu et al. 2009). Er ist für die Substraterkennung und Katalyse von sehr wichtiger Bedeutung.

1.2.2 Funktion

Reaktionsmechanismus

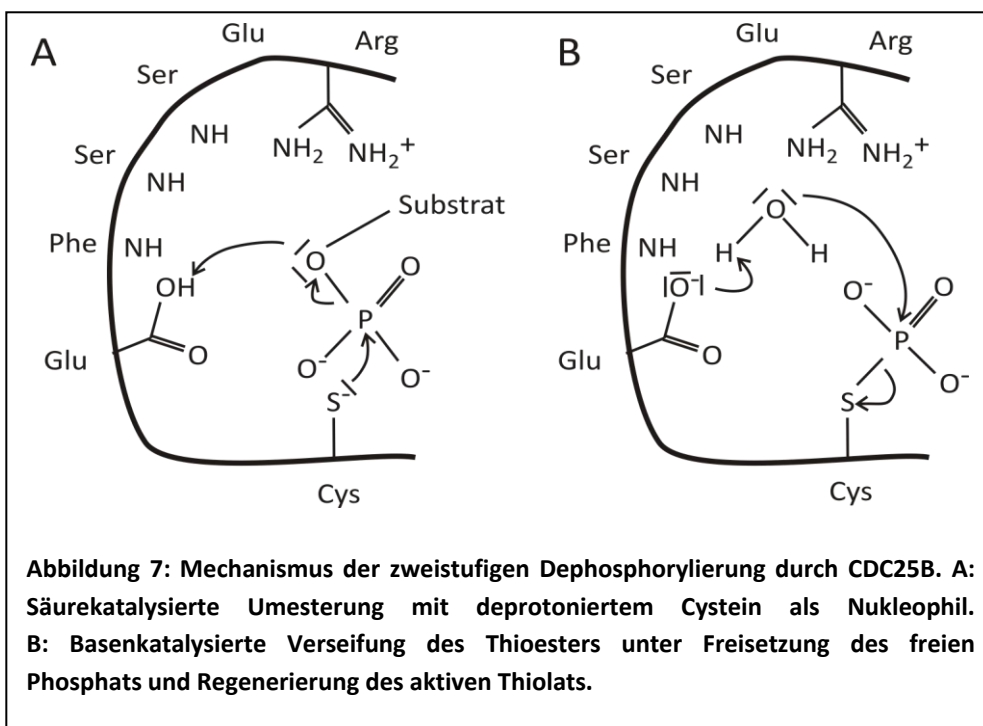
Die Dephosphorylierung durch die PTPs der Klasse 1 bis 3 erfolgt durch eine zweistufige Reaktion. Im ersten Schritt erfolgt der nukleophile Angriff des deprotonierten Cysteins am Phosphat des Substrates bei gleichzeitiger Übertragung eines Protons auf den Sauerstoff der Esterbindung zum

⁷ <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>

⁸ <http://www.cathdb.info/>

Substrat, woraufhin die Bindung zwischen Sauerstoff und Phosphor bricht. Das Substrat geht in protonierter Form ab und verlässt die Bindungstasche. Die Rückreaktion zur Wiederherstellung des katalytischen Cysteins ist eine basenkatalysierte Verseifung des Phosphothioesters. Ein Proton eines Wassermoleküls, das in die Bindungstasche eintritt, wird durch ein freies Elektronenpaar der deprotonierten Säure, die im ersten Schritt das Proton bereitstellte, angegriffen. Das OH^- -Ion greift nun als Nukleophil den Phosphor an, woraufhin die Schwefel-Phosphor-Bindung bricht, das freie Phosphat verlässt das aktive Zentrum.

Wichtig für die genaue Charakterisierung des Mechanismus ist die Natur der Säure, die das Proton für den ersten Schritt bereitstellt. Mehrere Möglichkeiten kommen hier in Betracht. Am logischsten als Protonendonator ist eine Aminosäureseitenkette der Phosphatase selbst, klassischerweise protoniertes Aspartat oder Glutamat aus sequentieller oder räumlicher Nähe. Ebenso kann aber auch eine Seitenkette des Proteinsubstrats als Protonendonator fungieren, dies kann ein Mechanismus sein, zusätzliche Substratspezifität zu erzielen. In diesem Fall können falsche Substrate zwar binden, die Reaktion läuft aber nicht ab. Als dritte Möglichkeit kommt das Phosphat selbst in Betracht. In diesem Fall muss es aber als Monoanion in der Bindungstasche vorliegen, was bei *in vivo*-Bedingungen eher unwahrscheinlich ist. Schließlich könnte auch ein Wassermolekül selbst als Protonendonator fungieren, da gibt es weitere Differenzierungen, entweder den direkten Angriff des im ersten Schritt gebildeten OH^- -Ions auf das Phosphat oder die Deprotonierung eines neu eingetretenen Wassermoleküls durch das stabil gebundene OH^- -Ion, woraufhin ersteres als Nukleophil angreift.



Einleitung

Im Falle der Klasse 1-Phosphatasen ist dies im Allgemeinen das Aspartat des WPD-Loops, der sich nach Substratbindung in Richtung aktives Zentrum bewegt und dieses verschließt („closed conformation“). Da dieser bei den CDC25-PTPs fehlt, war lange unklar, woher das Proton für die Protonierung der Abgangsgruppe stammt. Computersimulationen für die Reaktion von CDC25B mit dem natürlichen Substrat CDK2-pTpY/Cyclin A haben das dem Cystein benachbarte Glutamat identifiziert (Arantes 2008), beim klassischen Assay-Substrat pNPP wurde durch Simulationen ein Mechanismus gefunden, der ohne katalytische Säure auskommt (Parks, Hu et al. 2009).

In Abbildung 7 wird die Reaktion mit dem benachbarten Glutamat als Säure dargestellt. Die Darstellung zeigt außerdem, dass durch die Konformation des P-Loops die Rückgrat-NHs von Phenylalanin und den beiden Serinen nach innen gerichtet sind. Dies dient der Koordinierung des Phosphats, auch die beiden NH₂-Gruppen des Arginins sind daran beteiligt.

Strukturelle Basis für Substratinteraktion

Eine Fülle von kleinen Molekülen kann von den CDC25-PTPs dephosphoryliert werden, üblicherweise werden das bereits genannte para-Nitrophenylphosphat (pNPP) oder 3-O-methyl-Fluoresceinphosphat (OMFP) in *in-vitro*-Studien als auch in den Hochdurchsatz-Assays zur Entdeckung von Inhibitoren verwendet. Phosphorylierte Peptide können auch als Substrat dienen, allerdings unterscheiden sich die Raten bei Peptiden mit zufälliger Sequenz und solchen, die natürlichen Substraten nachempfunden sind, nicht signifikant (Rudolph, Epstein et al. 2001). Also stellen anscheinend weder das aktive Zentrum noch die unmittelbare Umgebung hohe Anforderungen an das Substrat. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Spezifität auf Interaktionen zwischen Enzym und Substrat weitab des aktiven Zentrums beruhen. Im Falle von CDC25B und CDK2/Cyclin A-Komplex konnte eine derartige sekundäre Interaktionsfläche gefunden werden.

Durch Mutation von insgesamt 13 Aminosäureresten auf der Oberfläche von CDC25B wurden die Einfachmutanten Arg488Leu und Tyr497Ala identifiziert, die die Aktivität gegenüber natürlichem Substrat jeweils um einen Faktor von über 100 herabsetzen. Die Dephosphorylierung des künstlichen Substrats pNPP hingegen wurde nicht beeinträchtigt. Der Verlust der *in-vivo* Aktivität konnte sowohl in *Xenopus laevis* als auch in *S. cerevisiae* nachgewiesen werden (Sohn, Kristjansdottir et al. 2004). Durch „rigid-body-docking“ der Kristallstrukturen von CDC25B und CDK2/Cyclin A mit anschließender MD-Simulation wurde eine Interaktionsfläche definiert, die Arg488 und Tyr497 enthält, darüber hinaus den noch nicht getesteten Rest Arg492. Dessen Wichtigkeit für die Interaktion wurde wiederum *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen. Zusätzlich wurde in gleicher Weise auf CDK2 der Rest Asp206 identifiziert (Sohn, Parks et al. 2005). Die Rolle der verschiedenen „Hotspot“-Reste und des aktiven Zentrums auf Reaktionsrate, Affinität, Bindungs- und Dissoziationsraten stellt sich

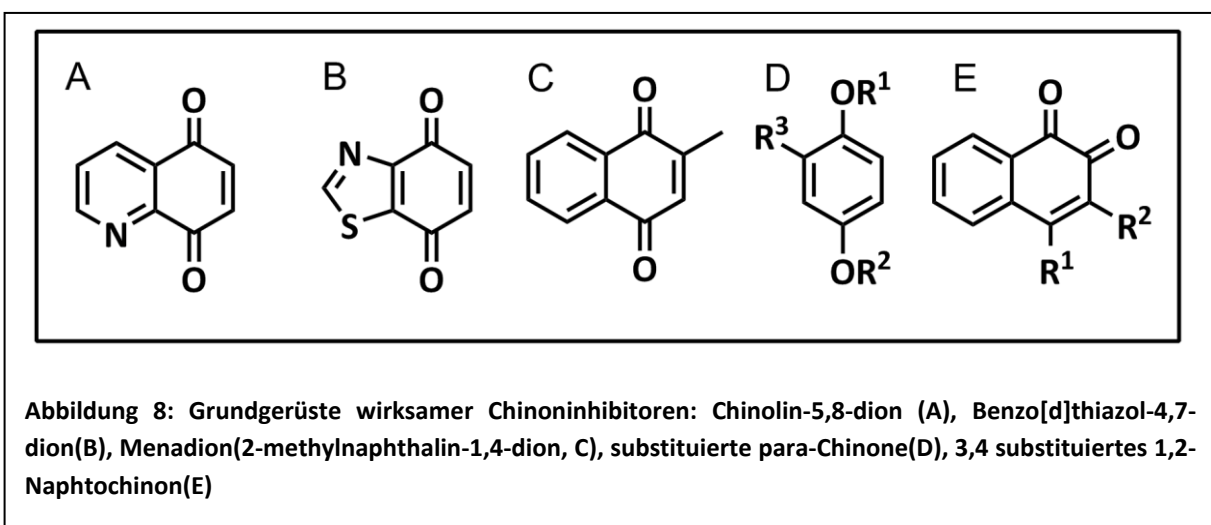
folgendermaßen dar: Grundsätzlich ist CDK2-pTpY/Cyclin A ein „sticky substrate“, d.h. im Vergleich zur Reaktionsgeschwindigkeit der Übertragung des Phosphats auf das aktive Cystein ist die Freisetzung des dephosphorylierten CDK2/Cyclin A langsam. Mutation der „Hotspot“-Reste führt zu einer deutlich verlangsamten Assoziation der Reaktionspartner (70 bis 4500-fach) und manchmal zu einer reduzierten Rate der Phosphatübertragungsreaktion. Die Dissoziationsrate der Reaktionspartner hingegen wird durch Interaktionen des aktiven Zentrums beherrscht, hier konnte durch die Mutation Cys473Asp trotz geringer struktureller Veränderungen k_{off} ums 200-fache erhöht werden (Sohn, Buhrman et al. 2007).

Inhibitoren der Enzymaktivität

Die Klassifizierung der Inhibitortypen erfolgt zum Teil auf Grund des Wirkmechanismus, zum Teil auf der chemischen Grundstruktur. Primär drei verschiedene Wirkmechanismen sind bei den Inhibitoren zu finden: Inaktivierung durch Reduktion des aktiven Zentrums, durch elektrophile Addition am aktiven Zentrums oder durch Blockade des aktiven Zentrums durch Substratanaloga. Die erste große Gruppe der CDC25A-Inhibitoren basiert auf einem Chinongerüst, dieses hat einerseits die Möglichkeit Redoxzyklen zu durchlaufen und kann andererseits als Elektrophil reagieren.

Inhibitoren basierend auf Chinon-Strukturen

Über die Hälfte der beschriebenen CDC25-Inhibitoren basieren auf einer para-Chinoidstruktur, zusätzlich existieren einige aktive ortho-Chinone. Üblicherweise sind hier an den Chinon-Ring weitere Zyklen fusioniert, diese enthalten oft hetero-Atome. Die para-Chinone-Strukturen können aber auch als substituierte Monozyklen auftreten. Abbildung 8 zeigt verschiedene Grundstrukturen, die bei potenten Inhibitoren vorliegen. Zusätzlich zu den Chinolin-dionen (Abbildung 8, A) gibt es auch einige Isochinolin-dione (Struktur nicht gezeigt), die Platzierung des Stickstoffs im Ring ist dabei aber nicht



Einleitung

beliebig. Zusätzlich unterscheiden sich aktive Substanzen dieser Grundstrukturen auch in den Substitutionsmustern. Dass die Form des Pharmakophors nicht ausreichend für die Aktivität ist, wurde an den Benzothiazol-dionen (Abbildung 8, B) nachgewiesen (Lavergne, Fernandes et al. 2006). Die Struktur des Inhibitors BN82685 wurde im Fünfring variiert. Wird der Schwefel durch einen Sauerstoff ersetzt, bleibt die Aktivität erhalten, bei Ersatz durch Stickstoff nicht. Auch der Übergang vom Benzothiazol-dion zum Indazol-dion, bzw. Isoindol-dion führt zum Aktivitätsverlust.

Auch 1,4-Naphtochinone, insbesondere Derivate von Menadion (Vitamin K) (Abbildung 8, C) zeigen inhibierende Wirkung. Der Wirkmechanismus ist allerdings hier auch je nach Substitutionsmuster unterschiedlich. Sowohl Arylierung des aktiven Cysteins (Ham, Choe et al. 2004) als auch die selektive Oxidation (Cao, Foster et al. 2005) werden angenommen. Um zu verhindern, dass die Chinone allgemein durch Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) den Arrest des Zellzyklus auslösen, wurden des Weiteren Sulfonanaloga ohne Chinonfunktion synthetisiert. Diese können sowohl *in vitro* inhibierend gegenüber CDC25A wirken als auch in Tumorzellen Apoptose oder G₁-Arrest auslösen (Kar, Wang et al. 2006). Darüber hinaus gibt es einige Hydrochinonderivate (Abbildung 8, D) die Inhibitoren für CDC25A sind, aber auf vier getestete Phosphatasen keine Wirkung zeigen (Erdogan-Orhan, Sener et al. 2004)

Der großen Zahl an para-Chinoid-Strukturen stehen nur wenige ortho-Verbindungen gegenüber, basierend auf einem an Position 3 und 4 substituierten 1,2-Naphthochinon (Abbildung 8, E) oft mit weiteren Zyklen fusioniert. Per Hochdurchsatz-Assay konnte ein gegenüber VHR und PP2A2 sehr selektiver Inhibitor von CDC25A, B und C identifiziert werden (Brisson, Nguyen et al. 2004), der außerdem nur geringe Inhibition gegenüber PTP1B zeigt. Die Affinität gegenüber den CDC25 ist zwar geringer als die anderer Substanzen (ca. 10 µM), allerdings ist die Aktivität im zellulären Assay eines reversiblen Inhibitors äußerst selten und daher besonders bemerkenswert. Bei einer Suche nach PTP1B-Inhibitoren basierend auf 1,2-Naphthochinon-Basis zeigte die Substanz mit der höchsten Aktivität allerdings auch eine starke Affinität gegenüber CDC25B, anscheinend basiert die Inhibitionswirkung auf direkter Interaktion mit dem aktiven Zentrum, das bei beiden Phosphatasen sehr ähnlich ist (Cheon, Kim et al. 2004). Huang et. al. (Huang, Jiang et al. 2005) evaluierten die biologische Aktivität von Tanshinon-Derivaten. Diese basieren auf Substanzen, die aus der Wurzel von *Salvia miltiorrhiza* Bunge, einem Präparat aus der traditionellen chinesischen Medizin, gewonnen werden. Schließlich wurde das Naphthopyran-dion ARQ-501 im Jahr 2004 in klinischen Studien der Phase 1 für die Behandlung von soliden Tumoren getestet (Craig, Shapiro et al. 2004).

Phosphatanaloga, elektrophile Inhibitoren und andere

Neben der Klasse der chinoiden Inhibitoren zeigen Substratanaloga mit oder ohne Phosphorgruppe, elektrophile Substanzen, Inhibitoren mit mehreren Funktionalitäten und Moleküle, deren Wirkmechanismus nicht klar definiert werden kann, durchaus starke Affinität und Selektivität für CDC25-Phosphatasen. Oftmals sind Naturstoffe oder Substanzbibliotheken Ursprung der Ausgangsverbindungen für die weitere Optimierung.

Ein potenter Inhibitor, der als Substratmimetikum wirkt, wurde durch Kombination des hydrophoben Teils von Vitamin D₃ und des polaren Teils von Dysidiolid erzeugt. Als Analog der Phosphatgruppe ist hier die γ -hydroxy-Butenolid-Funktion eingesetzt. Der IC₅₀ gegenüber CDC25A und B liegt hier im einstelligen mikromolaren Bereich (Shimazawa, Suzuki et al. 2004). Ein weiterer Inhibitor auf Naturstoffbasis, welcher wahrscheinlich als Substratanalogon wirkt, ist ein Sesterterpenoid aus einer Seeanemone. Der Wirkmechanismus wird abgeleitet aus den Tatsachen, dass die Inhibition allein gegen die katalytische Domäne gerichtet ist, die Wirkung nicht vom Redoxmilieu (DTT) abhängt und am Ende der Terpenoidkette eine Maleinsäurefunktion sitzt, die als Ladungsträger die Phosphatgruppe imitiert (Cao, Foster et al. 2005). Weitere Substratmimetika konnten durch „Molecular modelling“ (Bäurle, Blume et al. 2004) oder bei der Suche nach PTP1B-Inhibitoren (Cheon, Kim et al. 2004) gefunden werden.

Eine weitere Möglichkeit, Cystein-basierte Phosphatasen zu inaktivieren, ist der Einsatz von Elektrophilen, die in der Lage sein sollten, das aktive Thiolat abzufangen. Einige Inhibitoren mit starker *in-vitro* und *in-vivo*-Aktivität sind bekannt. Fascaplysin, das auch aus einer Seeanemone stammt, ist bekanntermaßen antimikrobiell, cytotoxisch und gegen Malaria wirksam. Außerdem inhibiert es CDC25B innerhalb der katalytischen Domäne mit einstellig mikromolaren IC₅₀, wahrscheinlich über das Cystein im aktiven Zentrum (Cao, Foster et al. 2005). Ein weiteres Elektrophil das sehr starke Aktivität sowohl *in vitro* wie *in vivo* zeigt, ist PM-20, eines von einer Reihe von N-Aryl-Maleinimid-Derivaten (Kar, Wang et al. 2006). Da die Maleinimid-Derivate sowohl gute Elektrophile als auch spezifische Modifikationen von Thiolgruppen sind, wird angenommen, dass sie eine kovalente Bindung mit dem aktiven Zentrum eingehen.

TPY-835, durch HTS einer chemischen Bibliothek entdeckt, kann sowohl als Nukleophil als auch als Substratanalogon betrachtet werden. Als Zimtsäure-Derivat kann es sowohl als Michael-Akzeptor wirken, als auch mit der polaren Carboxyl-Gruppe das aktive Zentrum blockieren. Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt. Allerdings zeigt es eine deutlich wachstumshemmende Wirkung bei verschiedenen Krebszelllinien als auch bei in Mäusen xenotransplantierten humanen Lungenkarzinomen. Die Spezifität in *in-vitro*-Tests ist nicht ganz klar: Während CDC25A und B, aber

Einleitung

nicht C, stark inhibiert werden, wirkt es außerdem gegen die DSP VHR. Die wichtige Abgrenzung gegenüber den Thr/Ser-Phosphatasen (hier PP1 und PP2A) ist allerdings gegeben.

Ein weiterer interessanter Fall ist der CDC25B-Inhibitor EK-6136 (Kim, Kwon et al. 2005) mit mikromolarer Affinität. Er ist gegenüber einer Reihe von Phosphatasen, darunter CDC25A, selektiv und wirkt durch erhöhte CDK1-Phosphorylierung antiproliferativ bei mehreren Krebszelllinien. Über diese gute Wirksamkeit hinaus ist der Mechanismus der Inhibition interessant: Anscheinend kommt es nicht zu kovalenter Modifikation des aktiven Cysteins (reversible Inhibition) und die Bindung kommt sowohl am freien Enzym als auch am Enzym-Substrat-Komplex zustande. Möglicherweise kommt es zu einer elektrostatischen Interaktion mit einer anionischen Stelle auf der Enzymoberfläche, dies könnte dann zu Inaktivierung des Enzyms führen.

Inhibition der Protein-Substrat-Interaktion

Die beiden wichtigen Größen bei der Inhibition, Affinität und Spezifität, stehen sich oftmals gegenüber. Die Blockierung oder kovalente Modifikation des aktiven Zentrums ist sicherlich die „logischste“ Möglichkeit, da das betroffene Cystein ja bereits aktiviert vorliegt und daher gut zugänglich ist. Da aber die aktiven Zentren verschiedener DSPs so ähnlich aufgebaut sind, führt dies meist zu promiskuitiven Inhibitoren, die nicht mehr besonders spezifisch sind. Also ist man bei den Inhibitoren grundsätzlich auf sekundäre Wechselwirkungen angewiesen. Anstatt nun auf die Enzymaktivität als solche abzielen, wäre das Verhindern der Assoziation mit dem Substrat für einen Verlust der Steuerungsfunktion der CDC25-Phosphatasen ausreichend. Da sich außerdem die Substrate der CDC25-Phosphatasen im Verlauf des Zellzyklus ändern, wäre theoretisch eine noch gezieltere Funktionskontrolle möglich.

Der letzte im Abschnitt vorher genannte Inhibitor, EK-6136, scheint zumindest nicht mehr direkt das aktive Zentrum zu blockieren, sondern entweder die Enzymaktivität durch eine an anderer Stelle induzierte Strukturänderung herbeizuführen oder die Interaktion mit dem Substrat zu stören. Es gibt einige Beispiele von Inhibitoren einer transienten Protein-Protein-Interaktion, allerdings nicht für Phosphatasen. Ein Beispiel bieten die Nutlins, die den Tumorsuppressor p53 vor Abbau schützen, indem sie die Interaktion mit „murine double-minute 2“ stören (Vassilev, Vu et al. 2004). Diesen und einigen anderen Beispielen ist gemein, dass sie durch Einlagern in eine Vertiefung in der Proteinoberfläche spezifische Kontaktstellen stören. Da sich auf der Oberfläche der CDC25-Phosphatasen eine vergleichbare Vertiefung in direkter Nachbarschaft zu den oben beschriebenen Hotspots der Substraterkennung befindet, besteht die Hoffnung, diese für eine Inhibition nutzen zu können. Die große Schwierigkeit liegt nun in der Aufgabe, solche Substanzen gezielt zu entwickeln oder einen Screen auf eine solche disruptive Aktivität zu etablieren. So müssen üblicherweise

zusätzliche Methoden mit den klassischen Hochdurchsatz-Assays kombiniert werden. Im Falle der Nutlins wurde Computer-Modelling verwendet, um diese Inhibitoren der Kontaktstelle zu finden. Eine weitere Möglichkeit, dieses Problem anzugehen, ist die Verwendung fragmentbasierter Ansätze, beispielweise durch kovalente Verknüpfung mit Hilfe von Thiolgruppen (Erlanson, Wells et al. 2004) oder mit Unterstützung durch NMR-Spektroskopie (Schlagwort: "SAR by NMR") (Shuker, Hajduk et al. 1996).

1.3 NMR-Methoden

1.3.1 Grundlagen

Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR) ist eine sehr wichtige Methode, um Biomakromoleküle, z.B. Proteine, bezüglich Struktur, Dynamik und Interaktionen mit anderen Molekülen zu untersuchen. Dies ist im Gegensatz zu den meisten anderen Spektroskopietechniken in atomarer Auflösung möglich. Gegenüber der Röntgenkristallografie, mit Hilfe deren weitaus mehr dreidimensionale Strukturen gelöst worden sind und der deutlich größere Molekülkomplexe zugänglich sind, hat die NMR-Spektroskopie den Vorteil, dass die zu untersuchenden Moleküle in Lösung vorliegen. Eine wesentliche Herausforderung ist die geringe Sensitivität der NMR-Spektroskopie, die sehr hochkonzentrierte Proben erfordert, klassischerweise im millimolaren Bereich. Bei diesen Konzentrationen stoßen viele Proteine an die Löslichkeitsgrenze, außerdem werden große Mengen an Protein benötigt. Dies bedingt eine gewissenhafte Optimierung von Proteinproduktion und Probenbedingungen. Zur Erhöhung der Sensitivität werden stark gekühlte Kryoprobenköpfe eingesetzt, die das thermische Rauschen bei der Aufnahme der Signale reduzieren. Die Entwicklung von Magneten mit immer höheren Feldstärken (über 20 Tesla, ca. das Millionenfache des Erdmagnetfeldes) erhöhte sowohl die Sensitivität als auch die Auflösung. Dies ermöglicht neben dem Einsatz geringer konzentrierter Proben die Untersuchung größerer Moleküle, deren Spektren bei geringeren Feldstärken wegen Signalüberlagerung nicht mehr aussagekräftig analysiert werden können. Die Einschränkungen der NMR-Spektroskopie bezüglich großer Moleküle beruhen aber auch auf deren langsamerer Rotation (Erhöhung der Korrelationszeit τ_c) in Lösung, die durch unvollständige Ausmittelung anisotroper Effekte zu Signalverlusten führt.

Für die NMR-Spektroskopie an Proteinen werden üblicherweise die Kerne ^1H , ^{13}C , ^{15}N (in geringerem Maße auch ^{19}F und ^{31}P) benutzt, die durch ihren Kernspin $\frac{1}{2}$ gut zugänglich sind. Inaktive Kerne wie ^{12}C geben überhaupt kein Signal, während Kerne mit höheren Spinquantenzahlen komplizierte Signalformen aufweisen. Die Stärke des magnetischen Moments μ , Grundlage für die Interaktion mit dem Magnetfeld, ergibt sich als Produkt aus Spin und gyromagnetischem Verhältnis γ . Dieses ist eine

Einleitung

intrinsische Eigenschaft eines Kerns und geht in viele Effekte mit ein. Im Folgenden werden die fünf wichtigsten beobachtbaren Größen der NMR-Spektroskopie dargestellt.

Chemische Verschiebung

Die chemische Verschiebung δ ist der wichtigste Parameter, sie beruht auf der Larmorfrequenz ω eines aktiven Kerns im Magnetfeld. Da letztere von der Feldstärke abhängig ist, wird erstere als Frequenzabweichung bezogen auf eine Referenzsubstanz normiert auf die Frequenz der Referenzsubstanz angegeben. Im Ergebnis ist δ dann eine dimensionslose Größe und liegt im Bereich von ppm (parts per million). Die chemische Verschiebung ist sehr sensitiv gegenüber der lokalen Umgebung, da die umgebenden Elektronen ein geringes Magnetfeld erzeugen, welches sich mit dem Spektrometerfeld überlagert - dieses abschirmt - und so die Larmorfrequenz verändert. So ergeben sich für verschiedene funktionelle Gruppen typische chemische Verschiebungen, die durch weitere lokale Begebenheiten weiter differenzieren. Bei Proteinen lassen sich daraus in gewissem Maße Sekundärstrukturelemente ableiten, z.B. mit Hilfe des CSI (Chemical Shift Index) (Wishart, Sykes et al. 1992) oder von PSSI (Probability-based protein Secondary Structure Identification using combined NMR chemical-shift data) (Wang und Jardetzky 2002). Auch eine Vorhersage der Proteinerückgrat-Torsionswinkel durch die Software TALOS (Torsion Angle Likelihood Obtained from Shifts and sequence similarity) ist möglich (Cornilescu, Delaglio et al. 1999). Zusätzlich kann man anhand δ bereits Aussagen über die lokale Dynamik treffen. Liegen zwei (oder mehr) Konformationen nebeneinander vor, bestimmt das Verhältnis aus Austauschrate k_{ex} und der Differenz der Larmorfrequenzen $\Delta\omega$ das Aussehen des Spektrums. So führt der schnelle Wechsel zwischen verschiedenen Konformationen ($k_{ex}/\Delta\omega < 1$) zu einer scharfen Linie bei gemittelter Frequenz, während bei langsamem Austausch ($k_{ex}/\Delta\omega > 1$) für beide Zustände ein eigenes Signal beobachtbar ist. Liegt die Austauschrate im mittleren Zeitbereich ($k_{ex}/\Delta\omega = 1$) kommt es zur Signalverbreiterung, die zum Verschwinden der Signalintensität im Grundrauschen führt (Millet, Loria et al. 2000). Dieser Signalverlust stellt ein großes Problem für die Analyse von NMR-Spektren dar.

Spin-Spin-Kopplung (J-Kopplungskonstante)

Die nJ -Kopplung (auch Spin-Spin- oder skalare Kopplung) ist eine über die Bindungselektronen vermittelte Wechselwirkung zwischen zwei Kernen, die n Bindungen voneinander entfernt sind. Diese Wechselwirkung führt zu geringen Energieunterschieden der verschiedenen Spinzustände eines derart gekoppelten Systems, welche sich in einer Aufspaltung der Signale manifestiert. Die resultierende Multipllettstruktur ist abhängig von der Zahl der NMR-aktiven benachbarten Kerne und spiegelt die Zahl der zugänglichen Spinzustände wider. Die Stärke der skalaren Kopplung, die J-Kopplungskonstante lässt sich aus den Abständen der Peaks im Multipllett ablesen. Für die

Konformationsbestimmung von Biomolekülen lässt sich besonders die 3J -Kopplung nutzen, da diese durch die Karplusbeziehung $^3J(\phi) = A \cdot \cos^2\phi + B \cdot \cos\phi + C$ mit dem Torsionswinkel ϕ verknüpft ist (Karplus 1959). A, B, und C sind entweder empirisch oder durch quantenchemische Berechnungen definiert. Da eine gegebenen 3J -Kopplung bis zu vier Torsionswinkel möglich sind, müssen mehrere komplementäre 3J -Kopplungen gemessen werden, um diese Degeneration aufzuheben, üblicherweise werden so die Proteinrückgratwinkel ϕ und ψ bestimmt.

Dipolare Kopplung und Kern-Overhauser-Effekt

NMR-aktive Kerne erzeugen ein lokales Magnetfeld, dieses wird von anderen, räumlich sehr nahen, Kernen wahrgenommen. Über diese Interaktion kann ohne Bindung durch den Raum Magnetisierung übertragen werden, dieses bezeichnet man als Kern-Overhauser-Effekt (Nuclear Overhauser Effect, NOE) (Overhauser 1953). Die Stärke der Wechselwirkung wird durch die dipolare Kopplung D_{AB} (auch: Dipol-Dipol-Kopplung) ausgedrückt. Sie hängt ab vom Abstand der Kerne ($1/r_{AB}^3$) und der Orientierung ($3 \cdot \cos^2\theta_{AB} - 1$; θ_{AB} bezeichnet den Winkel zwischen der Richtung des äußeren Magnetfeldes und der Verbindungslinie zwischen beiden Kernen). In isotropischer Lösung sollte sich daher die dipolare Kopplung durch Eigenrotation des Moleküls vollständig ausmitteln, dies ist aber selten der Fall. Die kurzfristige Fixierung von θ_{AB} reicht aus, um über die Dipol-Dipol-Wechselwirkung Magnetisierung zu übertragen. Der resultierende NOE ist direkt proportional zum Quadrat der jeweiligen gyromagnetischen Verhältnisse ($(\gamma_A \gamma_B)^2$) und umgekehrt proportional zu r_{AB}^6 . Daher ist der NOE am stärksten zwischen Protonen (hohes γ), für diese ist er normalerweise bis zu einem Abstand von 5 Å beobachtbar.

Restdipolkopplung

Ist normalerweise eine schnelle Eigenrotation der untersuchten Biomoleküle zur Ausmittlung anisotroper NMR-Effekte erwünscht, kann man durch gezieltes Beeinflussen der Ausrichtung im Magnetfeld Restdipolkopplungen wieder einführen. Ursprünglich wurde die natürliche Anisotropie der magnetischen Suszeptibilität verwendet, z.B. bei Proteinen mit paramagnetischen Zentren durch Einführung von Lanthaniden in natürliche Kationen-Bindungsstellen (Lee und Sykes 1981). Reichen die natürlichen Eigenschaften dafür nicht aus, kann man dies durch die Verwendung von speziellen anisotropen Medien wie Lipidbicellen, Phagen, Flüssigkristallen oder gestreckten Gelen erreichen (Prestegard, Bougault et al. 2004). In letzter Zeit wurden auch künstlich eingeführte paramagnetische Tags dafür eingesetzt (Wohnert, Franz et al. 2003; Deschamps, Pilka et al. 2005; Rodriguez-Castaneda, Haberz et al. 2006; Martin, Hahnke et al. 2007).

Einleitung

Durch diese -partielle- Ausrichtung tritt für über eine kovalente Bindung verknüpfte Spinpaare (z.B. für ein $^1\text{H}_\alpha$ - $^{13}\text{C}_\alpha$ des Proteinerückgrats) neben der skalaren Kopplung ($^1J_{\text{CH}}$) zusätzlich die Restdipolkopplung D_{CH} auf. Deren Größe ist abhängig von der Ausrichtung des Bindungsvektors relativ zum Ausrichtungstensor des Gesamtmoleküls. Diese Information kann nun eingesetzt werden, um die Ausrichtung auch weit entfernter Spinpaare relativ zueinander zu bestimmen. Dies ist in Fällen, wo keine ausreichenden Informationen aus J-Kopplungen und NOEs erhalten werden können, sehr nützlich, die 3D-Struktur eines Biomoleküls zu verbessern. Gerade bei Proteinen mit mehreren Domänen, die durch nicht besonders gut definierte Linker verbunden sind, kann so die Lage der Domänen zueinander bestimmt werden. Die Beobachtung möglicher Umorientierung von Domänen während biochemischer Prozesse wie Protein-Protein-Interaktionen oder Enzym-Substrat-Bindung, kann Einblicke in die Struktur-Funktionsbeziehung bieten (Tolman 2001; Lipsitz und Tjandra 2004).

Relaxation

Die Rückkehr der Spinnagnetisierung in den Gleichgewichtszustand wird als Relaxation bezeichnet. Der dafür nötige Austausch von Energie zwischen Spins und ihrer Umgebung wird durch zwei verschiedene Prozesse ermöglicht. Die Spin-Gitter-Relaxation kommt durch Wechselwirkung des angeregten Spins mit seiner Umgebung von nicht angeregten Spins -dem Gitter- zustande, sie führt zu einer Reduzierung der Spin-Magnetisierung parallel zum äußeren Magnetfeld, daher auch longitudinale Relaxation. Ihr wird die Relaxationszeit T_1 zugeordnet. Im Gegensatz dazu drückt die transversale Relaxationszeit T_2 die Dispersion der Magnetisierung von angeregten Spins in der Ebene orthogonal zum äußeren Magnetfeld aus. Dies wird auch als Spin-Spin-Relaxation bezeichnet. $T_{1\rho}$ bezeichnet die longitudinale Relaxationszeit im rotierenden Koordinatensystem, sie betrifft Magnetisierung, die senkrecht zum äußeren Feld „spin-gelockt“ wurde (Mulder, de Graaf et al. 1998; Mulder, van Tilborg et al. 1999).

Relaxationseffekte sind stark abhängig von der Beweglichkeit eines Moleküls. Dabei kommt es zu Überlagerung von lokalen dynamischen Prozessen und der grundsätzlichen Eigenrotation des Moleküls. Diese ist hauptsächlich von der Molekülmasse abhängig, weitere Faktoren wie z.B. Molekülform oder auch die Viskosität des Lösungsmittels kommen dazu. Diese globale Bewegung wird in der Rotationskorrelationszeit τ_c ausgedrückt, je höher τ_c , desto stärker ist die ausgelöste Relaxation.

Die Geschwindigkeit dynamische Prozesse im Molekül beeinflussen die verschiedenen Relaxationsparameter in unterschiedlicher Weise, schnelle (ps bis ns) für T_1 , schnelle und langsamere (ps bis ns und μs bis ms) für T_2 . Um den Anteil an chemischen oder konformationellen Austauschprozessen an der transversalen Relaxation, müssen die Messungen von T_2 und $T_{1\rho}$

miteinander kombiniert werden. Dies geschieht entweder durch die Carr-Purcell-Meiboom-Gill-Pulsfolge (kurz CPMG) (Carr und Purcell 1954; Meiboom und Gill 1958) oder durch ein Spin-Lock-Feld (Ishima und Torchia 1999; Meekhof und Freund 1999; Millet, Loria et al. 2000). Für die Untersuchung von dynamischen Prozessen mit einer langsamen Zeitskala (μs bis ms) wurden Experimente zur Messung der Relaxations-Dispersion entwickelt (Cavanagh und Venters 2001; Mulder, Mittermaier et al. 2001; Mulder, Skrynnikov et al. 2001; Tollinger, Skrynnikov et al. 2001; Ishima und Torchia 2003; Ishima, Baber et al. 2004).

Zur Untersuchung der schnellen Dynamik (ps bis ns) von kovalenten Bindungen zwischen Protonen und Heterokernen wie ^{13}C und ^{15}N wird der NOE verwendet. Er ist maximal, wenn der Bindungsvektor in Einklang mit der allgemeinen Eigenrotation des Moleküls taumelt, ist die Beweglichkeit der Bindung größer, verringert sich der gemessene heteronukleare NOE (kurz hetNOE). Werden HSQC-Spektren (siehe Seite: 32) mit Sättigung der Protonen gemessen, kommt es entsprechend der Stärke des hetNOE zur Verringerung der Signalintensität. Aus deren Differenz im Vergleich zum ungesättigten Spektrum lässt sich der hetNOE bestimmen.

Aufgrund dieser vier Parameter von Relaxationseffekten kann man Aussagen über die konformationelle Dynamik eines Biomoleküls treffen. Für unstrukturierte und/oder flexible Bereiche des Moleküls ergeben sich höhere Werte für T_2 und $T_{1\rho}$ und niedrigere Werte für T_1 und hetNOE im Vergleich zum stärker strukturierten und weniger beweglichen Inneren des Moleküls. Bei Proteinen werden typischerweise die ^{15}N - ^1H -Bindungen des Rückgrates verwendet. Dies kann man insbesondere dafür verwenden, Veränderungen der Beweglichkeit aufgrund von Protein-Ligand-Bindung zu verfolgen.

Um aus diesen Daten den allgemeinen Orderparameter S^2 für die einzelnen Bindungsvektoren zu erhalten, werden diese einer Analyse per „model-free“ unterzogen (Lipari und Szabo 1982; Lipari und Szabo 1982; Mandel, Akke et al. 1996). S^2 ist ein Maß für die Bewegungsfreiheit eines Bindungsvektors, er reicht von 0 (unbeschränkt beweglich) bis 1 (komplett starr). Der Orderparameter charakterisiert dynamische Prozesse, die gleich schnell oder schneller als die Korrelationszeit τ_c ablaufen (Clare, Driscoll et al. 1990; Clare, Szabo et al. 1990).

1.3.2 Durchführung von NMR-Experimenten

Die Durchführung von NMR-Experimenten an Biomolekülen stellt folgende grundsätzliche Anforderungen an die Probe: Eine hohe Konzentration (möglichst über 500 μM) ohne die Stabilität zu beeinträchtigen, eine geringe Salzkonzentration im Puffer (kleiner als 300 mM), um die Effektivität der Radiowelleneinstrahlung nicht zu verringern und einen pH-Wert von 5 bis 7, um den chemischen Austausch von NH-Gruppen möglichst gering zu halten. Inhomogenitäten in der Probe oder im Probenröhrchen sollten vermieden werden. Für die Messung selbst ist ein homogenes -und über die Zeit stabiles- Magnetfeld und eine stabile Proben temperatur nötig. NMR-Experimente sind aufgebaut aus einigen Baueinheiten: Kurze Radiofrequenzpulse hoher Energie (ab 10 μs) führen zur Rotation bestehender Magnetisierung (z.B. 90° -Puls), lange kontinuierliche Radiofrequenzeinstrahlung niedriger Energie (Sekunden) wird z.B. dazu verwendet, Kopplungen zu unterdrücken. Je länger der Puls, desto schmaler die Anregungsbreite. Wartezeiten („Delays“) dienen der Entwicklung von Wechselwirkungen, z.B. der Übertragung von Magnetisierung per NOE, und zusätzliche Magnetfeldgradienten dephasieren die Kohärenz von Spins, dies wird verwendet um unerwünschte Magnetisierung zu unterdrücken oder um räumliche Information zu kodieren. Nach Ablauf der Pulssequenz wird der freie Induktionszerfall aufgenommen, der nach Fouriertransformation das eigentliche Spektrum liefert.

1.3.3 1D Experimente

Das einfachste NMR-Experiment besteht aus einem einzigen 90° -Puls und Aufnahme des FID. Üblicherweise werden zusätzliche Elemente ins Pulsprogramm integriert, um unerwünschte Lösungsmittelsignale und Wechselwirkungen, wie z.B. die J-Kopplung, zu unterdrücken. Im Folgenden werden die in der Arbeit verwendeten Experimente vorgestellt.

DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy)

NMR-Spektroskopie kann zur Bestimmung von hydrodynamischen Radien R_h von in der NMR-Probe gelösten Substanzen verwendet werden. Dieser skaliert direkt mit der translationalen Diffusionskonstante. Dies kann dazu verwendet werden, den Oligomerisierungszustand von Biomolekülen zu untersuchen (Ambrus, Friedrich et al. 2006), den Einfluss von Mutationen auf die Kompaktheit von Proteinen zu bestimmen (Wirmer, Schlorb et al. 2004) oder die Bindung von kleinen Molekülen an größere Moleküle durch die Veränderung des Diffusionsverhalten nachzuweisen (Laura und Cynthia 2004). Das Prinzip ist relativ einfach: Durch einen Feldgradienten entlang der Z-Achse wird die Magnetisierung in der xy-Ebene dephasiert und den angeregten Spins so eine räumliche Information aufgeprägt. Nach einer Wartezeit wird durch einen weiteren Feldgradienten die dephasierte Magnetisierung wiederhergestellt. Diffundieren die Moleküle während der Wartezeit in

z-Richtung, wird das Signal verringert. Die Wartezeit (oder die Gradientenstärke) wird variiert und die Abnahme des Signals exponentiell gefittet. Durch Vergleich mit einer Standardsubstanz (oftmals Dioxan), kann der hydrodynamische Radius berechnet werden. Eine verbesserte Pulssequenz mit mehreren Gradienten wird üblicherweise verwendet (Wu, Chen et al. 1995).

STD-NMR (Saturation Transfer Difference)

Wird zu Beginn eines NMR-Experiments längere Zeit mit niedriger Energie eingestrahlt, kommt es zu einem Sättigungseffekt. Die ursprüngliche Magnetisierung (in z-Richtung) wird dadurch zerstört, die nachfolgende Pulssequenz wird für die gesättigten Spins kein Signal erzeugen. Dies kann zur Unterdrückung von Lösungsmittelsignalen verwendet werden, aber auch zur Untersuchung der Bindung von Inhibitoren an große Biomoleküle verwendet werden. Bindet ein Inhibitor an ein großes Molekül, dessen Spins gesättigt wurden, wird diese Sättigung („Saturation“) auf ihn übertragen („Transfer“). Bildet man die Differenz zwischen Spektren mit und ohne Sättigung, lässt der Anteil des während des Experiments gebundenen Inhibitors bestimmen (Mayer und Mayer 1999). Optimalerweise ist dabei der Austausch des Liganden schnell (hohe k_{off} -Rate), damit eine ausreichende Anzahl an Molekülen gesättigt wird, außerdem wird er im Überschuss eingesetzt. Letzteres hat zwei Vorteile: Erstens ist der Anteil der aktuell gebundenen Liganden klein im Vergleich zur Gesamtpopulation, andererseits ist es so unwahrscheinlich, dass derselbe Ligand während des Experiments mehrere Male bindet. Neben dem allgemeinen Nachweis, dass eine Ligandbindung vorliegt, wird STD-NMR eingesetzt, um aus Verbindungsgemischen aktive Substanzen zu „fischen“, deren Signale nach Zugabe des Targets verschwinden. Ein Problem der STD-NMR ist die fehlende Unterscheidung zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung. Dieses Problem lässt sich lösen, wenn ein bekannter Ligand zutitriert wird, bei kompetitiver Bindung an dieselbe Stelle des Proteins wird der STD-Effekt des Zielliganden verringert (Meinecke und Meyer 2001).

1.3.4 2D Experimente

Die Entwicklung mehrdimensionaler Experimente, möglich durch die Fourier-Transform-NMR-Spektroskopie, macht eine Vielzahl von Korrelationsexperimenten möglich. Ein 2D-Experiment besteht aus einer Serie von 1D-Experimenten, in die eine Evolutionszeit integriert wird, während der die Spins frei präzessieren, diese wird inkrementiert. Während der Mischzeit wird dann die Magnetisierung über die gewünschte Wechselwirkung zwischen den Spins übertragen. Die am Ende der Sequenz aufgenommenen FIDs werden in ein Raster eingetragen. Durch Fouriertransformation in beiden Zeitdimensionen ergibt sich das 2D-Spektrum. Die Peaks auf der Diagonale entsprechen dem 1D-Spektrum, die Kreuzpeaks zeigen die Korrelationen an. Klassische homonukleare Experimente sind ^1H - ^1H COSY (COrrrelation Spectroscopy) (Aue, Bartholdi et al. 1976), bei dem die Magnetisierung

Einleitung

zu ^3J -gekoppelten Kernen übertragen wird, ^1H - ^1H -TOCSY (TOtal Correlation Spectroscopy) (Braunschweiler und Ernst 1983), bei dem die Magnetisierung über das gesamte Spinsystem untereinander ^3J -gekoppelter Kerne verteilt wird (beispielsweise eine Aminosäureseitenkette) und das ^1H - ^1H -NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) (Bax und Davis 1985), bei dem der Magnetisierungstransfer per NOE vorgenommen wird (Abbildung 10). Wichtig sind aber auch gerade heteronukleare 2D-Experimente.

HSQC

Das HSQC-Experiment dient der Korrelation von Heterokernen (in der NMR-Terminologie andere Kerne als Protonen, im Falle der Protein-NMR üblicherweise ^{15}N oder ^{13}C) mit den direkt daran gebundenen Protonen über die ^1J -Kopplung (Bodenhausen und Ruben 1980). Bei einem ^1H , ^{15}N -HSQC eines Proteins erhält man Signale der NHs der Amid-Gruppen des Rückgrats, der Seitenketten-Amide von Glutamin und Asparagin und der Seitenkette von Tryptophan. Nicht zu sehen sind der N-Terminus und die Seitenketten von Lysin und Arginin, da diese zu schnell mit dem Lösungsmittel austauschen. Anhand des HSQC kann man bereits Aussagen über die Integrität des Protein treffen, da eine zu geringe Signaldispersion insbesondere in der ^1H -Dimension auf ein ungefaltetes Protein hinweist, fehlen viele der Peaks, sind Bereiche des Proteins in Austauschprozessen involviert.

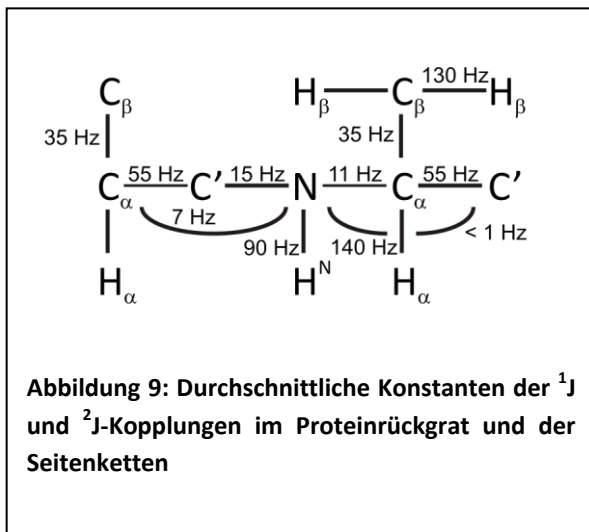
Eine sehr wichtige Anwendung des HSQC-Spektrums ist die Analyse von Wechselwirkungen und struktureller Integrität. Die Resonanzfrequenzen der Rückgrat-Amide reagieren sehr sensitiv auf Veränderungen der chemischen Umgebung. Dies kann einerseits durch die Bindung eines Inhibitors auf der Oberfläche ausgelöst werden. Andererseits können strukturelle Veränderungen, die auch abseits der Inhibitorbindungsstelle induziert werden, zu Verschiebungen der Signale führen. Dieser Effekt wird generell als „Chemical Shift Perturbation“ (CSP) bezeichnet und vielseitig genutzt.

TROSY

Das TROSY-Experiment dient der Aufnahme von ^1H , ^{15}N -Korrelationsspektren bei großen Molekülen und bei hohen Magnetfeldern. In diesem Fall kann man die vorherrschenden Relaxationsmechanismen (Dipol-Dipol-Interaktion und Anisotropie der chemischen Verschiebung) so ausbalancieren, dass eine Komponente im J-gekoppelten Multiplett einen sehr scharfen Peak ergibt (Pervushin, Riek et al. 1997). Durch Selektion dieses Peaks kann die Sensitivität und Auflösung erhöht werden, was das Studium deutlich größerer Makromoleküle zulässt. Diese Technik lässt sich auch in höher-dimensionale Spektren inkorporieren.

1.3.5 3D Experimente

Höherdimensionale Experimente sind nur eine Erweiterung des 2D-Prinzips: Durch die Einführung weiterer inkrementierter Evolutionszeiten können zusätzliche Dimensionen erreicht werden. Gerade für die Zuordnung der Atome des Proteinerückgrates sind 3D-Experimente mit ^{13}C und ^{15}N -markierten Proteinproben unverzichtbar (Sattler, Schleucher et al. 1999). Da drei verschiedene Arten von NMR-aktiven Kernen beteiligt sind, wird üblicherweise von Tripelresonanzexperimenten gesprochen. Zusätzlich kann auch noch eine Deuterierung der Aminosäureseitenketten nötig sein, um



Signalverluste durch Relaxation zu verringern. Grundsätzlich sind diese Zuordnungsexperimente eine Erweiterung des HSQC-Experiments, die Magnetisierung wird vom ^{15}N des Rückgrats (oder der Seitenketten) über ^1J - oder ^2J -Kopplungen auf ^{13}C -Kerne übertragen. Die Kopplungskonstanten für die betreffenden Kerne sind in Abbildung 9 dargestellt. Die gewünschte Art der ^{13}C -Kerne kann nun über die Stärke der Kopplung und/oder über die chemische Verschiebung selektiert werden.

HNCO

Das HNCO-Spektrum korreliert über die starke ^1J -Kopplung (ca. 15 Hz) die NH-Gruppen des Proteinerückgrats sowie der Seitenketten mit benachbarten Carbonyl-Kohlenstoffen. Dabei können aufgrund der sehr geringen intraresidualen Kopplung von Rückgrat- ^{15}N und $^{13}\text{C}'$ nur die Korrelation NH zum C' der vorhergehenden Aminosäure gemessen werden (Abbildung 10). Ohne zusätzliche Informationen über intraresiduale Korrelationen kann dieses Spektrum noch nicht zur sequentiellen Zuordnung des Proteinerückgrats verwendet werden, dient aber aufgrund seiner hohen Sensitivität der Qualitätskontrolle der Probe und kann zur Identifikation sich überlagernder Signale im HSQC-Spektrum dienen.

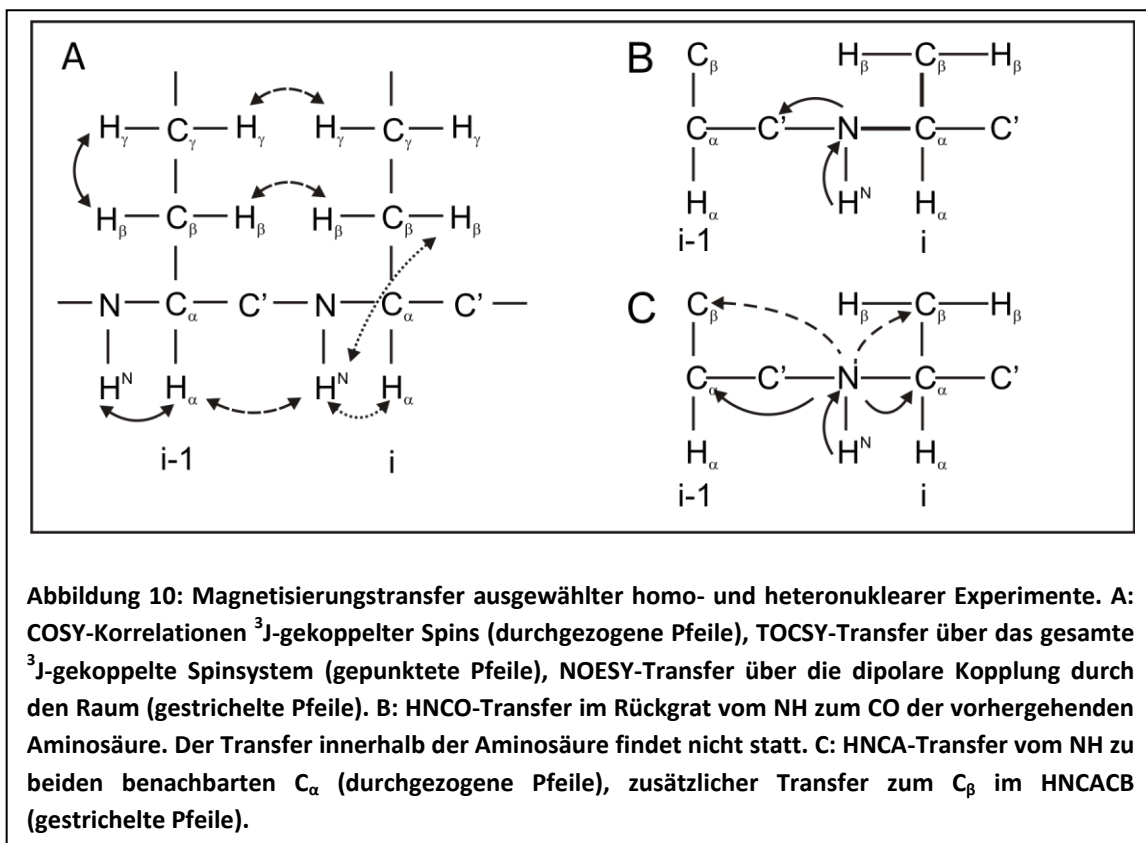
HNCA

Im HNCA-Spektrum werden die NH-Gruppen mit den C_α -Kohlenstoffatomen der eigenen Aminosäure (^1J) als auch der vorhergehenden Aminosäure (^2J) korreliert (Abbildung 10). Aufgrund der kleineren Kopplungskonstante ist das Signal des vorhergehenden C_α -Kohlenstoffs schwächer, so können unter

Umständen schon einzelne Aminosäure-Paare oder kurze Abschnitte identifiziert werden. Grundsätzlich machen sich überlagernde Signale dies aber nicht möglich.

HNCACB

Im HNCACB werden zusätzlich die C_{β} -Kohlenstoffe der Aminosäureseitenketten mit den Amidgruppen korreliert, die Unterscheidung zwischen C_{α} und C_{β} erfolgt hierbei über das Vorzeichen. Ansonsten gilt auch hier, dass die Signale der vorhergehenden Aminosäuren schwächer sind als die der eigenen Aminosäure (Abbildung 10).



2 Material und Methoden

Sofern nicht anders vermerkt, sind alle Chemikalien von p.a. Qualität. Bezogen wird von den Firmen Sigma-Aldrich/Fluka (St. Louis, MO, USA) oder Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland).

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Gelelektrophoretische Methoden

Agarose-Gelelektrophorese

Für Größenanalyse und präparative Auftrennung von Plasmiden und DNA-Fragmenten werden je nach Größe 0,8-2%ige (w/v) Agarosegelelektrophoresen durchgeführt (Sambrook und Russel 2001). Dabei ist 1x TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat pH 7,5, 1 mM EDTA) sowohl Gel- als auch Laufpuffer. Die DNA-Proben werden mit 6x Ladepuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol FF, 30% Glycerol) versetzt, aufgetragen und bei einer Spannung von 120 V aufgetrennt. Nach Färben mit Ethidiumbromidlösung (0,5 g/ml in Wasser) wird die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht. Durch Vergleich mit dem Marker 1kb DNA ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) können Größe und Konzentration bestimmt werden.

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteinproben bei Durchführung von Testexpressionen und Löslichkeitstests und während der verschiedenen Phasen der Aufreinigung wurde die SDS-PAGE nach Lämmli (Laemmli 1970) benutzt. Es werden zweistufige Gele aus Trenn- (150 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 12 bis 15% Polyacrylamid) und Sammelgel (100 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 5% Polyacrylamid) in Mini-PROTEAN-Apparaturen der Firma Biorad (Hercules, CA, USA) verwendet. Die Protein-Proben werden nach Zugabe von 4x Ladepuffer (200 mM Tris/HCl pH 6,8, 8% SDS, 0,4% Bromphenolblau, 40% Glycerol, 400 mM DTT) 5 min auf 96°C erhitzt und davon 10 bis 15 µL aufgetragen. Über Laufpuffer (25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1% SDS) wird entsprechend Herstellerangabe eine Spannung von 200 V angelegt, die übliche Laufdauer beträgt 45 min. Danach werden die Gele mit Färbelösung (0,25% Coomassie Brilliant Blue, 45% Wasser, 45% Methanol, 10% Eisessig) gefärbt und mit Wasser unter Aufkochen entfärbt. Größen- und Konzentrationsabschätzung erfolgt durch Vergleich mit Protein Marker Broad Range (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA).

2.1.2 Klonierung

Die Planung der Klonierung und die Verwaltung der DNA-Sequenzen wird mit den Programmen Clone Manager Suite Professional (Sci-Ed Software, NC, USA) und pDRAW32⁹ durchgeführt. Plasmidpräparationen wurden aus ü.N.-Kulturen von DH5 α -Zellen mit QIAprep[®] Spin Miniprep Kit oder QIAGEN[®] Midi Plasmid Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend der Protokolle des Herstellers durchgeführt.

Transformation kompetenter Zellen

Zur Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen werden diese auf Eis aufgetaut und pro Reaktion 50 μ L mit 0,5 μ L Plasmidpräparation oder 10 μ L Ligationsansatz versetzt (maximal 50 ng DNA). Nach 20 min Inkubation auf Eis, 90 s Hitzeshock bei 42°C und weiteren 2 min auf Eis werden 900 μ L SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt. Nach 30 min Schütteln bei 37°C werden die Zellen auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Selektions-Antibiotikum (z.B. 50 μ g/mL Ampicillin) ausplattiert und bei 37°C über Nacht bebrütet.

PCR

Primer für PCR und Sequenzierungen werden von Biospring (Frankfurt am Main, Deutschland) bezogen. In einem Reaktionsansatz von 50 μ L werden 5 μ L 10x AccuPrime™ Buffer I, 10-50 ng Plasmid-DNA, je 30 pmol Primer und 0,5 μ L AccuPrime™ Taq DNA Polymerase (beides Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gemischt und die Reaktion im PTC-150-MiniCycler™ (MJ Research, MA, USA) durchgeführt (Thermozyklus siehe Anhang, Tabelle 6). Die Aufreinigung der PCR-Fragmente erfolgt mit dem Qiaquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland).

Restriktionsverdau

Zum präparativen Verdau von Plasmiden und PCR-Fragmenten und zur Kontrolle erfolgreicher Mutationen wurden Enzyme von New England Biolabs (Ipswich, MA, USA), verwendet, außer es wird anderes angegeben. 1 bis 1,5 μ g DNA werden üblicherweise 2 h bei 37 °C verdaut (Ansatz siehe Anhang, Tabelle 7). Nach Mischen des Ansatzes werden die Enzyme immer als Letztes zugegeben und der Verdau findet üblicherweise 2 h bei 37 °C statt. Dabei werden die Empfehlungen des Herstellers bezüglich der Wahl des Puffers eingehalten. Nach Verdau findet im Falle von zur Ligation vorgesehenen Vektoren noch eine Dephosphorylierung der freien DNA-Enden mit CIP statt. Hierzu

⁹<http://www.acaclone.com/>

werden nach Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme (30 min bei 65 °C) 1 unit pro µg DNA zugesetzt und 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach wird durch Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion das gewünschte DNA-Fragment isoliert.

Gelextraktion

Nach präparativer Gelelektrophorese wird durch Anwendung des QIAquick® Gel Extraction Kit die DNA aus dem Gel isoliert. Hierzu wird die gewünschte Bande identifiziert und unter UV-Licht mit möglichst wenig Gelüberschuss aus dem Gel ausgeschnitten, danach nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

Ligation

Für die Ligation von PCR-Fragmenten wurde der Quick Ligation™ Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) verwendet. Übliche Reaktionen enthielten in 20 µL Gesamtvolumen 10 µL 2x Quick Ligation Reaction Buffer, 50 ng Plasmid, Insert in dreifachem molaren Überschuss und 1 µL Ligase. Nach Inkubation für 5 min bei RT und Kühlen auf Eis wird mit 2 bis 10 µL davon transformiert (s.u.).

2.1.3 Proteinexpression

Zellanzucht

Zur Zellanzucht wird ein Erlenmeyer-Kolben mit 100 mL des gewünschte Mediums (mit entsprechendem Antibiotikum) mit 1 mL einer ü.N.-Kultur mit LB-Medium angeimpft und bei 160 rpm und gewünschter Temperatur (üblicherweise 37°C) ü.N. geschüttelt. Aus dieser Vorkultur werden 2-Liter-Kulturen so angeimpft, dass eine Zelldichte entsprechend 0,2 OD₆₀₀ erreicht wird. Diese Hauptkulturen werden bis zur gewünschten Zelldichte angezogen, dann durch Zugabe von 0,5 mM IPTG die Proteinexpression induziert und nach der Expressionsperiode durch 10-minütige Zentrifugation in 1-Liter-Bechern in einer Avanti J-20 XP mit JLA-8.1000 Rotor (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) bei 8.000 g und 4°C geerntet. Zur Herstellung unmarkierten Proteins wird klassisches LB Medium verwendet, für die Expression mit Markierung durch ²H, ¹⁵N, oder ¹³C wird M9-Minimal-Medium verwendet (siehe Anhang, Tabelle 8).

Für die Markierung mit ²H, ¹⁵N und ¹³C werden H₂O, NH₄Cl oder Glucose gegen die entsprechend markierten Substanzen ausgetauscht. Zur individuellen ¹⁵N-Markierung einzelner Aminosäuren wird M9-AA-Medium verwendet (siehe Anhang, Tabelle 10).

Zellaufschluss

Die geernteten Zellen werden in 20 ml Aufschluss-Puffer (zusätzlich 0,1 mg/mL Lysozym) pro Liter Kultur resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Zum Zellaufschluss werden sie bei Raumtemperatur aufgetaut, mit zusätzlichen 20 ml Aufschluss-Puffer und 10 µL Benzonase® (Reinheitsgrad II (>90%) für die Biotechnologie Merck, Darmstadt, Deutschland) pro Liter Kultur versetzt, eine Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablet (Roche, Basel, Schweiz) zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach dreimaligem Sonifizieren auf Eis (1 min, 40% duty cycle, 5 min Pause) mit dem Sonopuls HD 2200 (Bandelin, Berlin, Deutschland), wird das krude Lysat per Zentrifugation in 50-ml-Röhrchen in einer Avanti® J-20 XP mit JLA-25.500 Rotor (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) (20.000 g, 30 min, 4°C) in den Überstand löslicher Proteine und das Pellet mit den unlöslichen Zellbestandteilen getrennt.

Testexpression

Um die Expression eines Proteins im Kleinmaßstab zu testen, werden 5 ml Kulturen von transformierten *E.coli*-Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen, die Kulturen geteilt, eine der beiden wie oben beschrieben induziert und beide Kulturen nach 4 h Expression geerntet. Die Zellen werden in 100 µL H₂O resuspendiert, mit 100 µL 6× SDS-Puffer versetzt und 5 min auf 96 °C erhitzt. Nach Abzentrifugieren werden 10 µL diesen Lysats per SDS-PAGE analysiert.

Testzellaufschlüsse

Um die Ausbeute an löslichem Protein beim Zellaufschluss unter verschiedenen Bedingungen zu bestimmen, werden 5 mL induzierter Bakterienkultur abzentrifugiert und in 1 mL Aufschlusspuffer resuspendiert. Nach Zellaufschluss im Ultraschallbad (drei Mal 1 min, 0°C) werden je 10 µL Rohlysat, Überstand nach Abzentrifugieren und in 1 mL H₂O resuspendierten Pellets per SDS-PAGE analysiert.

2.1.4 Proteinaufreinigung

Säulenchromatografie

Für die chromatografische Auftrennung von Proteinen wird ein ÄKTA™ Purifier System ausgestattet mit einem Frac-900 Fraktionssammler (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien) genutzt. Für die Nickel-Affinitätschromatografie wurde eine XK 16/20 Säule GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien bepackt mit 10 ml Ni-NTA Superflow Agarose (Qiagen, Hilden, Deutschland), benutzt. Die Flussgeschwindigkeit betrug üblicherweise 2 ml/min. Für die Gelfiltration werden als Säulen HiLoad™ 16/60 und 26/60 Superdex™ 75 prep grade (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien) eingesetzt. Die Flussgeschwindigkeiten betragen 0,3 bis 1,6 ml/min (16/60), bzw. 0,9

bis 4,4 ml/min (26/60), das maximale Auftragsvolumen beträgt 5 bzw. 13 ml. Zum Beladen der Säulen wurde ein Superloop™ 150 ml verwendet, bei kleinen Volumina wurden die Säulen mit einer Spritze direkt beladen.

Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wird die UV-Absorption der aromatischen Aminosäurereste und Disulfid-Brücken bei 280 nm genutzt. Die Absorptionskoeffizienten für die verschiedenen Konstrukte wurde mit dem Programm Protein Calculator v3.3¹⁰ berechnet (siehe Anhang, Tabelle 20). Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wird ein Cary 50 Bio UV-Vis Spektrophotometer (Varian, Palo Alto, CA, USA) mit UV-Küvetten Quartz-Suprasil (Hellma, Müllheim, Deutschland) benutzt, der dynamische Bereich liegt zwischen Absorptionswerten zwischen 0,1 und 1, daher sind ohne Verdünnen Proteinkonzentrationen 0,1 bis 1 mg/ml messbar (entsprechend ca. 5 bis 100 µM CDC25A_kat). Dieses Spektrometer wird auch zur Bestimmung der Zelldichte von *E. coli*-Kulturen an Hand der OD₆₀₀-Werte benutzt, üblicherweise in Plastibrand® Einmalküvetten (Brand, Wertheim, Deutschland). Darüber hinaus wird ein NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) zur Konzentrationsbestimmung verwendet, der dynamische Bereich liegt hier bei einer Absorption 0,02 bis 75 (normiert auf 10 mm Weglänge), entsprechend 1 µM bis 3 mM CDC25A.

Proteinkonzentrierung

Zur Volumenverringern vor Auftrag auf Gelfiltrationssäulen oder für die NMR-Probenvorbereitung werden die Proteinlösungen mittels Ultrafiltration konzentriert. Bei 4°C werden in einer Biofuge® Primo R (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) Kartuschen mit Membranen mit einem MWCO von 10.000 Da verwendet, z.B. Centricon oder -prep YM-10 (Millipore, Billerica, MA, USA) oder VIVASPIN 2 oder 20 (Sartorius, Göttingen, Deutschland). Die Geschwindigkeiten betragen jeweils 5.000 g, 3.000 g, 12.000 g und 8.000 g.

¹⁰ <http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>

2.1.5 Pufferoptimierung

Optimierung der Aufschlussbedingungen per Incomplete Factorial Design

Für die Pufferoptimierung per „Incomplete Factorial Design“ wurde für die gewünschten Faktoren pH-Wert, Salzkonzentration und Salzart für ihre jeweiligen Faktorlevels mit der Software SamBa¹¹ (Audic, Lopez et al. 1997) ein Satz von experimentellen Bedingungen gewählt und mit diesen ein Standard-Testaufschluss durchgeführt. Per SDS-PAGE und anschließender densitometrischer Analyse mit der Software BioDoc Analyze 2.0 (Biometra, Göttingen, Deutschland) wurde der Anteil an löslichem und unlöslichem Protein bestimmt. Die Banden werden möglichst genau ausgeschnitten und als Extraktionswert S_{obs}^k die durchschnittliche Intensität der Banden abzüglich der durchschnittlichen Intensität des Hintergrunds genutzt. Um nun den individuellen Einfluss der Faktorlevels zu

bestimmen, wird die Energiefunktion $E = \sum_{k=1}^N (S_{calc}^k - S_{obs}^k)^2$ (Carter 1999) mit $S_{calc}^k = \beta_0 + \sum_{i=1}^{N_I} \beta_i F_{i,k}$

minimiert. $F_{i,k}$ bezeichnet den Faktorlevel i im k -ten Experiment, N_I die Nummer der Faktorlevels (hier 12), β_0 den Mittelwert der beobachteten Extraktionswerten S_{obs}^k über N Experimente. Die Faktorlevels i sind entweder 1 oder 0 in $F_{i,k}$ für jede Extraktionslösung k . Der Beitrag eines einzelnen Faktorlevel i auf S_{obs}^k (β_i) wird dann durch Minimierung von E bestimmt. Dies wurde durch Verwendung der *Solver*-Funktionalität von MS Excel erzielt. Der Fehler ε der β_i -Werte wird *a posteriori* wie folgt abgeschätzt: $\varepsilon = \sqrt{\sum_{k=1}^N (S_{calc}^k - S_{obs}^k)^2 / (N - N_I - 1)}$.

a posteriori wie folgt abgeschätzt: $\varepsilon = \sqrt{\sum_{k=1}^N (S_{calc}^k - S_{obs}^k)^2 / (N - N_I - 1)}$.

Optimierung der NMR-Probenbedingungen

Die Einflüsse folgender Pufferparameter auf das Präzipitationsverhalten von CDC25A_cat wurden mit der „sitting-drop“-Methode bestimmt. Aufgereinigtes CDC25A (Puffer: 25 mM HEPES pH 7,4, 200 mM NaCl, 10 mM Mercaptoethanol) wird bis zur Präzipitationsgrenze konzentriert (ca. 200µM), und entstehendes Präzipitat durch Zentrifugation entfernt. Im „sample well“ einer Kristallisationsplatte werden jeweils 1 µL Proteinlösung mit 2 µL Puffer versetzt, das Reservoir gefüllt und die Kristallisationsplatte luftdicht versiegelt. Die Platten werden bei 25°C inkubiert und die Präzipitation sofort, nach 1, 2 und 7 Tagen per Lichtmikroskop überprüft.

¹¹ <http://igs-server.cnrs-mrs.fr/samba>

2.2 Enzymaktivität

Die Messung der Enzymaktivität von CDC25A erfolgt über die Dephosphorylierung des künstlichen Substrates *para*-Nitrophenylphosphat. Die Konzentration des entstehenden *para*-Nitrophenol lässt sich durch Messung der Absorption bei 410 nm bestimmen. Der Absorptionskoeffizient beträgt $1,78 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$ (Landrieu, da Costa et al. 2004). Das Protein wurde in entsprechender Konzentration vorgelegt und - wenn nötig - mit dem Inhibitor 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des *para*-Nitrophenylphosphats gestartet, dann der Reaktionsansatz in die Küvette und das Spektrometer überführt. Durchgeführt wurden die Messungen mit dem J-810 Spectropolarimeter ausgerüstet mit einem pTC-423S Thermocontroller (beide Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland) und WKL Wasserbad (Thermo Haake, Karlsruhe, Deutschland). Als Küvette diente eine Suprasil QS (Hellma, Mühlheim, Deutschland) von 1 mm Weglänge. Die Aufnahme erfolgte mit der Software Spectra Manager 1.54.03 (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland).

2.3 NMR-Spektroskopie

2.3.1 Probenvorbereitung, Spektrometer, Auswertung

Proteinkonzentrationen in den NMR-Proben betragen üblicherweise 0,2 bis 0,5 mM. Es werden 10% D₂O als Locksubstanz, 20 µM DSS als Referenzsubstanz und 5 µL einer Lösung von einer Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablet (Roche, Basel, Schweiz) in 500 µL H₂O zugesetzt. Es werden Norell 507-HP Standard NMR-Röhrchen (Norell, Landisville, NJ, USA) und Shigemi NMR-Röhrchen (Shigemi Inc., Allison Park, PA, USA) verwendet, das Probenvolumen beträgt jeweils 500 µL, bzw. 300 µL. Alle NMR-Experimente werden an Bruker-NMR-Spektrometern aufgenommen. Verwendet werden AV900, AV800, AV700 und AV600, ausgestattet mit 5 mm HCN-TXI-Cryoprobenköpfen mit z-Gradienten, ein Avance600, ausgestattet mit einem 5 mm HCN-TXI SB mit xyz-Gradienten, und ein Avance400, ausgestattet mit einem 5 mm HCN-TXI SB mit z-Gradienten bzw. einem 5 mm BBI S1 mit z-Gradienten. Akquisition und Prozessierung von NMR-Daten erfolgen mit X-WIN NMR 3.5 und TopSpin 1.3, 2.0 und 2.1 (Bruker Biospin, Karlsruhe, Deutschland), die Auswertung mit den Programmen Topspin 2.1, CARA (Keller 2004) oder Sparky (Goddard und Kneller). Die ¹H chemischen Verschiebungen werden direkt am internen Standard DSS referenziert, ¹⁵N und ¹³C chemische Verschiebungen werden indirekt anhand der bestimmten ¹H-Carrier-Frequenz kalibriert (Wishart, Bigam et al. 1995; Cavanagh, Fairbrother et al. 1996).

2.3.2 1D Spektren

Standard 1D ¹H-Spektren

Zur Kalibrierung der ¹H-Pulse und zur genauen Bestimmung der H₂O-Frequenz für die Wasserunterdrückung wird üblicherweise die Bruker-Standardpulssequenz zgpr mit Wasserunterdrückung durch Vorsättigung verwendet. Die Anzahl der Punkte beträgt 16,384, der Relaxationsdelay wird lange gewählt, üblicherweise 2 s, in manchen Fällen auch 5 s.

DOSY

Für die Bestimmung des hydrodynamischen Radius des Proteins werden die Bruker-Standardpulssequenzen ledbpgp2s1d und ledbpgp2s (Wu, Chen et al. 1995) um die Wasserunterdrückung durch Vorsättigung erweitert. Dies ist nötig, da sich das Protein nicht als Probe in D₂O herstellen lässt. Der durch die Wasserunterdrückung eingeführte Fehler muss in der Auswertung berücksichtigt werden. Für die Diffusionsmessung wird die Gradientenstärke zwischen 2 und 95 % variiert, als Kernparameter müssen die Diffusionszeit (im Pulsprogramm d20) und die Länge der Gradienten (p30) so eingestellt werden, dass die Signalintensität bei 95 % Gradientenstärke noch ungefähr 5 % der Signalintensität bei 2 % Gradientenstärke beträgt. Dies wird mit der ledbpgp2s1d-Pulssequenz optimiert. In diesem Fall werden für d20 75 ms und für p30 3 ms verwendet. Die pseudo-2D-Messung (ledbpgp2s) wird mit dem AU-Programm dosy mit 16 Experimenten und einem linearen Anstieg der Gradientenstärke gestartet. Die Auswertung der DOSY-Experimente erfolgt mittels des T1/T2-Analysemoduls des TopSpin-Pakets. Im ersten Spektrum des Pseudo-2D werden Peaks definiert, deren Intensität in allen Spektren bestimmt und gegen

$I = I_0 e^{-D\gamma^2 g^2 (\Delta - \delta/3 - \tau/2) 3\delta/3 - \tau/2}$ gefittet. I ist hier die beobachtete Intensität, I_0 die Intensität bei Gradientenstärke 2 %, D der Diffusionskoeffizient, γ das gyromagnetische Verhältnis des beobachteten Kernes, g die Gradientenstärke, δ die Länge des Gradienten, Δ die Diffusionszeit und τ der Abstand der verwendeten bipolaren Gradienten. Der hydrodynamische Radius des Proteins wird durch Kalibrieren mit einer Substanz bekannten hydrodynamischen Radius' bestimmt

$$R_h(\text{Protein}) = \frac{D(\text{Protein})}{D(\text{Referenz})} R_h(\text{Referenz}).$$

Berechnung des Diffusionsradius mit HYDROPRO

Hydrodynamische Radien von Proteinen werden mit HYDROPRO¹² berechnet, die von den Autoren empfohlenen Parameter (García de la Torre, Huertas et al. 2000) werden verwendet. Angepasst werden SIGMIN und SIGMAX dergestalt, dass die Anzahl der für die Berechnungen verwendeten Minibeads zwischen 200 und 1000 liegen. 10 Iterationen werden durchgeführt.

2.3.3 2D Experimente

HSQC

Zur Aufnahme der ^1H - ^{15}N -Korrelationen die unmodifizierte Bruker-Standardpulssequenz fhsqcf3gpqh (Mori, Abeygunawardana et al. 1995) benutzt. Die ^1H -Tägerfrequenz wird auf das Wassersignal eingestellt, die ^{15}N -Trägerfrequenz auf 116 ppm. Die spektrale Weite betrug 16 ppm (^1H) bzw. 36 ppm (^{15}N). Die Anzahl der aufgenommenen Punkte beträgt 1024-4096 (^1H) bzw. 128-256 (^{15}N).

TROSY

Für 2D-TROSY-Spektren wird die Bruker-Standardpulssequenz trosyf3gpqpsi19 mit WATERGATE-Wasserunterdrückung und erhöhter Sensitivität verwendet (Czisch und Boelens 1998; Meissner 1998; Pervushin, Wider et al. 1998; Rance, Loria et al. 1999; Zhu, Kong et al. 1999). Die ^1H -Tägerfrequenz wird auf das Wassersignal eingestellt, die ^{15}N -Trägerfrequenz auf 117 ppm. Die spektrale Weite beträgt 18 ppm (^1H) bzw. 40 ppm (^{15}N). Die Anzahl der aufgenommenen Punkte beträgt 2048 (^1H) bzw. 512 (^{15}N).

2.3.4 3D Experimente

HNCO

Die Aufnahme von HNCO-Spektren erfolgte mit der unmodifizierten hncogpwg3d Bruker-Standardpulssequenz (Grzesiek und Bax 1992; Schleucher, Sattler et al. 1993; Kay, Xu et al. 1994). Die ^1H -Tägerfrequenz wird auf das Wassersignal eingestellt, die ^{15}N -Trägerfrequenz auf 117 ppm und die ^{13}C -Trägerfrequenz auf 175 ppm. Die spektrale Weite beträgt 16 ppm (^1H), 36 ppm (^{15}N), bzw. 13 ppm. Die Anzahl der aufgenommenen Punkte beträgt 2048 (^1H), 80 (^{15}N), 112 (^{13}C). Die Aufnahme erfolgt bei 800 MHz.

¹² <http://leonardo.fcu.um.es/macromol/programs/hydropro/hydropro.htm>

HNCA

Zur Aufnahme der HNCA-Spektren die unmodifizierte hncagpwg3d Bruker-Standardpulssequenz (Grzesiek und Bax 1992; Schleucher, Sattler et al. 1993; Kay, Xu et al. 1994) benutzt. Die ^1H - Trägerfrequenz wird auf das Wassersignal eingestellt, die ^{15}N -Trägerfrequenz auf 117 ppm und die ^{13}C -Trägerfrequenz auf 52 ppm. Die spektrale Weite beträgt 16 ppm (^1H), 36 ppm (^{15}N), bzw. 26 ppm (^{13}C). Die Anzahl der aufgenommenen Punkte beträgt 2048 (^1H), 80 (^{15}N), 128 (^{13}C). Die Aufnahme erfolgt bei 800 MHz.

HNCACB

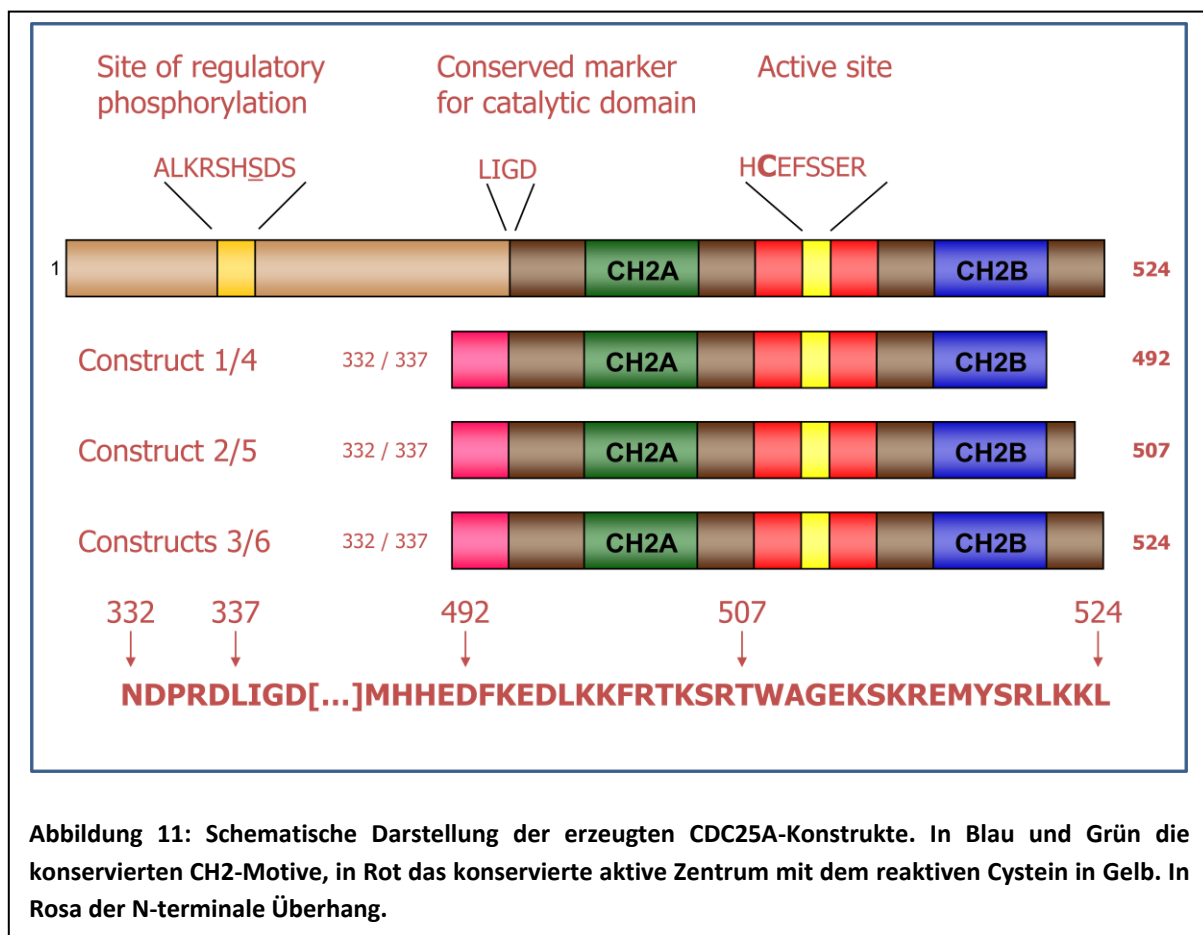
Die Aufnahme der HNCACB-Spektren erfolgte mit der unmodifizierten hncacbgpwg3d Bruker-Standardpulssequenz (Wittekind und Mueller 1993; Muhandiram und Kay 1994). Die ^1H -Trägerfrequenz wird auf das Wassersignal eingestellt, die ^{15}N -Trägerfrequenz auf 117 ppm und die ^{13}C -Trägerfrequenz auf 40 ppm. Die spektrale Weite beträgt 16 ppm (^1H), 36 ppm (^{15}N), bzw. 65 ppm (^{13}C). Die Anzahl der aufgenommenen Punkte beträgt 2048 (^1H), 96 (^{15}N), 128 (^{13}C). Die Aufnahme erfolgt bei 900 MHz.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Molekularbiologie

3.1.1 Erstellung der Proteinkonstrukte

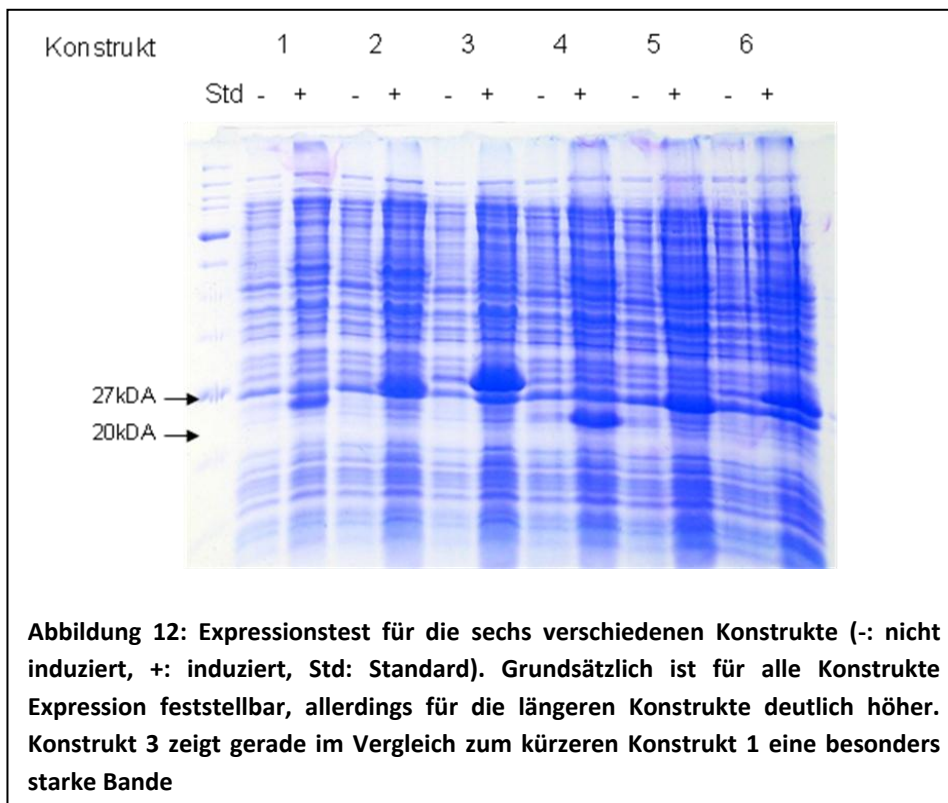
Für die Untersuchung der katalytischen Domäne von CDC25A mussten zuerst entsprechende Konstrukte basierend auf der kompletten cDNA-Sequenz kloniert werden und auf Eignung für Aufreinigung und NMR-Untersuchungen getestet werden. Für den Start des Konstrukts wurden zwei Punkte gewählt: Der Erste liegt direkt vor der konservierten LIGD-Sequenz (L337), die den Anfang der katalytischen Domäne markiert. Der Zweite liegt fünf Aminosäuren davor (N332), diese Stelle liegt noch im Bereich des flexiblen Linkers, der die regulatorische mit der katalytischen Domäne verbindet. Vier der fünf zusätzlichen Aminosäuren haben polare Seitenketten, welche üblicherweise die Löslichkeit von Proteinen erhöhen. Für das Ende wurden drei Punkte gewählt: Der erste direkt am Ende der in der Röntgenstruktur definierten Struktur (D492), der Zweite in der Mitte des flexiblen C-Terminus (T507) und der Dritte mit dem natürlichen Ende des Proteins. Insgesamt wurden so sechs Konstrukte mit variierenden Längen und physikochemischen Eigenschaften erzeugt (Abbildung 11). Die Klonierung wurde basierend auf einem Plasmid mit der vollständigen cDNA-Sequenz der Isoform



1 von CDC25A durchgeführt (pET9d-HisCDC25Afull, bereitgestellt durch Dr. Krishna Saxena). Prinzipiell wurde durch PCR mit geeigneten Primern das gewünschte Genfragment amplifiziert, mit Restriktionsenzymen geschnitten und mit einem entsprechend geöffneten Plasmid ligiert. Die variablen Enden wurden jeweils mit *Bam*HI-Schnittstellen versehen, während für die beiden Anfänge zwei verschiedene Strategien angewandt wurden. Für den Start bei N332 wurde durch Ergänzung des Codons ATT eine Schnittstelle für *Ase*I eingeführt, die eine vorhergehende Modifikation der cDNA-Sequenz nicht erforderte. Dagegen erforderte die Einführung der gewünschten *Nde*I-Schnittstelle für den Start bei L337, die Entfernung der natürlichen *Nde*I-Schnittstelle innerhalb des Proteins (Basenposition 1527 in der CDC25A cDNA) durch Mutation. Dies wurde durch eine Quickchange-PCR erreicht. Für die verwendeten Primer siehe Tabelle 18. Als Zielplasmide wurden pJC-TEV und pET16d-TEV gewählt, die ein N-terminales His-Tag mit einer Schnittstelle für die TEV-Protease einführen, durch welches die Aufreinigung deutlich erleichtert wird.

3.1.2 Expressionsoptimierung

Da für NMR-Untersuchungen große Mengen an Protein benötigt werden, wurden die verschiedenen Konstrukte auf Expressionsausbeute und Löslichkeit beim Aufschluss getestet und Aufreinigungs- und Pufferbedingungen ausführlich untersucht. Dies wird im Folgenden dargestellt.

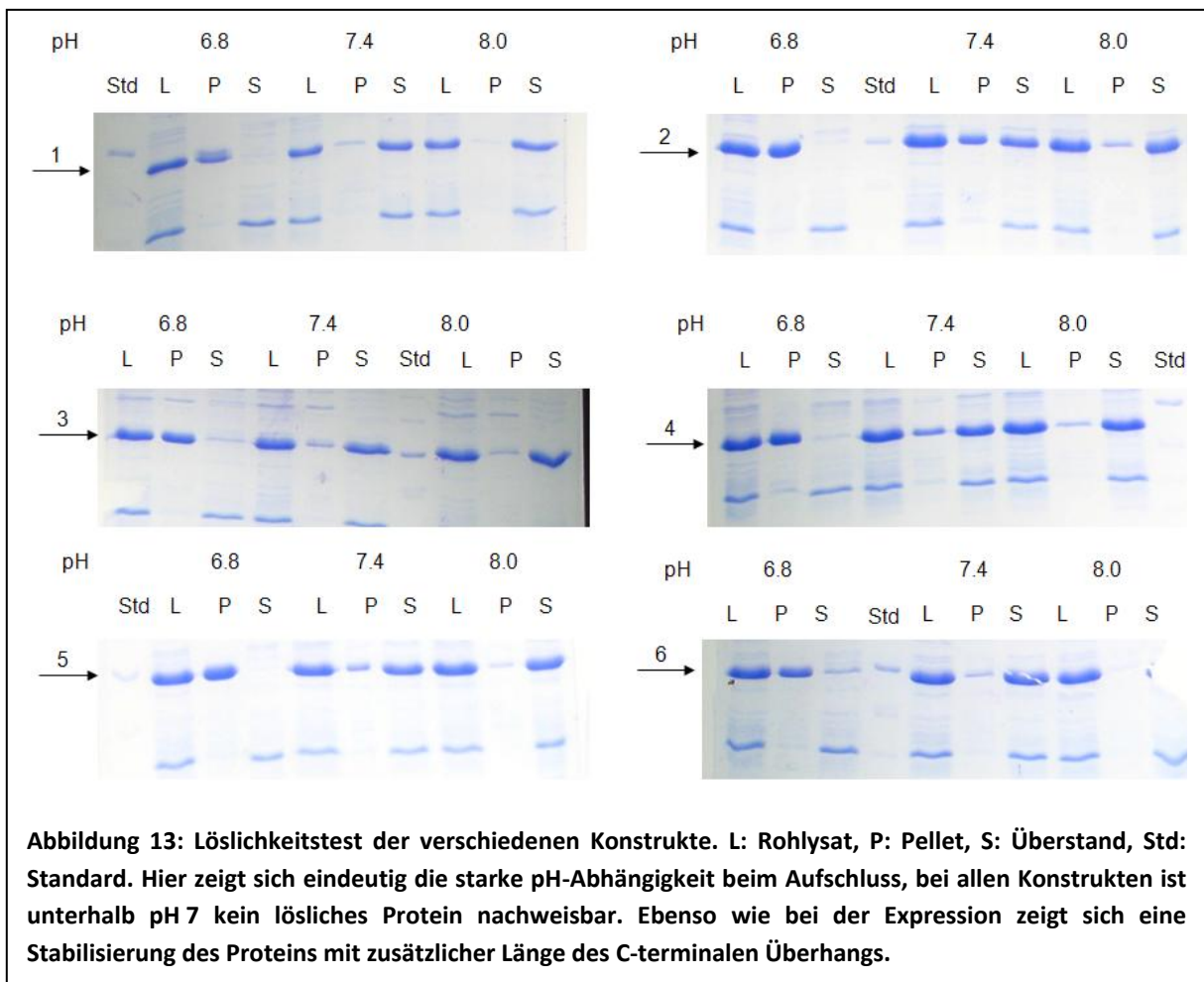


Testexpressionen der einzelnen Konstrukte

Um die reine Expressionseffektivität zu bestimmen wurden standardmäßige Testexpressionen (siehe Material und Methoden) durchgeführt und die Intensität der Banden des induzierten Proteins verglichen (Abbildung 12). Hier zeigt Konstrukt 3 die stärkste Expression, allerdings noch nicht deutlich genug, um ausschlaggebend für die Wahl dieses Konstrukts zu sein.

Aufschlusstest der verschiedenen Konstrukte für verschiedene pH-Werte

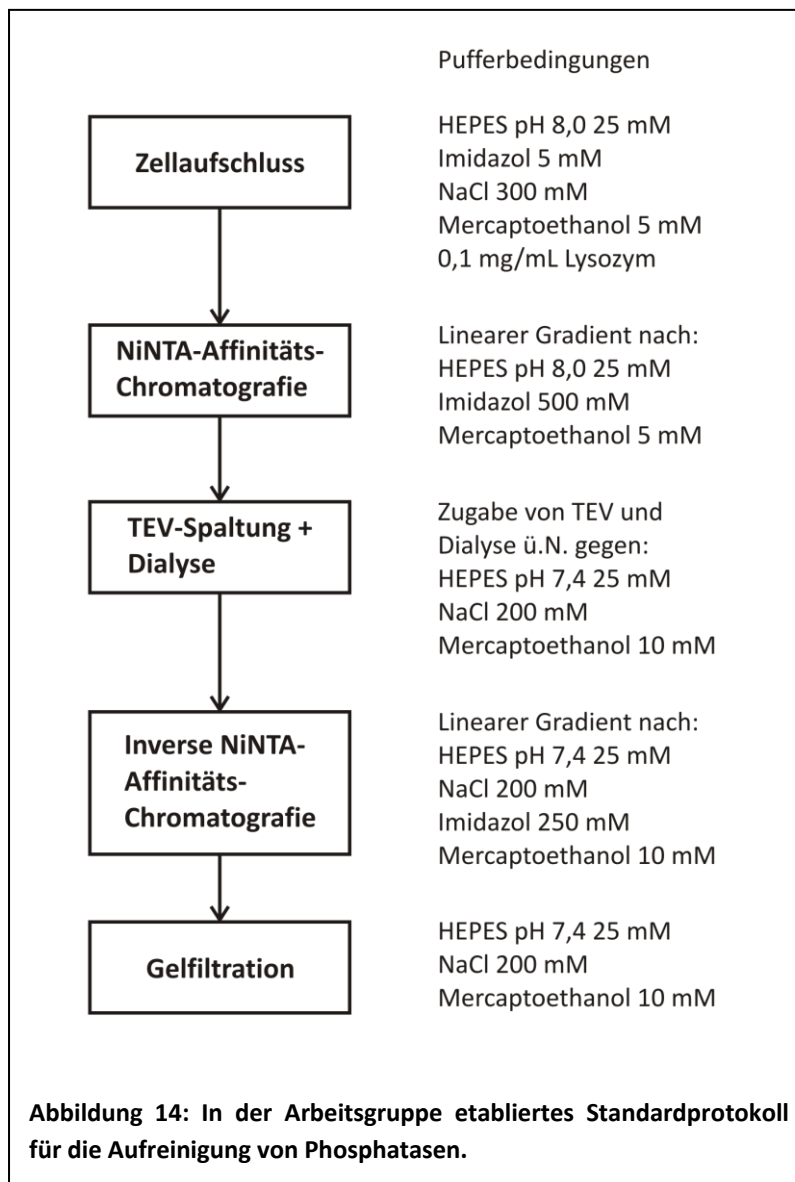
Um die tatsächliche Ausbeute einer Expression beurteilen zu können, muss die lösliche Fraktion an exprimiertem Protein beim Zellaufschluss bestimmt werden. Dafür wurden mit je 30 ml induzierter Kultur im kleinen Maßstab Testzellaufschlüsse mit dem Aufschlusspuffer eines bereits etablierten Phosphatase-Aufreinigungsprotokolls durchgeführt. Als Puffer wurde 25 mM HEPES, 5 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 5 mM Mercaptoethanol, 0,1 mg/ml Lysozym mit den pH-Werten 6,8, 7,4 und 8,0 gewählt. Es wurden jeweils Rohlysate, Pellet und Überstand aufgetragen (Abbildung 13). Es zeigt sich, dass der Zellaufschluss bei pH 6,8 bei allen Konstrukten überhaupt kein exprimiertes Protein in der



löslichen Fraktion zeigt, 2,4 und 5, bei pH 7,4 nicht besonders gut löslich sind. Konstrukt 3 zeigt gute Eigenschaften und wurde deshalb ausgewählt.

3.1.3 Stabilität während der Aufreinigung

Da sich während der ersten Aufreinigungen mit einem bereits im Arbeitskreis etablierten Protokolls (Abbildung 14) für Phosphatasen bereits die sehr geringe Stabilität und Löslichkeit, sowie eine Intoleranz gegenüber dem für die His-Tag-Aufreinigung benötigten Imidazol zeigte, wurden diverse Parameter optimiert. Besonders schwerwiegend zeigte sich dies nach der ersten Ni-NTA-Aufreinigung, die Kombination aus hoher Protein-Konzentration in den Elutionsfraktionen mit entsprechender Imidazol-Konzentration führte zum beinahe sofortigen Ausfallen des Proteins mit sichtbarer Trübung der Lösung. Bei der anschließenden Dialyse mit gleichzeitiger TEV-Abspaltung des His-Tags führte es zu komplettem Verlust an Protein.



Aufschlusspufferoptimierung per Incomplete Factorial Design

Die Auswirkungen von verschiedenen Salzen auf die Löslichkeit und Stabilität von Proteinen wurden bereits 1888 untersucht. Hofmeister ordnete Anionen und Kationen nach ihrer Fähigkeit Globulin aus Hühnereiweiß zu präzipitieren (Hofmeister 1888). Von Hippel und Schleicher schlugen darauf basierend vor, dass Proteine entsprechend der Hofmeister-Serie stabilisiert werden (von Hippel und Schleich 1969). Um nun die Einflüsse von Salzart und -konzentration sowie zusätzlich des pH-Werts auf die Löslichkeit von CDC25A_kat möglichst umfassend zu bestimmen, wurde die von Ducat et. al. für die Problematik der NMR-Probenoptimierung angewandten Methode des „Incomplete Factorial Design“ verwendet (Ducat, Declerck et al. 2006). Unter der Annahme, dass die verschiedenen Pufferparameter die Löslichkeit unabhängig voneinander beeinflussen, kann man die Anzahl der Experimente reduzieren, die nötig sind, um den vollständigen Parameterraum nach optimalen Bedingungen abzusuchen. Die Faktoren bezeichnen hierbei die zu optimierenden Parameter, während die Faktorlevels die verschiedenen Stufen der Faktoren darstellen. Durch geschickte Kombination der Faktorlevels werden die zu testenden Bedingungen so gewählt, dass der Parameterraum optimal gesampelt wird. Es wurden drei verschiedene Salzsarten, vier Salzkonzentrationen und fünf pH-Werte als variable Parameter gewählt (Anhang, Tabelle 14) und Experimente und Auswertung wie in Material und Methoden beschrieben angewandt.

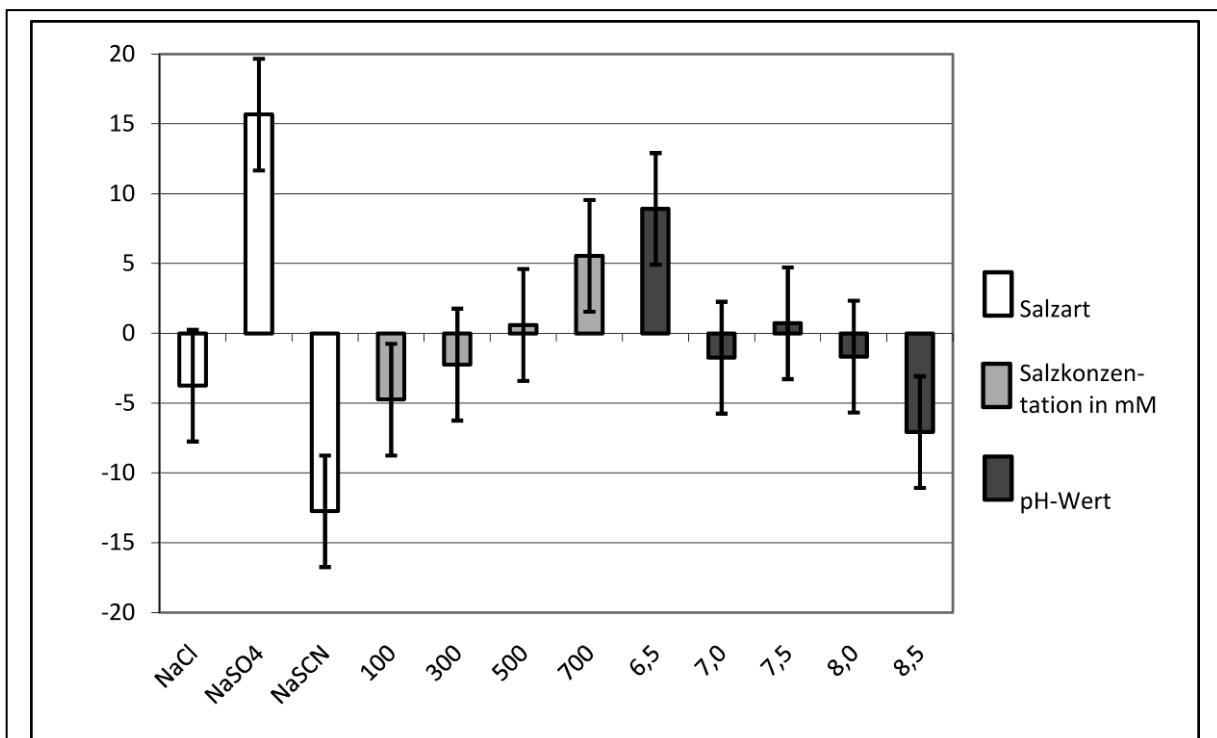


Abbildung 15: Die Einflüsse der verschiedenen Faktorlevel auf den Extraktionswert. Besonders stark ist der Einfluss der Salzsorte, der Einsatz von Natriumsulfat erzielt die stärkste Stabilisierung. Eine ansteigende Salzkonzentration erhöht die Stabilität, während niedrigere pH-Werte zur Stabilität

Ergebnisse und Diskussion

Als Ergebnis der Berechnungen erhält man einerseits den individuellen Einfluss der einzelnen Faktorlevels auf die Löslichkeit β_i als auch einen globalen Fehler ε , der sich *a posteriori* abschätzen lässt.

Im Ergebnis (Abbildung 15) zeigt sich sehr deutlich der Einfluss der Salzsorte auf die Extraktionseffizienz. Während sich NaSCN wie erwartet deutlich negativ auswirkt, zeigt auch NaCl einen negativen Beitrag zur Extraktionseffizienz (wenn auch ε mit 3,9 so groß ausfällt, dass dies nicht eindeutig ist). Extrem ausgeprägt ist die positive Wirkung von NaSO₄, wie von der Hofmeister-Serie vorhergesagt. Bei den anderen Faktorlevels sind keine so deutlichen Einflüsse zu beobachten. Bei der Salzkonzentration überlappt der Fehlerbereich für jeden Datenpunkt mit dem mindestens zweier anderer Werte, so dass eine eindeutige Aussage nicht zu treffen ist. Als Einziges lässt sich ein Trend hinsichtlich steigender Extraktionseffizienz mit steigender Konzentration erkennen. Bei den pH-Werten weist nur pH 6,5 einen erhöhten Extraktionscore auf. Dies widerspricht allerdings früher gemachten Erfahrungen, wie oben für die verschiedenen Proteinkonstrukte gezeigt liegt bei pH 6,8 keine oder nur sehr geringe Proteinextraktion vor. Daher wurden zusätzliche Proteinextraktionen durchgeführt, um die Korrektheit der Ergebnisse zu validieren. Die erste Extraktionslösung entspricht den durch den Test „idealen“ Bedingungen. Es zeigte sich hier allerdings, dass nahezu alles Protein unlöslich bleibt.

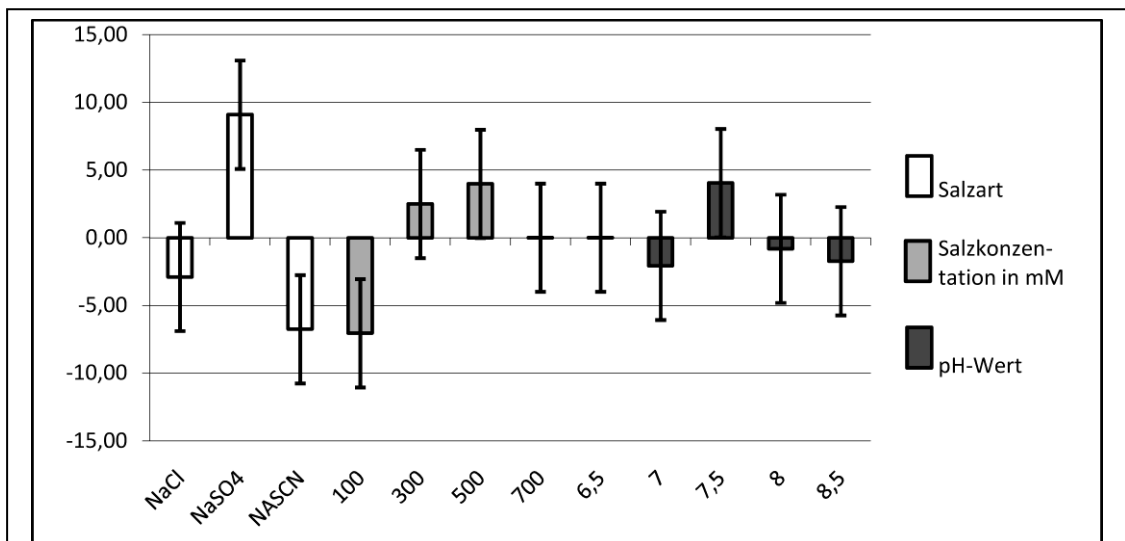
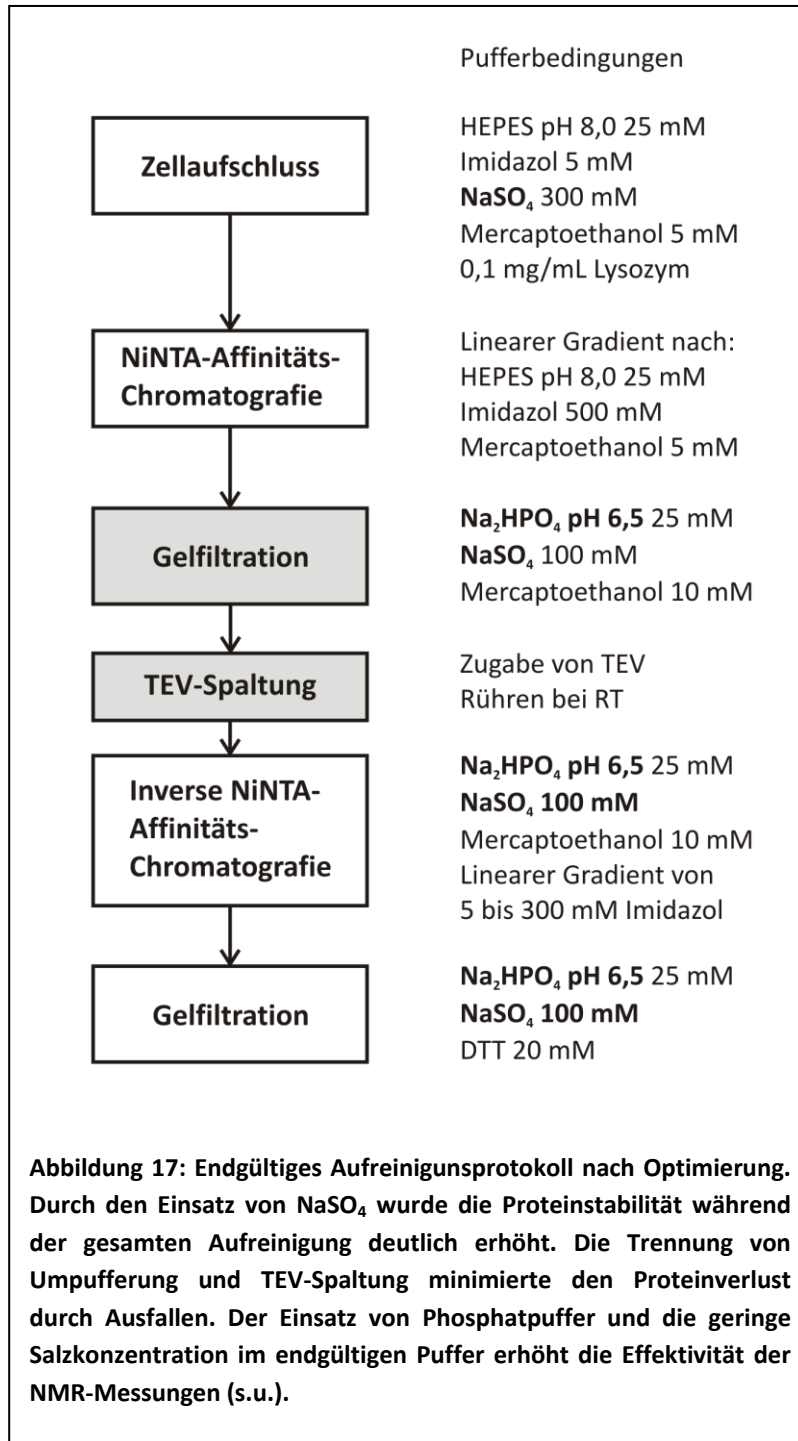


Abbildung 16: Neu berechnete Extraktionsbeiträge der verschiedenen Faktorlevels nach Einbeziehung der zusätzlichen Extraktionsbedingungen. Im Vergleich zur ursprünglichen Berechnung ergeben sich sehr deutliche Änderungen, nur die Stabilisierung durch Natriumsulfat bleibt eindeutig. Für Konzentration und pH-Wert gibt es deutliche Veränderungen, tendenziell zeigt sich in den mittleren Bereichen die beste Stabilisation, allerdings sind die Fehler so groß, dass die Aussage zweifelhaft bleibt. Salzkonzentrationen um 300 mM und pH-Werte um 8,0 decken sich aber mit Erfahrungswerten.

Werden die Ergebnisse in den Pool für die Berechnung einbezogen, gibt es sehr deutliche Änderungen (Abbildung 16). ε steigt auf 5,1 an, β_i für NaSO_4 wird um gut 6 Prozentpunkte reduziert, und bei Salzkonzentration und pH-Wert verschiebt sich das Optimum von 700 mM nach 500 mM bzw. von 6,5 nach 7,5. Dies deckt sich mit der Erfahrung, dass hohe Salzkonzentrationen zu Proteinfällung führen können, dass niedrige pH-Werte zu schlechter Löslichkeit beim Zellaufschluss führen und auch mit der bereits erwähnten völligen Unlöslichkeit bei den „idealen“ Aufschlussbedingungen. Die Änderungen fallen sehr drastisch aus, dies ist bei nur sechs Messwerten zusätzlich zu den zwanzig vorliegenden eigentlich nicht zu erwarten. Dies liegt darin begründet, dass der durchschnittliche Extraktionswert β_0 für die sechs neuen Werte bei 40 % liegt, im Vergleich zum β_0 von 23 % für die ursprüngliche Versuchsreihe. Für alle sechsundzwanzig Werte liegt β_0 nun bei 26 %. Dieser deutlich höhere Wert könnte z.B. von einer geringeren Zelldichte beim Aufschluss herrühren. Diese Diskrepanz führt zu einer Überbewertung der neuen Ergebnisse, dies erklärt die starke Veränderung für NaSO_4 . Trotzdem ist klar, dass der Einsatz von NaSO_4 die deutlichste Verbesserung des Aufschlussprotokolls darstellt, generell Salzkonzentrationen zwischen 300 und 500 mM und pH-Werte um 7,5 für den Aufschluss zu bevorzugen sind. Im Allgemeinen liegt der Einsatz von IFD eher im noch „kleinräumigeren“ Absuchen des Parameterraums um bewährte Erfahrungswerte, lohnt sich aber in jedem Fall, so bald mehrere Parameter optimiert werden müssen. Lohnend ist wahrscheinlich das Testen von zusätzlichen Salzen, einerseits mit weiteren Vertretern im oberen Bereich der Hofmeister-Serie, andererseits mit Variation der Kationen. Weiterhin dürfte sich die Bestimmung der Abhängigkeit der Löslichkeit von der Zelldichte beim Aufschluss lohnen. Die Zelldichte beim Aufschluss zu variieren ist als Eingriff in ein bestehendes Aufreinigungsprotokoll am einfachsten zu bewerkstelligen, da Änderungen bei pH-Wert, Anionenart und Salzkonzentration bei der chromatografischen Aufreinigung zu deutlichen Änderungen im Elutionsverhalten führen können.

Prozess- und Pufferoptimierung der weiteren Aufreinigung

Aufgrund der erhöhten Ausbeute an löslichem Protein durch Einsatz von NaSO_4 im Aufschlusspuffer und der erhöhten Langzeitstabilität der NMR-Probe (s.u.) wurde NaCl für die gesamte Aufreinigung komplett ersetzt. Dies erhöhte die Stabilität der konzentrierten Ni-NTA-Fractionen. Um des Weiteren das Imidazol schnell und vollständig zu entfernen und zur Umpufferung für den zweiten Ni-NTA-Aufreinigungs-Schritt wurde die Dialyse durch eine präparative Gelfiltration ersetzt. Die Abspaltung



des His-Tags erfolgt nun durch Zugabe von TEV zur bereits umgepufferten Proteinfraction und Rühren bei Raumtemperatur. Das optimierte Protokoll ist in Abbildung 17 dargestellt. Außerdem wurde der ursprünglich im zweiten Teil der Aufreinigung verwendete HEPES-Puffer mit pH 7,4 durch einen Natriumphosphatpuffer mit pH 6,5 ersetzt. Die Eignung dieses Puffers für CDC25A_cat sowohl für die NMR-Spektroskopie als auch der Einfluss auf die Aktivität der Phosphatase werden weiter unten nachgewiesen.

3.1.4 Stabilität der NMR-Probe

Pufferoptimierung

An Proteinproben für strukturelle Untersuchungen werden folgende Anforderungen gestellt: Hohe Konzentration, Langzeitstabilität, keine unspezifischen Interaktion oder Aggregation des Proteins, geringe Salzkonzentration und pH-Wert um 6,0. Des Weiteren sollten zum untersuchten Protein wenig zusätzliche Beiträge zum NMR-Spektrum zu erwarten sein, daher werden bevorzugt Phosphatpuffer eingesetzt und weitere Pufferbestandteile möglichst in deuterierter Form verwendet.

Für die Optimierung des NMR-Probenpuffers wird wiederum der Verfahrensweise von Ducat et. al. gefolgt, die die Eignung von für Kristallisation von Proteinen etablierten Methoden für die Untersuchung der Langzeitstabilität von hochkonzentrierten Proteinproben bei verschiedenen Pufferbedingungen nachweisen konnten (Ducat, Declerck et al. 2006). Im vorliegenden Fall wurde die Dampfdiffusionsmethode in Form des „sitting drop“-Verfahrens durchgeführt (s. Material und Methoden), im Gegensatz zum Löslichkeitstest aber als „Full Factorial Design“.

Es werden Stammlösungen sämtlicher Kombinationen der verschiedenen Salzarten,

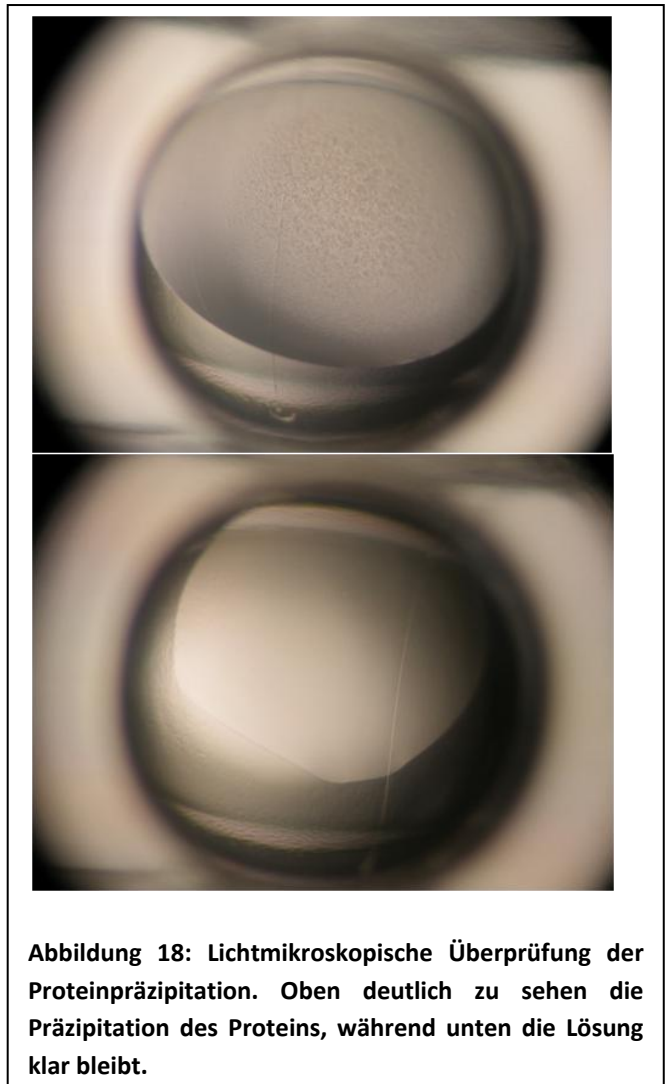


Abbildung 18: Lichtmikroskopische Überprüfung der Proteinpräzipitation. Oben deutlich zu sehen die Präzipitation des Proteins, während unten die Lösung klar bleibt.

-konzentrationen und pH-Werte hergestellt. Die pH-Werte 5,0 und 5,5 werden durch Succinat, die pH-Werte 6,0, 6,5 und 7,0 durch Natriumphosphat gepuffert, jeweils mit 100 mM. Zusätzlich werden 5 mM DTT zugesetzt. Als stärkster Einflussfaktor auf die Löslichkeit stellt sich der pH-Wert heraus, bei Werten unterhalb pH 5 findet sofortige Präzipitation statt, bei pH 5,5 ist diese langsamer, aber für alle Salze außer Na_2SO_4 innerhalb einer Woche deutlich sichtbar. Bei pH 6,0 und 6,5 ist innerhalb einer Woche keine, bei pH 7,0 ist nur geringe Präzipitation zu beobachten. Bezüglich der Salzkonzentration lässt sich der Effekt des „Aussalzens“ beobachten, bei pH 5,5 und 7,0 beschleunigen hohe Konzentrationswerte das Ausfallen des Proteins. Die Effekte der unterschiedlichen Salze sind praktisch nicht nachweisbar, einzig die Wirkung des Natriumsulfats bei pH 5,5 ist signifikant. Insgesamt zeigt sich, dass der pH-Bereich zwischen 6,0 und 6,5 zwingend eingehalten werden sollte, um eine hohe Stabilität zu gewährleisten, Natriumsulfat den starken Einfluss niedriger pH-Werte zum Teil aufheben kann und unter diesen Voraussetzungen die für die NMR-spektroskopischen Messungen gewünschten niedrigen Salzkonzentrationen gut geeignet sind.

Stabilisation durch Mutation

Aufgrund des sehr reaktiven katalytisch aktiven Cysteins sind PTPs in Lösung oft instabil, insbesondere in höheren Konzentrationen. Trotz der elaborierten Pufferoptimierung lag die durchschnittliche Stabilität der NMR-Proben der CDC25A_kat bei ungefähr einer Woche. Da bei den maximal erreichbaren Konzentrationen ein für die Rückgratzuordnung benötigter Satz Tripelresonanzexperimente eine Messzeit von 14 Tagen voraussetzt und derartige Experimente optimalerweise an einer einzigen Probe vermessen sollten, wurde ein zusätzlicher Weg der Stabilisierung beschritten. Für die Bestimmung der einzigen NMR-Struktur eines CDC25-Analogs, der Isoform aus *A.thaliana* wurde aus Stabilitätsgründen die strukturell konservative Mutation des aktiven Cysteins zu einem Serin eingeführt. Dies führt zu einer deutlich erhöhten Stabilität, dabei geht allerdings die katalytische Aktivität verloren (Landrieu, da Costa et al. 2004). Im Falle von CDC25B wurde die Cys473Ser-Mutante kristallisiert und die Struktur gelöst. Diese war praktisch deckungsgleich zur aktiven Form. Die Serinmutante zeigt ein verändertes Substratbindungsverhalten („substrate-trapping“) und wurde daher auch für Dockingexperimente verwendet (Sohn, Parks et al. 2005). Die Cys430Ser-Mutante von CDC25A_kat zeigt wie beschrieben keine Aktivität im Enzymtest, aber wie erwünscht eine deutlich erhöhte Stabilität (bis zu 4 Wochen) bei den benötigten hohen Konzentrationen. Die HSQC-Spektren der mutierten und unmutierten Variante sind im selben Puffersystem deckungsgleich, der Peak der veränderten Aminosäure lässt sich so nicht identifizieren. Aber daher ist die Annahme, die Mutation verändere die Struktur nicht, zulässig. Sofern nicht anders vermerkt wurden die NMR-Experimente mit der Mutante durchgeführt.

3.1.5 Enzymaktivitätstests und Inhibitoren

Enzymaktivität bei verschiedenen Pufferbedingungen

Im Mittelpunkt der Enzymtests stand nicht die vollständige Charakterisierung von CDC25A_kat, sondern primär die Überprüfung der Integrität des Proteins nach der Aufreinigung und der Einfluss der verschiedenen Pufferbedingungen. Drei wesentliche Faktoren sind beim NMR-Puffer von Interesse: Der niedrige pH-Wert von 6,5, Natriumsulfat (100 mM) als stabilisierendes Salz und Phosphat als Puffer (25 mM). Grundsätzlich ist die Enzymaktivität pH-abhängig, Sulfat und Phosphat könnten das aktive Zentrum belegen und so die Enzymaktivität hemmen. Als Vergleich diente die Studie von McCain et. al. (McCain, Catrina et al. 2002). Dort werden für CDC25A_kat für pNPP bei pH 8,0, 100 mM Tris, 1 mM DTT, 1 mM EDTA bei 30°C ein k_{cat} von $0,157 \text{ s}^{-1}$ und ein K_m von 21 mM angegeben. Die Assaybedingungen wurden so optimiert, dass über einen Zeitraum von 10 min bei ausreichendem Signal, nicht zu hoher Proteinkonzentration und stabiler Reaktionsgeschwindigkeit gemessen werden konnte. Für 40 mM pNPP und 2 μM CDC25A_kat ergibt sich aus den

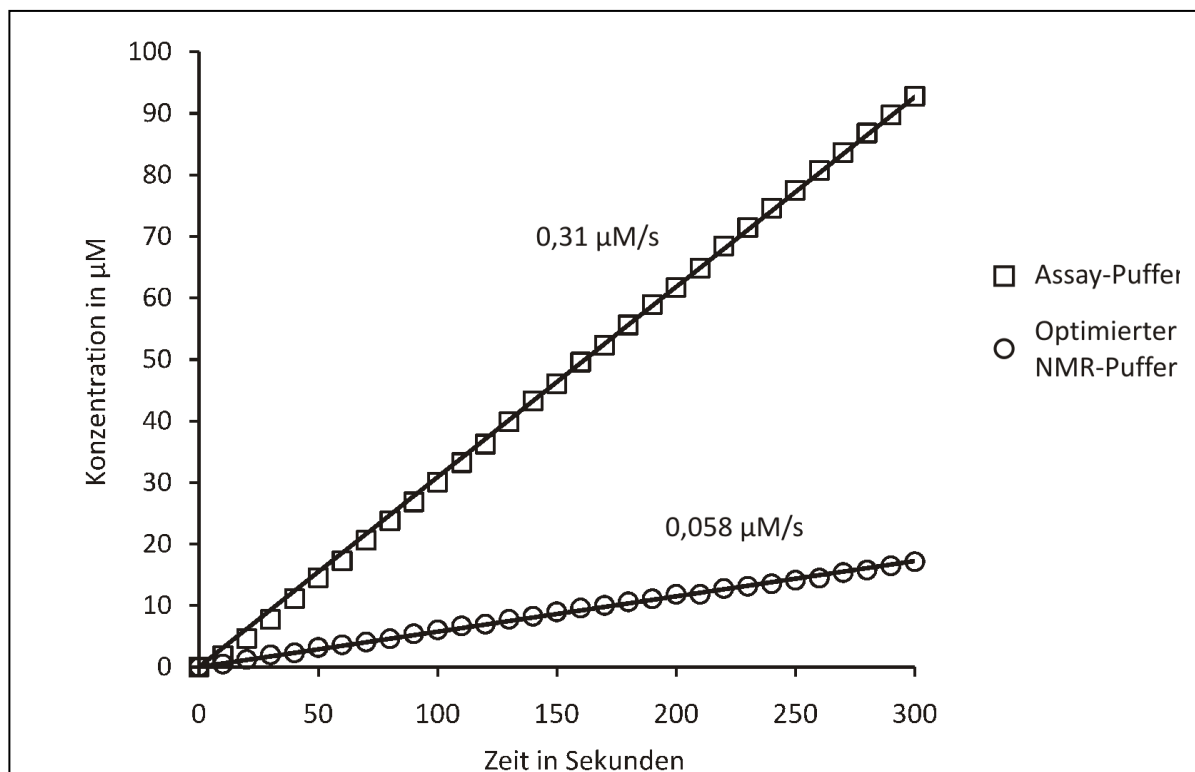
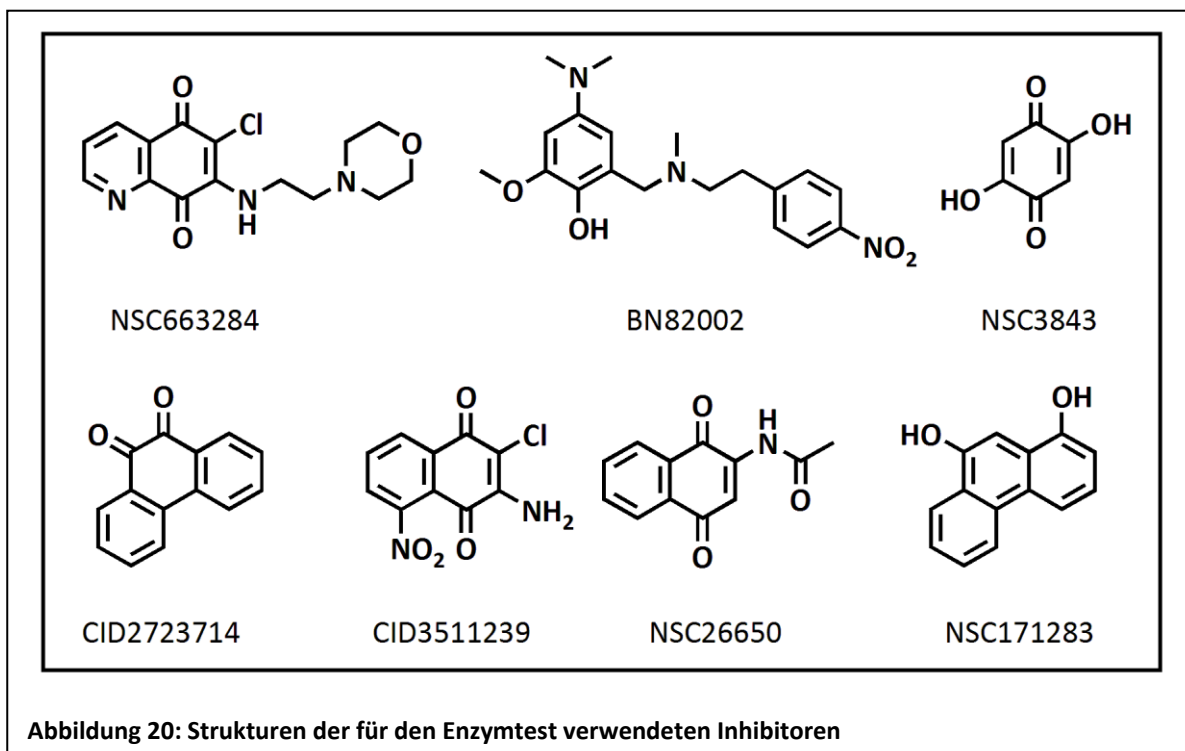


Abbildung 19: Klassischer pNPP-Hydrolyse-Enzymtest mit 40 mM pNPP und 2 μM CDC25A_kat bei 30° C bei verschiedenen Pufferbedingungen. Der Assay-Puffer entspricht den üblicherweise verwendeten Bedingungen (pH 8,0, 100 mM Tris, 1 mM DTT, 1 mM EDTA), der NMR-Puffer entspricht den optimierten Bedingungen für hohe Stabilität und Spektrenqualität (25 mM NaHPO_4 , pH 6,5, 100 mM NaSO_4 , 20 mM DTT). Die Reaktion läuft bei den gewählten Bedingungen über die gesamte Zeit mit gleichbleibender Geschwindigkeit ab, die bestimmten R-Werte liegen bei über 0,99.

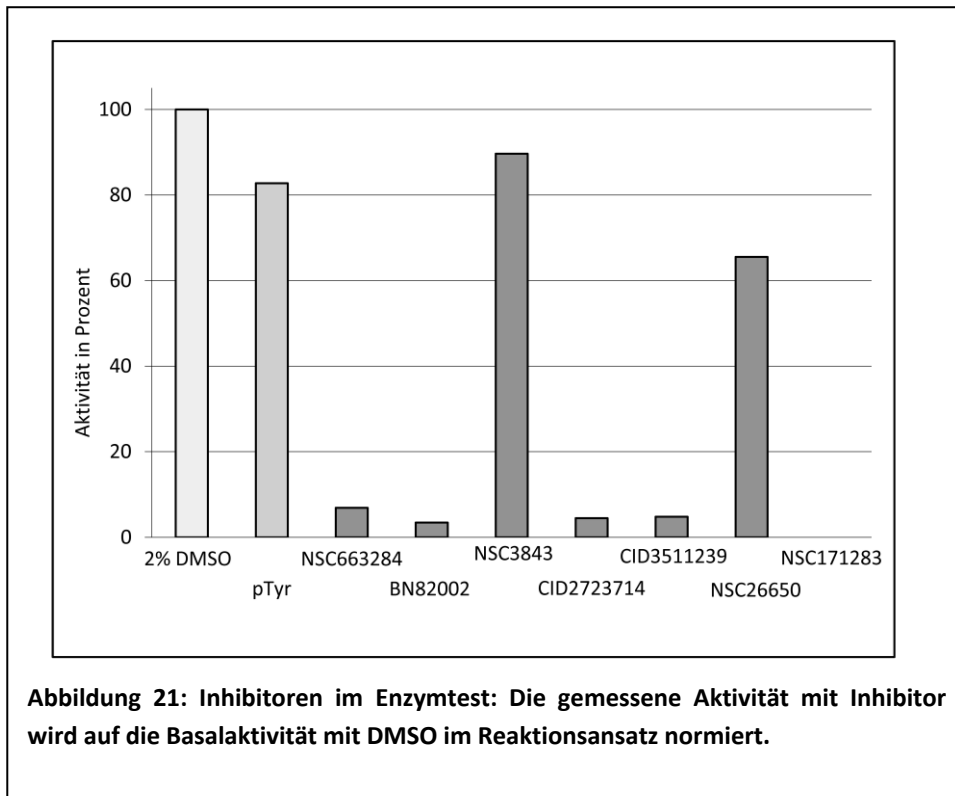
Literaturwerten nach $v = \frac{[S]}{k_M + [S]} k_{cat} [E]$ eine Reaktionsgeschwindigkeit von 0,21 $\mu\text{M/s}$. Abbildung

19 zeigt den Enzymtest für Literaturbedingungen und NMR-Puffer, die Werte wurden linear gefittet mit Peinem R^2 -Wert von über 0,99. Für die Standardbedingungen ergibt sich eine Rate von 0,31 $\mu\text{M/s}$, für die NMR-Bedingungen 0,058 $\mu\text{M/s}$. Gegenüber dem Literaturwert ist die hier gemessene Rate um 50% erhöht, im NMR-Puffer liegt sie dagegen bei knapp 30%. Die Abweichung vom Literaturwert kann verschiedene Ursachen haben, Unterschiede bei Proteinreinheit oder Aufreinigungsbedingungen, so kann die relative oder absolute Aktivität verändert werden, oder durch Reinheit der verwendeten Reagenzien. Für unsere Zwecke ist diese Übereinstimmung ausreichend, wäre die Aktivität deutlich geringer, wäre die Bestimmung von k_M und k_{cat} nötig, um die Ursachen genauer definieren zu können. Für die NMR-Bedingungen gibt es einen Faktor der pH-Abhängigkeit, der auch von McCain et.al. untersucht wurde. Der Sprung von 8 auf 6,5 sollte nicht ausschlaggebend für die Veränderung sein, Sulfat oder Phosphat dürften dafür verantwortlich sein. Die deutlich höhere Konzentration an DTT (20 mM) sollte auch keine Rolle spielen, da dieses zur Stabilisierung des aktiven Zentrums von CDC25A_kat zugegeben wird. Zusätzlich wurde noch der Einfluss von DMSO getestet, da die Inhibitoren in diesem Lösungsmittel gelöst sind und ein falsch-positives Signal vermieden werden sollte.



Hemmung der Enzymaktivität durch verschiedene Inhibitoren

Für die Aktivitätsstudien wurden die gut charakterisierten Inhibitoren NSC663284 (Lazo, Aslan et al. 2001) und BN82002 (Brezak, Quaranta et al. 2004) verwendet, darüber hinaus 5 Substanzen, die eine unspezifische Inhibition von PTPs aufweisen, bzw. als Grundgerüste spezifischerer Inhibitoren dienen. In Tabelle 1 sind die Namen der Inhibitoren und die inhihierten Phosphatasen samt IC_{50} -Werten aufgeführt, Abbildung 20 zeigt die entsprechenden Strukturen. Für diese 7 Substanzen und Phosphotyrosin wurde der Aktivitätsassay wie oben beschrieben mit 400 μ M Inhibitor (10-facher



Überschuss) durchgeführt und auf die Reaktionsgeschwindigkeit ohne Inhibition, aber unter Zugabe von DMSO, kalibriert. Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse. Drei der getesteten Substanzen zeigen nur eine geringe Verminderung der apparenten Reaktionsgeschwindigkeit. Phosphotyrosin zeigt erwartungsgemäß eine geringe Verminderung der Enzymaktivität, da es keinen Inhibitor im eigentlichen Sinne darstellt, sondern nur als zweites Substrat in der Reaktion auftritt. Das Enzym wird nicht deaktiviert, sondern die beiden Substrate konkurrieren um das aktive Zentrum, wobei die Hydrolyse des Phosphotyrosins nicht durch den photometrischen Assay gemessen werden kann. NSC3843, ein als schwach charakterisierter Inhibitor zeigt im Test auch tatsächlich nur geringe Inhibitionswirkung. Die restlichen vier getesteten Inhibitoren zeigen bis auf NSC26650 eine nahezu vollständige Deaktivierung des Proteins, wobei davon auszugehen ist, dass dies wie für CID2723714 nachgewiesen auf einer irreversiblen Oxidation des aktiven Zentrums beruht. Inwiefern dies für

NSC26650 zutrifft oder warum dessen Inhibitionswirkung so deutlich schwächer ausfällt war im Rahmen dieser Studie nicht zu klären.

NSC / CID- Nummer	IUPAC name	Auf Inhibition getestet gegen (IC ₅₀ in µM)	Zitat
NSC663284	6-chloro-7-(2-morpholin-4-ylethylamino)chinolin-5,8-dion	CDC25A (0,21±0,08) VHR (4,0±0,1) PTP1B (>100)	(Lazo, Aslan et al. 2001)
BN82002	4-(dimethylamino)-2-methoxy-6-[[methyl-[2-(4-nitrophenyl) ethyl]amino] methyl]phenol hydrochloride	CDC25A (2,4±1,2) CDC25B2 (3,9±0,01) CDC25B3 (6,3±4,1) CDC25C (5,4±3,4) CDC25C-cat (4,6±0,5)	(Brezak, Quaranta et al. 2004)
NSC3843	2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone	CDC25A (33) CDC25B (75) CDC25C (69)	(Sohn, Kiburz et al. 2003)
CID2723714	9,10-phenanthrenchinon	n/A	(Wang, Dube et al. 2004)
CID3511239	3-amino-2-chloro-5-nitro-naphthalene-1,4-dione	n/A	n/A
NSC26650	N-(1,4-dioxonaphthalen-2-yl)acetamide	n/A	n/A
NSC171283	1,9-Phenanthrendiol	n/A	n/A

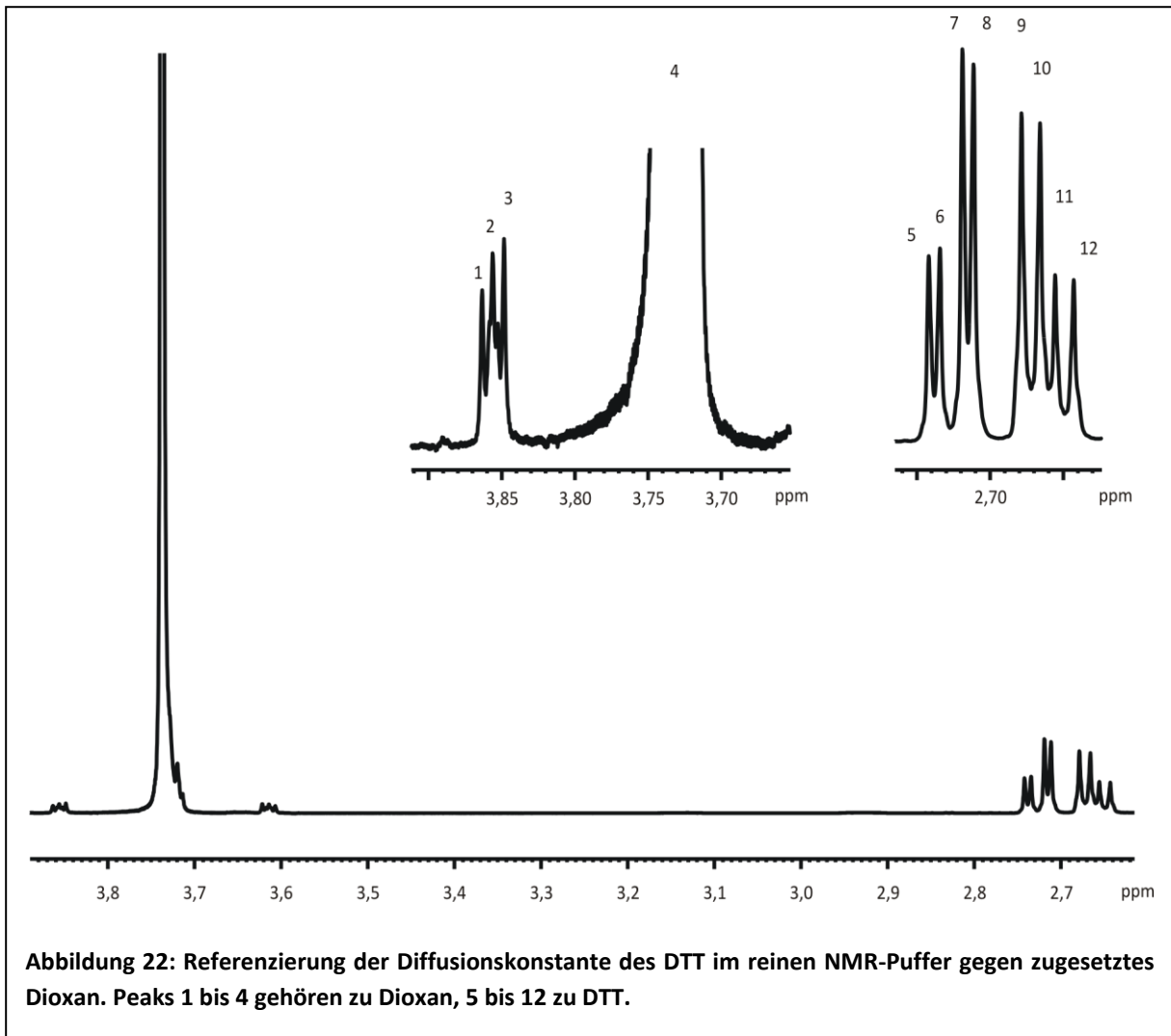
Tabelle 1: Liste der in den Enzymtests verwendeten Inhibitoren. Die Namensbezeichnung bezieht sich entweder auf die NSC-Klassifizierung durch das „National Cancer Institute“ (NCI) oder auf die Compound identification number (CID) der PubChem-Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI). Gelistet sind außerdem die PTPs, die durch die Substanzen inhibiert werden. Die ersten drei Inhibitoren sind umfassend charakterisiert, für CID2723714 wurde eine Sauerstoffabhängige Inhibitionskinetik nachgewiesen, die letzten 3 wurden als strukturell verwandte, leicht zugängliche Substanzen als „Negativkontrolle“ ausgewählt.

3.2 NMR-Experimente

3.2.1 1D-NMR-Experimente

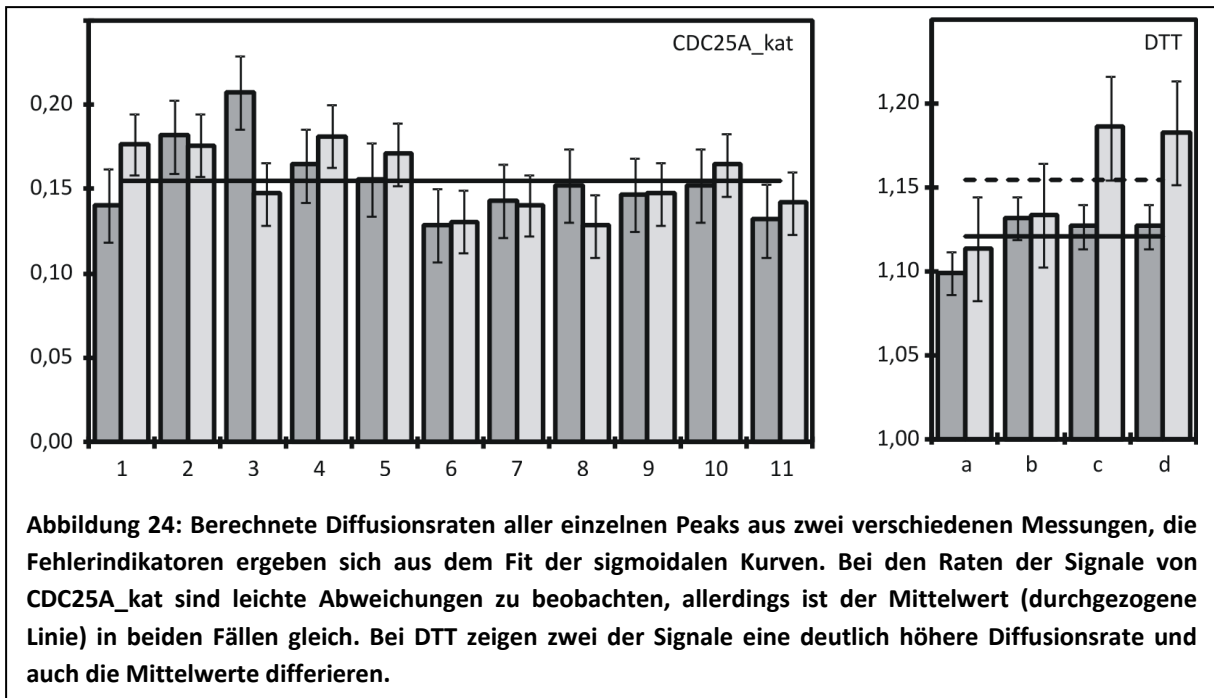
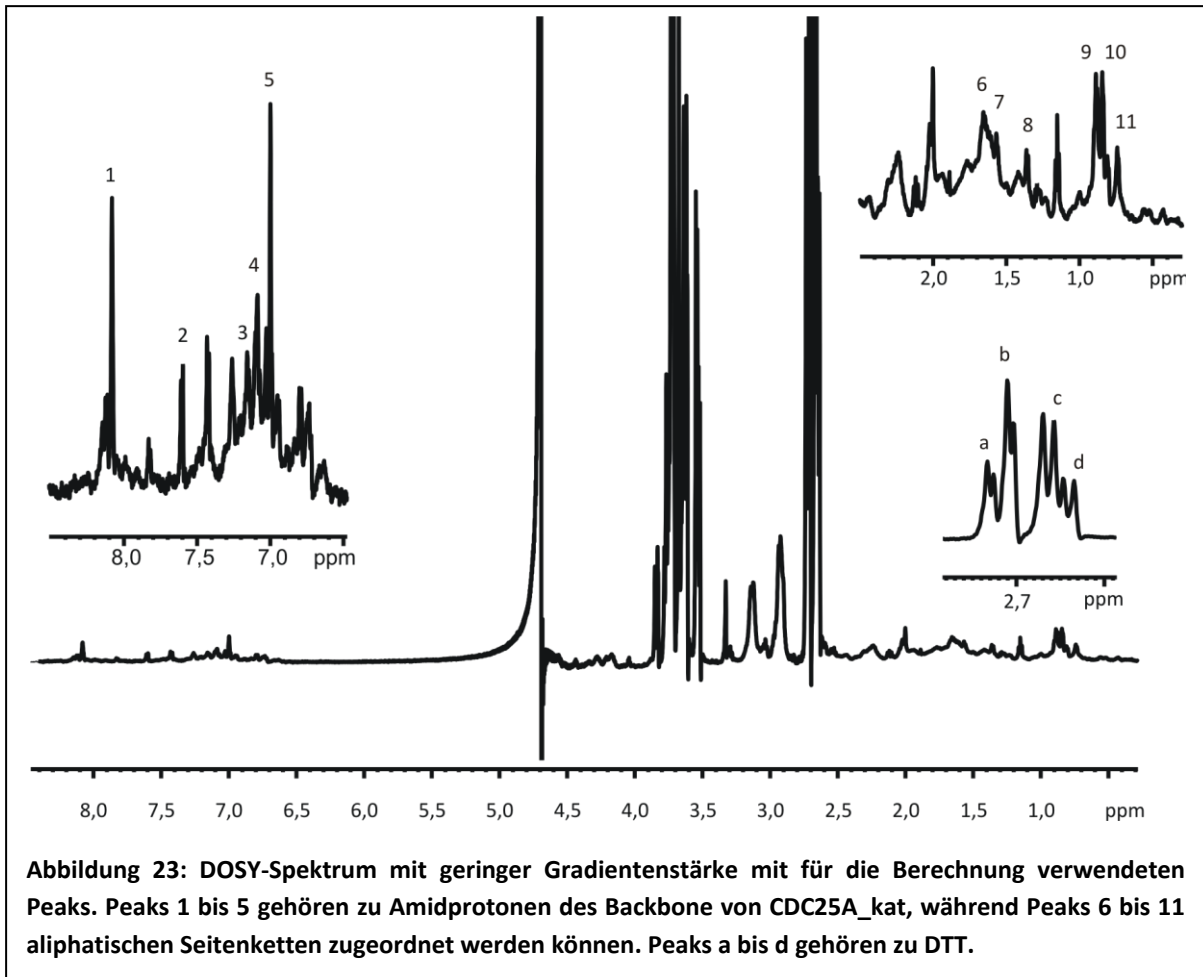
DOSY

Da durch die Diffusions-Messungen die Dimerisierung des Proteins ausgeschlossen werden soll, werden mit HYDROPRO sowohl der hydrodynamische Radius von CDC25A_{kat} als auch eines Vergleichsproteins mit annähernd doppelter Masse (45 kDa), der Endocellulase aus *Humicola*



insolens, berechnet. Basierend auf den Strukturen mit den PDB-Einträgen 1c25 und 1a39 ergeben sich für die Proteine berechnete Stokes-Radien von 22,8 Å bzw. 29,0 Å. Um die Zugabe von Dioxan zur Proteinprobe zu vermeiden, wird das bereits im NMR-Puffer vorhandene DTT verwendet. Dieses wiederum wird gegen Dioxan, welches im Allgemeinen für Diffusionsmessungen als Standard eingesetzt wird, referenziert. Dioxan wurde reinem NMR-Puffer zugesetzt und aus 4 bzw. 8 Signalen die Abnahmeraten D für die beiden Moleküle bestimmt. Abbildung 22 zeigt das Spektrum mit den für die Bestimmung der Raten verwendeten Peaks. Als Raten D ergeben sich folgende Werte: Für Dioxan $1,52 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ mit einer Standardabweichung von 2,34 % und für DTT $1,14 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ mit einer Standardabweichung von 1,28 % (Berechnung nicht gezeigt).

Abbildung 23 zeigt das erste Spektrum der zweifach durchgeführten DOSY-Messung mit den entsprechend gewählten Peaks. Für das Protein wurden sowohl Peaks der HN-Signale als auch aus dem Aliphaten-Bereich gewählt. In Abbildung 24 werden die bestimmten D für die einzelnen Peaks aufgetragen, der Mittelwert der Einzelmessung und die jeweilige Standardabweichung. Für DTT ergeben sich Raten von $1,12 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ bzw. $1,15 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ mit Standardabweichungen von 1,16 bzw.



2,69 %, dies entspricht den Werten im reinen NMR-Puffer, daher ist die indirekte Referenzierung zulässig. Für das Protein ergibt sich für beide Messungen das gleiche D von $1,15 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$, die jeweiligen Standardabweichungen betragen 14,0 bzw. 11,9 %. Der hydrodynamische Radius des

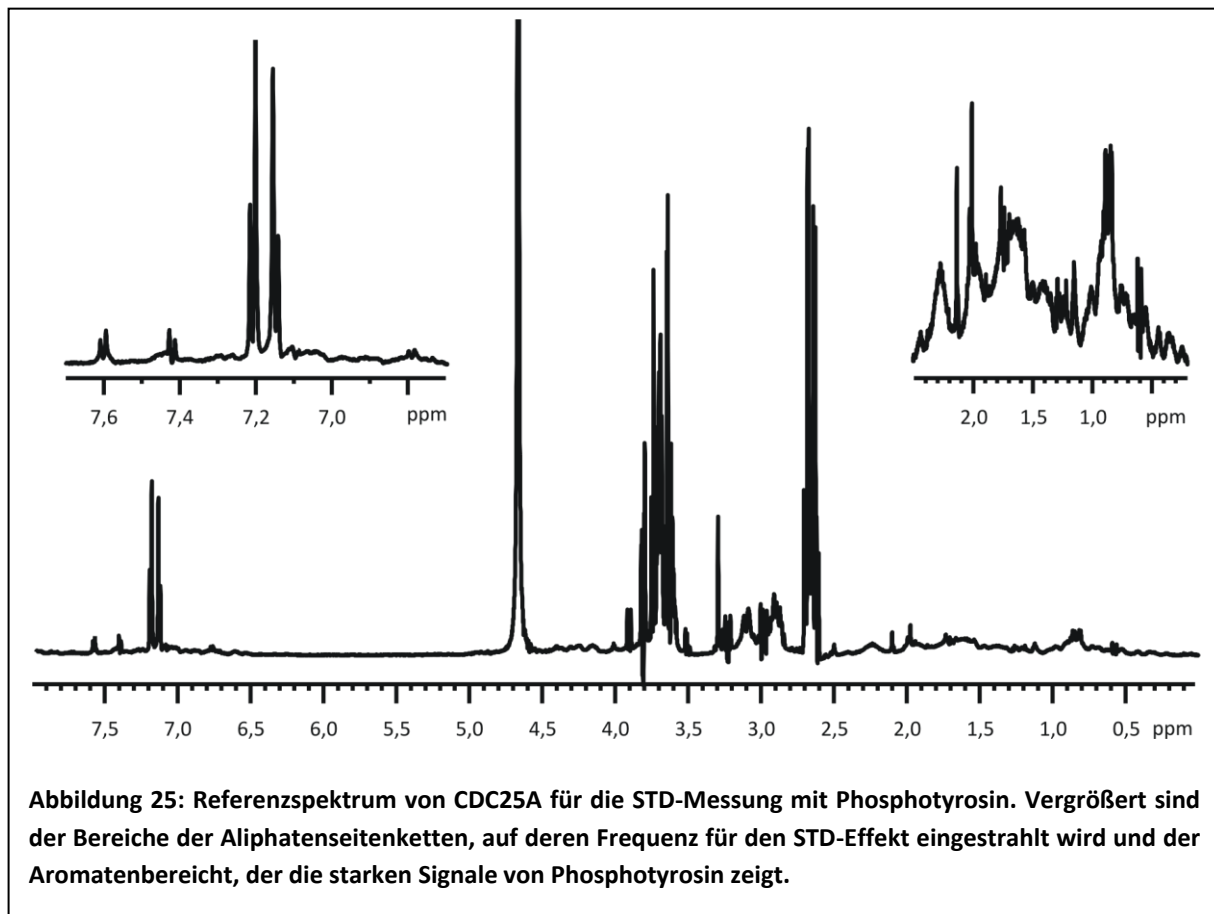
Proteins ergibt sich aus dem Verhältnis der Abnahmeraten D und dem bekannten hydrodynamischen

Radius des Dioxans (2,12 Å): $R_h^{Protein} = \frac{D_{Dioxan}}{D_{Protein}} R_h^{Dioxan}$. Aus den jeweiligen Mittelwerten für D der

beiden Messungen ergibt sich der hydrodynamische Radius von 20,8 Å, dieser Wert liegt sogar unterhalb des vorhergesagten Wertes. Selbst bei einem geschätzten Gesamtfehler von 20% untermauert dies die Annahme eines monomeren Zustands von CDC25A_{kat}.

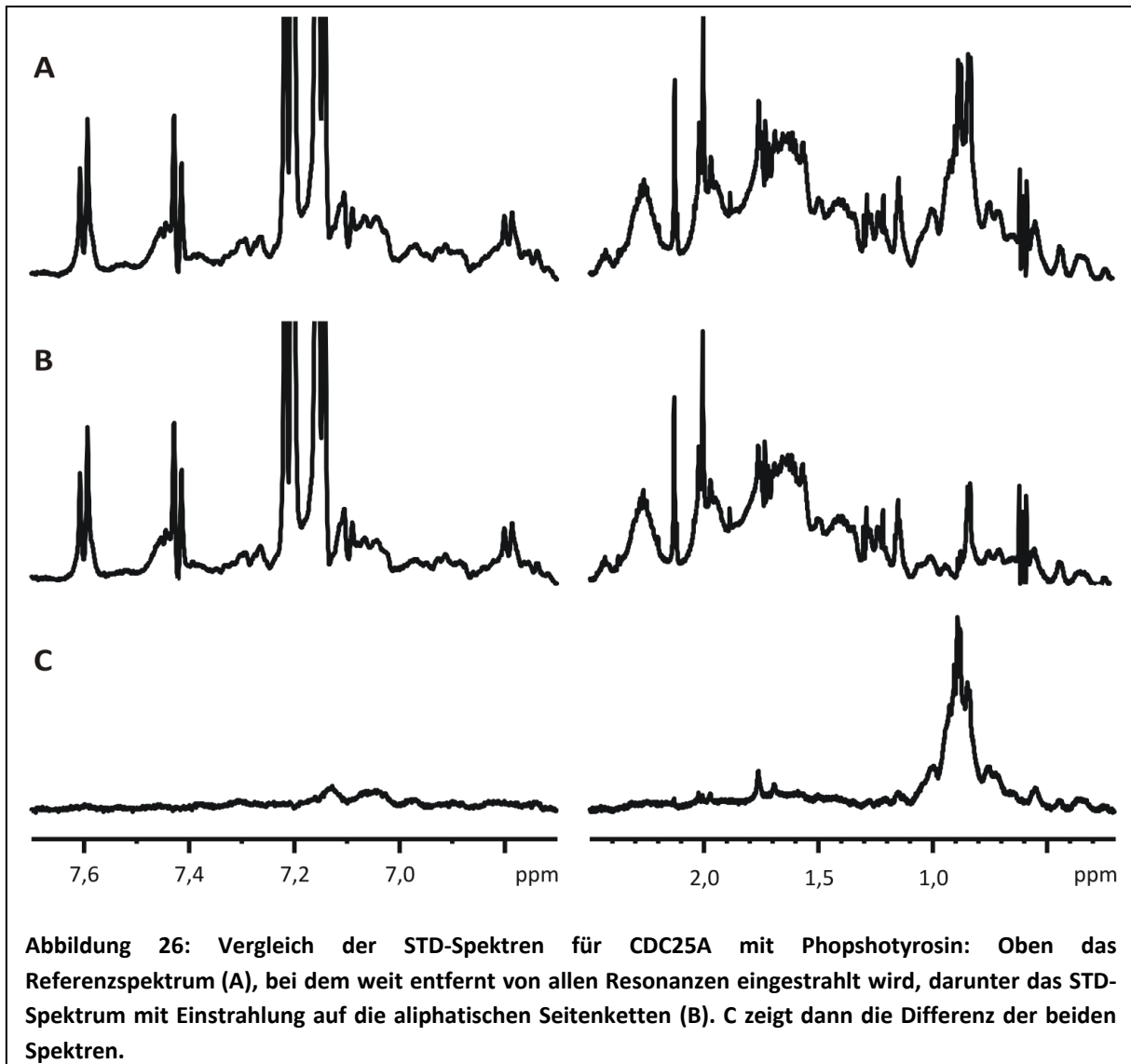
STD-NMR (Saturation Transfer Difference)

Alle im Enzym-Assay wirksamen Inhibitoren wurden per STD auf ihr Bindungsverhalten bei NMR-Bedingungen getestet. Dies war im vorliegenden Fall sinnvoll, da im Enzymtest das aktive Konstrukt eingesetzt wird, für die NMR-Studien aber die Cys430Ser-Mutante, die sich ja als deutlich stabiler erwiesen hat. Da die Inhibitionswirkung nicht ausschließlich von der Interaktion mit dem aktiven Cystein abhängt, sollte auch hier ein Sättigungstransfer zu beobachten sein. Abbildung 25 zeigt das Referenzspektrum, bei dem off-Resonance eingestrahlt wird. Bei 7,2 ppm sind die typischen zwei Dupletts des Phosphotyrosins zu erkennen mit einer dem 10-fachen Überschuss entsprechenden Signalstärke zu sehen. Bei 7,4 und 7,6 ppm liegt ein weiteres Duplex-Paar, das in Proteinspektren ohne Phosphotyrosin nicht zu finden ist. In Abbildung 26 ist der direkte Vergleich zwischen Off-



resonance und On-Resonance-STD-Spektrum zu sehen, darunter die Differenz. Im Bereich von 2,5 bis 0 ppm ist deutlich zu erkennen, dass das Protein durch die Einstrahlung zumindest teilweise gesättigt wird, die Differenz zeigt den Anteil des Spektrums, der durch die Einstrahlung nicht mehr beobachtbar wird. Im Aromatenbereich hingegen zeigt sich die Sättigungswirkung nur geringfügig zwischen 7,2 und 7,0 ppm, auf den Ligand ist keine Magnetisierung übertragen worden. Üblicherweise weist das auf eine fehlende Interaktion zwischen Inhibitor und Protein hin, wenn die STD-Methodik zur ersten Identifikation möglicher Liganden verwendet wird, wäre dies ein klassisches Negativ-Resultat. Möglicherweise ist aber auch ein Voraussetzung für das STD-Experiment nicht erfüllt, der nötige schnelle Austausch des Liganden zwischen gebundenem und ungebundenem Zustand. Nur wenn eine ausreichend hohe k_{off} -Rate vorliegt, kann es zu einer deutlichen Reduktion des Signals kommen. Dieser langsame Austausch würde auch die zusätzlichen Signale bei 7,4 und 7,6 ppm erklären, die einem stabil gebundenen Phosphotyrosin zugeordnet werden könnten. Dass diese beiden Signale nicht vom STD-Effekt beeinflusst werden, widerspricht dieser These allerdings.

Für alle im Enzymtest aktiven Inhibitoren zeigt sich dasselbe, der STD-Effekt ist nicht nachweisbar. Dies weist generell auf eine hohe k_{off} -Rate für Liganden, die mit CDC25A interagieren, hin, oder darauf, dass tatsächlich überhaupt keine Interaktion mit der Mutante zustande kommt. Da dies in diesem Test nicht eindeutig nachzuweisen ist, wurden mit den Inhibitoren und Phosphotyrosin „chemical-shift-perturbation“-Studien mit ^{15}N -markierten Proteinproben durchgeführt.

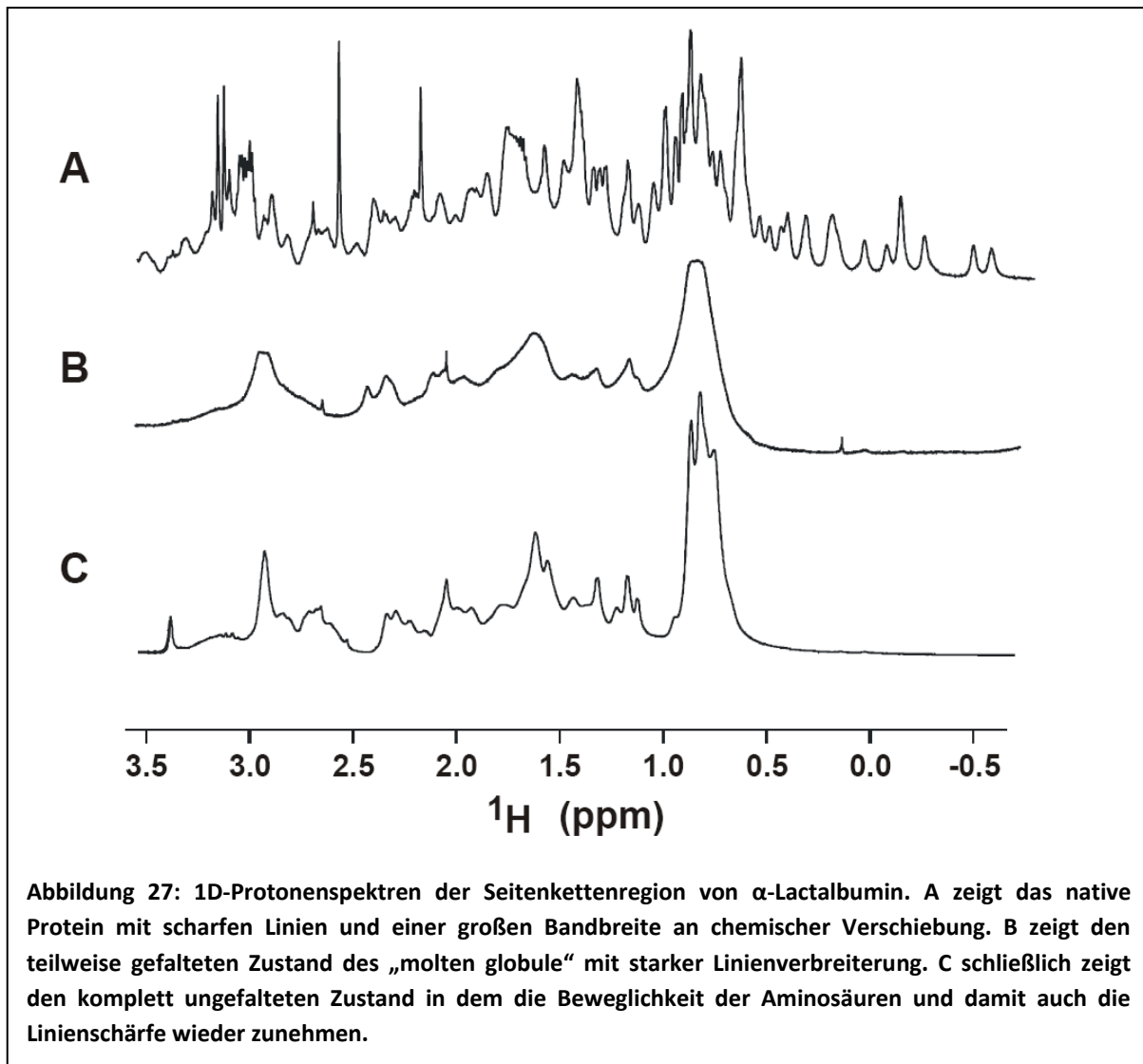


3.2.2 2D-NMR-Experimente

HSQC zur Bestimmung struktureller Integrität

Anhand eines ^{15}N -HSQC eines markierten Proteins kann in eindeutiger Weise seine strukturelle Integrität bzw. sein Faltungszustand festgestellt werden. Wichtige Kriterien sind hierbei die Verteilung der chemischen Verschiebungen der Rückgrat-NH-Gruppen, die Schärfe und Intensität der Peaks und die Anzahl der deutlich unterscheidbaren Signale.

Abbildung 27 zeigt am Beispiel von 1D-Protonenspektren des Proteins α -Lactalbumin den Einfluss des Faltungszustands auf Signalschärfe und Verteilung der chemischen Verschiebung. Bei einem gefalteten Protein unterscheiden sich die chemischen Umgebungen der verschiedenen Kerne deutlich, sie sind z.B. im Inneren des Proteins in einer unpolaren Umgebung, an der Oberfläche exponiert gegenüber dem wässrigen Puffer. Weiterhin können Ionen des Puffers gebunden sein oder Wasserstoffbrückenbindungen vorliegen. Bei einem ungefalteten Protein fällt die Spannbreite der chemischen Verschiebungen insbesondere der Protonen deutlich schmaler aus. Die Form der Peaks erlaubt Aussagen über die Stabilität des Proteins. Linienverbreiterungen können unterschiedliche Ursachen haben. Ein wichtiger Faktor ist die Korrelationszeit τ_c , die Peakschärfe nimmt mit steigender τ_c ab. τ_c wiederum ist abhängig von Größe und Form des untersuchten Moleküls. Rotiert das Molekül langsam im Vergleich zur NMR-Zeitskala, werden die Anisotropie der chemischen Verschiebung und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen nicht gemittelt und führen so zur Peakverbreiterung. Ungewöhnlich breite Peaks für eine gegebene Proteinmasse können ein Indikator für eine Dimerisierung oder unspezifische Aggregation sein, die so zu einer erhöhten apparenten Molekülmasse führen. Eine weitere wichtige Ursache für verbreiterte Signale können Austauschprozesse chemischer oder struktureller Art sein. Die Anzahl der beobachtbaren Signale sollte mit den zu erwartenden übereinstimmen. Im ^{15}N -HSQC erwartet man Signale aller Rückgratprotonen außer der der N-terminalen Aminosäure, da die Aminogruppe mit H_2O austauscht, während die Amidprotonen ausreichend gegen Austausch geschützt sind. Das ergibt also die Anzahl der Aminosäuren minus die Anzahl der Proline (die keine Amidprotonen besitzen) minus eins. Im Falle von CDC25A_kat sollten also 183 Resonanzen zu beobachten sein. Zusätzlich sind noch Signale der Seitenketten-Amidprotonen zu erwarten, also von Glutamin und Asparagin. Diese sind jedoch gut von den Rückgrat-Amidprotonen zu unterscheiden. Sie sind einerseits in einem klar definierten spektralen Bereich zu erwarten, für ^1H zwischen 6,5 und 8 ppm und für ^{15}N zwischen 110 und 115 ppm. Andererseits treten sie in Paaren auf, bei gleicher chemischer Verschiebung in ^{15}N gibt es jeweils zwei Signale in der ^1H -Dimension im Abstand von ungefähr 0,7 ppm. Hier sind also zusätzlich 7 Peakpaare zu erwarten. Außerdem können Tryptophan-Seitenkettensignale bei chemischen

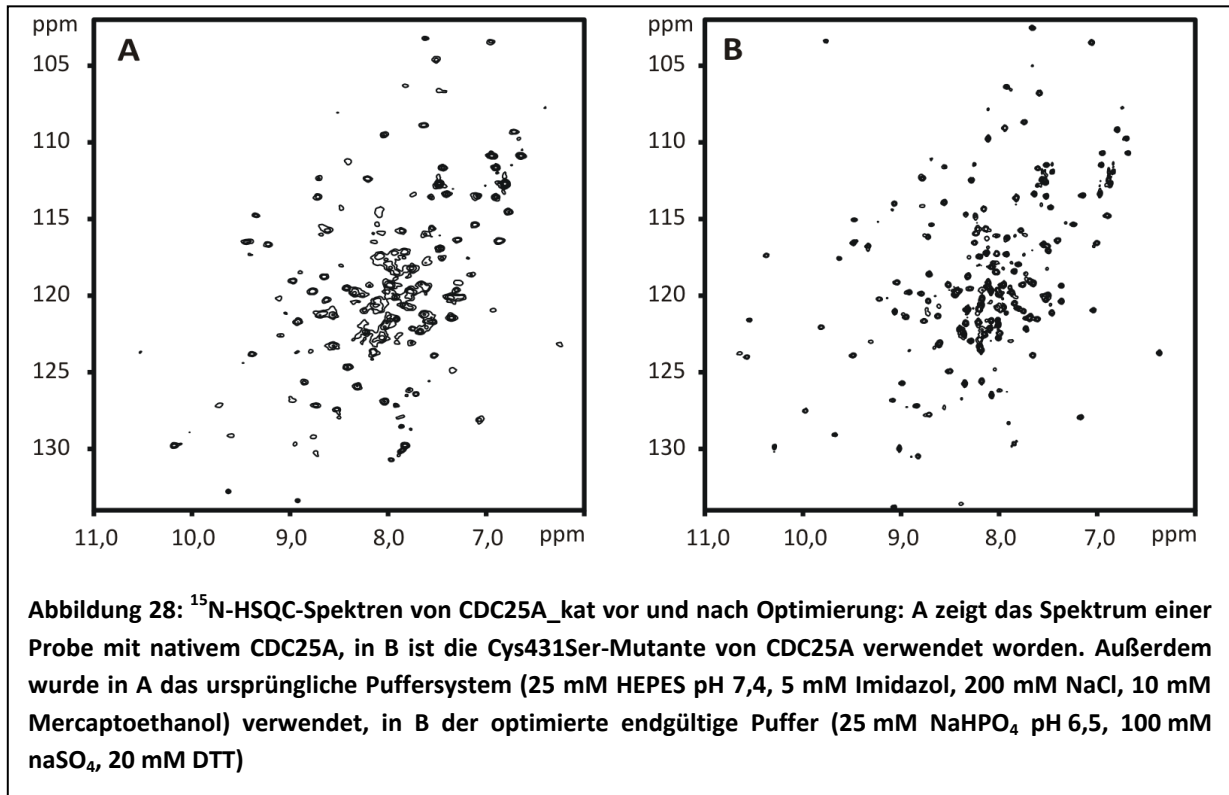


Verschiebungen oberhalb 10 ppm (^1H) und 125 ppm (^{15}N) (hier 1 Signal) und Arginin-Seitenkettensignale im Bereich 7 bis 8,5 ppm (^1H) und oberhalb 130 ppm (^{15}N) (hier 14) beobachtet werden, letztere sind allerdings ins Spektrum gefaltet und erscheinen daher negativ.

Nach erfolgter Aufreinigung mit nahezu unmodifiziertem Standardprotokoll wurde ein HSQC bei 25°C aufgenommen (Puffer: 25 mM HEPES pH 7,4, 5 mM Imidazol, 200 mM NaCl, 10 mM Mercaptoethanol). Die Probenkonzentration beträgt ca. 400 μM . In Abbildung 28, Panel A ist dieses Spektrum dargestellt. Man kann grundsätzlich eine gute Verteilung der Peaks erkennen, was auf ein in nativer Struktur vorliegendes Protein schließen lässt. Allerdings zeigt sich im Zentrum des Spektrums eine höhere Dichte an Peaks, die außerdem breiter und intensiver sind. Dies deutet auf eine Überlagerung von Peaks entarteter chemischer Verschiebung hin und führt dazu, dass von den erwarteten 184 Peaks (Rückgrat und Tryptophan-Seitenkette) nur 132 sichtbar sind, dies entspricht 71 %. Von den Peakpaaren der Glutamin- und Asparagin-Seitenketten sind 5 sichtbar, ebenfalls 71 %. Diese geringe Anzahl an detektierbaren Resonanzen lässt auf eine der oben genannten Ursachen

Ergebnisse und Diskussion

schließen. Nach Optimierung der Pufferbedingungen für die größtmöglicher Stabilität und entsprechender Mutation des aktiven Zentrums muss die Vergleichbarkeit der NMR-Spektren nachgewiesen werden. Abbildung 28, Panel B zeigt ein Spektrum mit optimiertem Konstrukt und

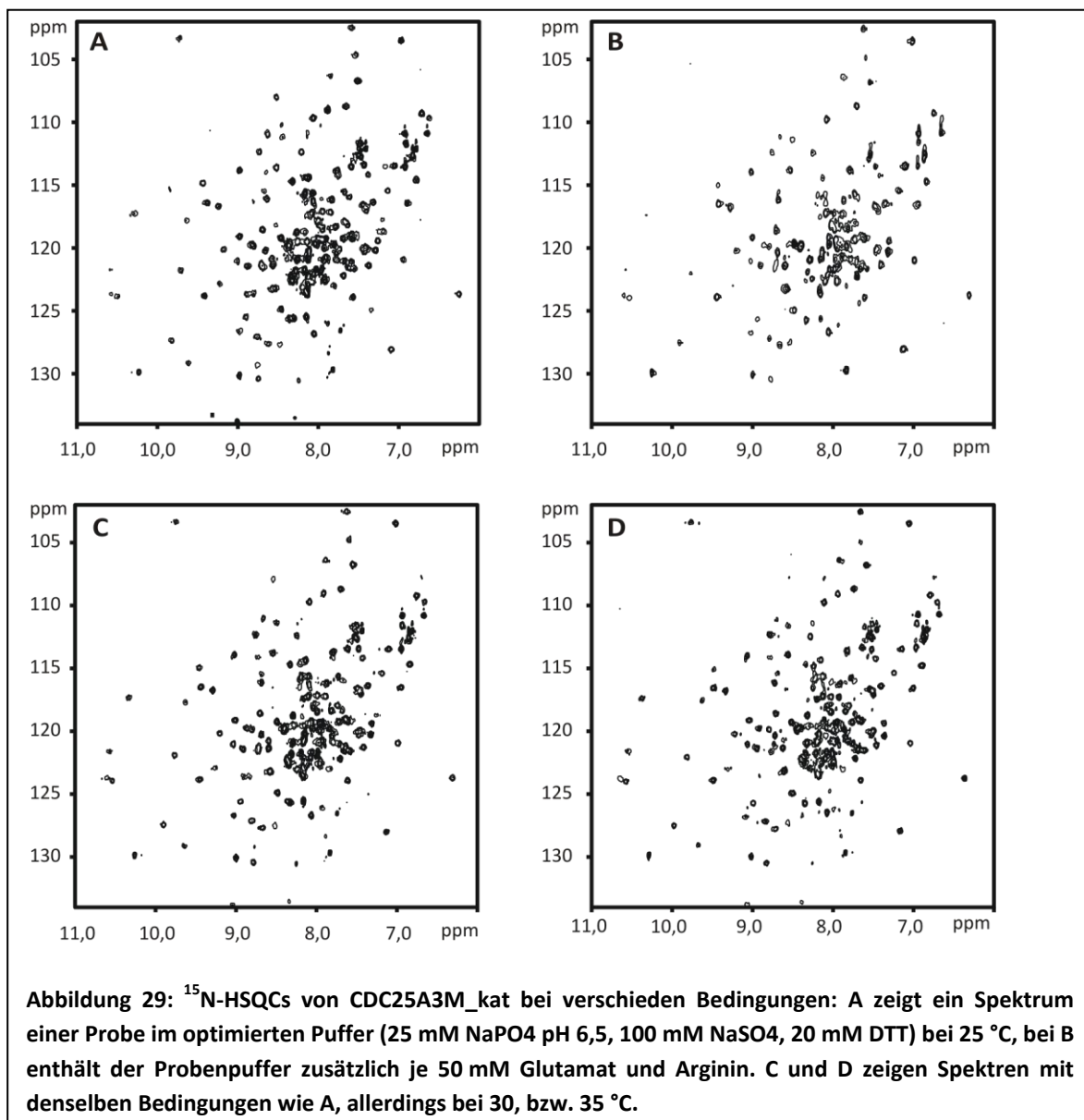


Puffer. Grundsätzlich hat sich das Spektrum deutlich verbessert, die Peakschärfen haben deutlich zugenommen und zusätzliche Peaks sind aufgetaucht. Allerdings zeigen im Vergleich zu bereits im ursprünglichen Puffer deutlich sichtbaren Peaks durchaus Verschiebungen. Allerdings sind bei den eher am Rand liegenden Signalen viele eindeutig übereinstimmende Muster zu erkennen. Zusätzlich ist die Verbesserung gerade im Zentrum des Spektrums sehr deutlich. Der Vergleich zeigt, dass sich das Puffersystem auch für NMR-Messungen gut eignet.

Trotz der erhöhten Langzeitstabilität des Proteins ergeben sich keine markanten Veränderungen im Spektrum. Es treten zwar einige Peaks deutlicher hervor und die Auflösung im zentralen Bereich scheint besser (wobei dies auch unterschiedlichen Parametern der eigentlichen NMR-Messung geschuldet sein kann), doch hat sich die Anzahl der sichtbaren Signale nicht erhöht. Obwohl Oligomerisierung des Proteins durch Bestimmung des hydrodynamischen Radius per DOSY-NMR-Messungen (s.o.) bereits ausgeschlossen werden konnte, wurde zusätzlich der Einsatz von Glutamat und Arginin im NMR-Puffer (Abbildung 29, Panel B) zur Unterbindung unspezifischer Wechselwirkungen in der Proteinprobe getestet. Die Zugabe von je 50 mM Glutamat und Arginin wurden erfolgreich eingesetzt, um sowohl die maximal erreichbare Proteinkonzentration und die Langzeitstabilität zu erhöhen (Golovanov, Hautbergue et al. 2004), als auch um unspezifische

Aggregation zu unterdrücken (Blobel, Schmidl et al. 2007). Im vorliegenden Fall führt dies anstatt zu einer Verbesserung der Spektren zu einer Signalverbreiterung. Veränderungen der Temperatur können durch Beeinflussung von Relaxations- und Austauschprozessen zur Verschärfung und Verstärkung der Signale führen, daher wurde eine Temperaturreihe aufgenommen. Innerhalb eines Bereichs von 25 bis 30 °C zeigen sich nur die zu erwartenden stetigen Temperaturshifts bestehender Signale, nicht aber Änderungen der Peakintensität, Linienschärfe oder das Auftauchen zusätzlicher Peaks. Die Spektren des endgültigen optimierten Puffersystems zeigen auch keine wesentlichen Abweichungen gegenüber denen im ursprünglichen Standardpuffer, auf Grund der geringeren Ionenstärke und deutlich höheren Langzeitstabilität wird dieses nun für alle weiteren Messungen verwendet.

Der nur geringe Einfluss der verschiedenen Puffersysteme auf die Qualität der Spektren,



insbesondere die geringe Anzahl der Peaks und die hohe Peakdichte im zentralen Bereich des Spektrums, weist darauf hin, dass Teile des Proteins im nativen Zustand eine hohe Flexibilität aufweisen. Dies führt zur bereits erwähnten Peakverbreiterung aufgrund chemischen Austauschs. Diese Flexibilität ist durchaus mit der Funktionalität des Proteins in Einklang zu bringen. So zeigen die Proteinkinasen p38 und PKA trotz katalytischer Aktivität nur 75 % der erwarteten Rückgratpeaks (davon 85 % zugeordnet) (Vogtherr, Saxena et al. 2005), bzw. 70 % (davon 70 % zugeordnet) (Thomas Langer 2004). Interessanterweise entsprechen die nicht beobachtbaren Bereiche der Aminosäuresequenzen den vergleichbaren strukturellen Bereichen. Vergleicht man die Spektren von CDC25A und CDC25B (Saxena, nicht gezeigt), gleichen diese sich sowohl in Peakverteilung als auch in Anzahl der sichtbaren Peaks. Dies weist darauf hin, dass eine erhöhte Flexibilität ein grundsätzliches Merkmal der humanen CDC25-Phosphatasen ist.

Aminosäure-spezifische Markierung

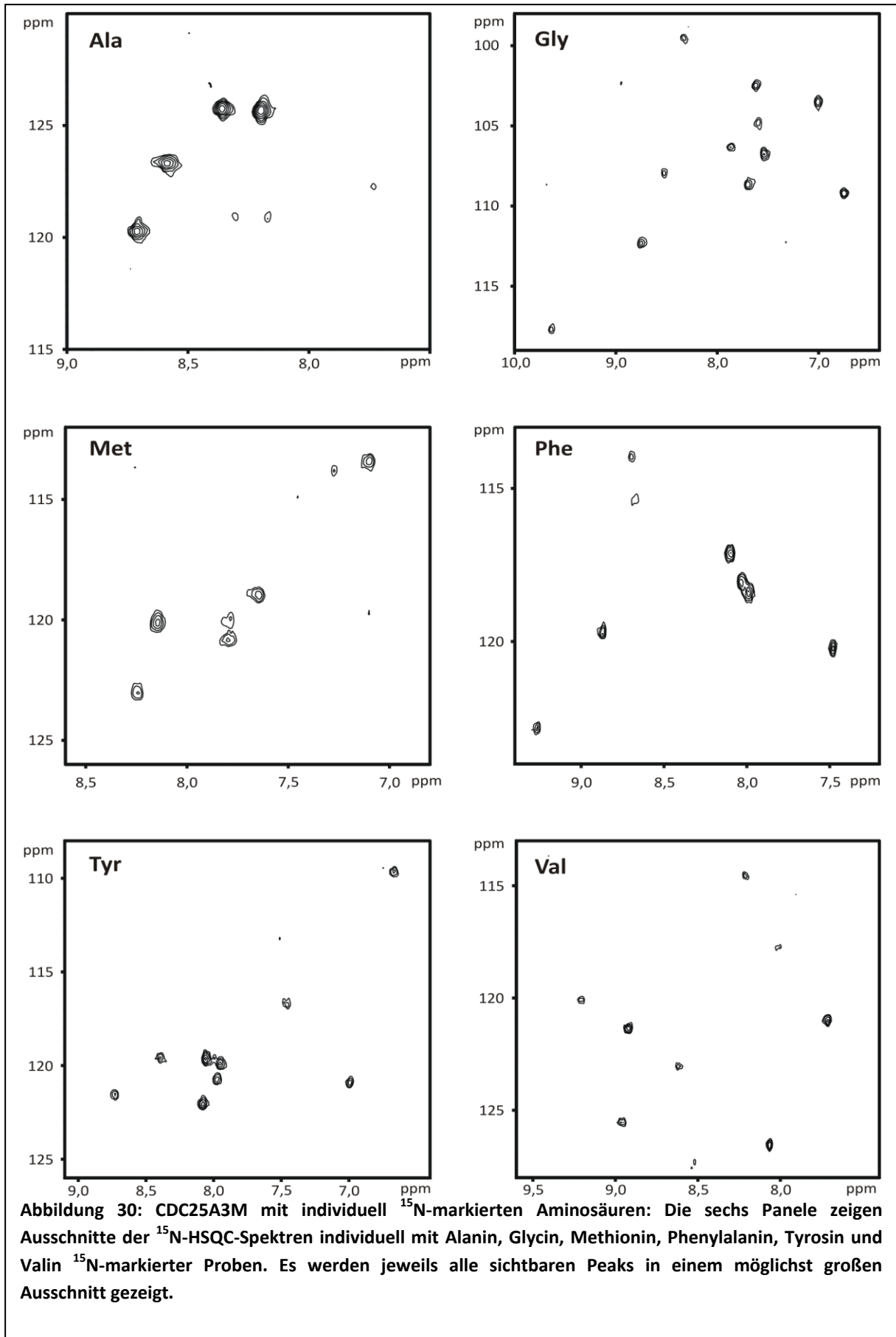
Durch Produktion von Protein mit individuell ¹⁵N-markierten Aminosäuren können stark vereinfachte Spektren aufgenommen werden. Ist die sequentielle Zuordnung der Amidprotonen noch nicht bekannt, kann allein die Bestimmung des Aminosäuretyps eines Signals eben diese Zuordnung erleichtern. Zusätzlich zu den sequentiellen Verknüpfungen, die durch die Tripelresonanz-Experimente gefunden werden (s.u.), lassen sich schon im frühen Stadium der Zuordnung kurze Bereiche eindeutig mit der Sequenz in Einklang bringen, wenn sie eindeutige Muster der markierten Aminosäuren enthalten. Ist die Zuordnung bekannt, können aufgrund der extremen Vereinfachung der Spektren geringfügige Veränderungen der chemischen Verschiebung oder der Peakintensität viel besser untersucht werden, gerade in Bereichen mit sich überlagernden Peaks. Mit folgenden Aminosäuren individuell ¹⁵N-markierte Proben von CDC25A_{kat} hergestellt: Alanin, Glycin, Phenylalanin, Methionin, Tyrosin und Valin. Diese eignen sich für die individuelle Markierung gut, da

sie eine geringe Neigung zum „Scrambling“, dem Übertragen der markierten Stickstoffatome auf andere Aminosäuren, aufweisen. Scrambling führt zum Signalverlust der gewünschten Aminosäure und zum Auftreten zusätzlicher Signale, die eine Zuordnung der Signale zu einem bestimmten Aminosäure-Typ erschweren oder ganz verhindern. Nur durch die

Aminosäure	Erwartet	Gefunden	Anteil
Alanin	5	4	80 %
Glycin	14	11	79 %
Phenylalanin	11	9	78 %
Methionin	6	5	83 %
Tyrosin	13	10	77 %
Valin	11	6	55 %
Summe	60	45	75 %

Tabelle 2: Übersicht über die Anzahl der sichtbaren und der zu erwartenden Peaks in den ¹⁵N-HSQC der individuell markierten Aminosäuren

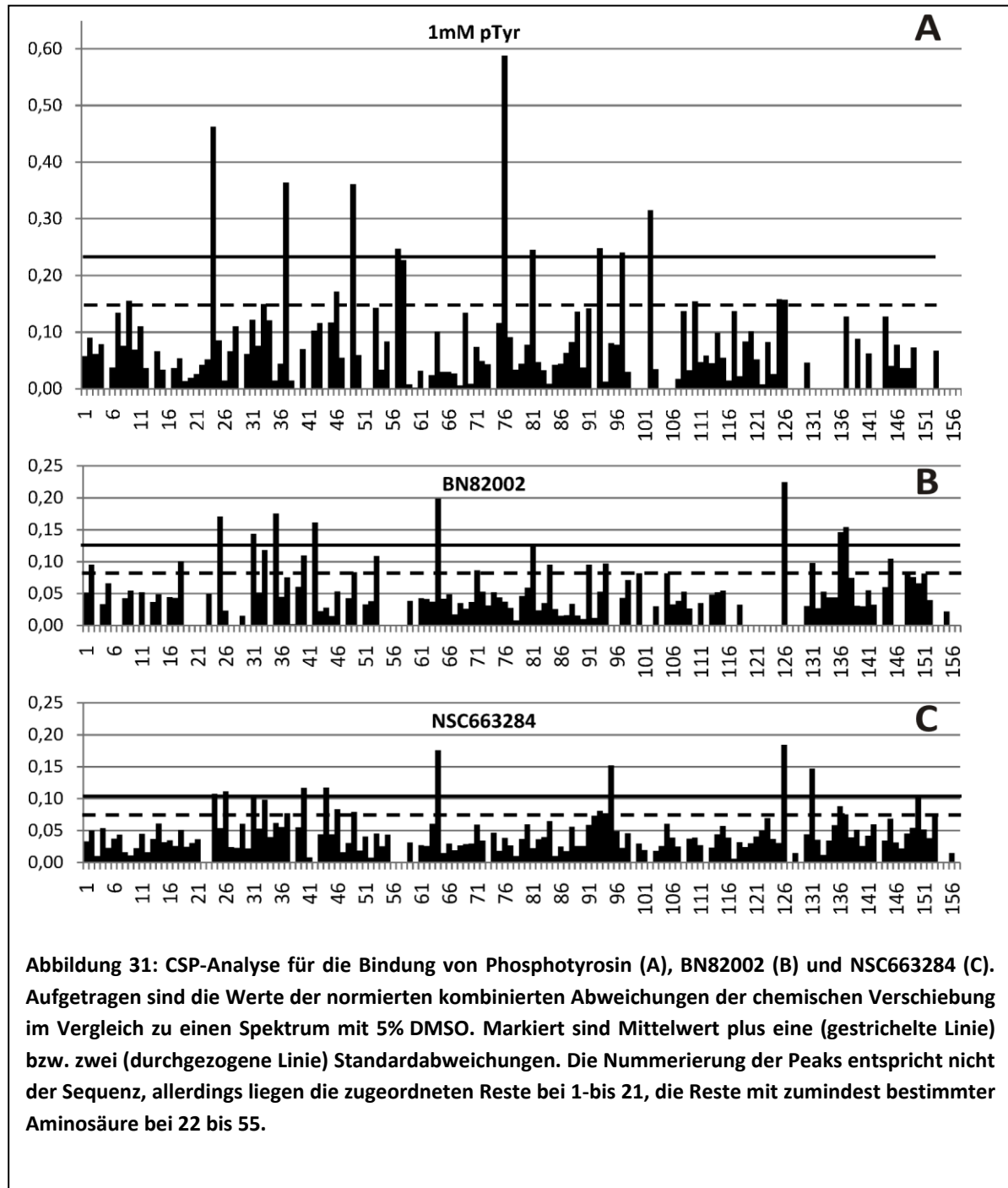
Methode der zellfreien Expression (Staunton, Schlinkert et al. 2006) lassen sich andere Aminosäuretypen effektiv markieren. Die Eignung von CDC25A_kat für diese Methode wurde getestet, allerdings war es trotz Optimierungsrounden nicht möglich, Protein in löslicher Form zu gewinnen. Die Expression und Aufreinigung des individuell markierten Proteins erzielte eine erhöhte Ausbeute gegenüber klassischem M9-Medium. Abbildung 30 zeigt die gemessenen ^{15}N -HSQC-Spektren, diese zeigen grundsätzlich eine gute Signalschärfe und -intensität. Im Spektrum der Alanin-markierten Probe zeigen sich 4 sehr deutliche Peaks mit vergleichbarer Intensität, die zusätzlich sichtbaren Signale liegen nur knapp über dem Rauschen, bei Glycin-Markierung sind insgesamt 11 Peaks zu beobachten, Sechs davon zeigen eine höhere Intensität als die anderen fünf. Markierung mit Methionin ergibt fünf deutliche Signale, allerdings zeigen sich zwei niedrigere Peaks nur knapp über dem Rauschen, die nicht als originäre Signale bewertet werden. Bei Phenylalanin-Markierung ergibt sich ein klares Bild mit sechs scharfen Peaks vergleichbarer Intensität und nur schwachen Artefakten. Das Spektrum der Tyrosin-markierten Probe zeigt erneut zwei Gruppen von Peaks, vier starke (um 8 ppm in ^1H -Dimension) und sechs schwache, einer davon mit zweien der starken überlagert (s. Pfeil). Beim Valin-markierten CDC25A_kat sind ebenso unterschiedliche Intensitäten zu erkennen, allerdings nicht so gut gruppierbar wie in den anderen Spektren. Drei sehr starken Peaks stehen sechs schwächere gegenüber, die allerdings untereinander deutlich differenzierte Intensitätsunterschiede aufweisen und nicht alle dem Valin zugeordnet werden. Allen Spektren gemein ist allerdings die Tatsache, dass nicht alle zu erwartenden Peaks sichtbar sind (siehe Tabelle 2). Insgesamt sind ca. 75 % der zu erwartenden Peaks in den verschiedenen Spektren zu beobachten. Dies unterstützt wiederum die These, dass CDC25A flexible Bereiche hat, die in chemischem Austausch stehen. Durch die individuelle Markierung wird die Wahrscheinlichkeit von Signalüberlappungen, welche das Peak-picking erschweren und zu fehlenden Signalen führen, deutlich verringert. Das Fehlen von Signalen rührt nun noch wahrscheinlicher von erhöhter Flexibilität her, welche zur Signalverbreiterung führt. In Konsequenz zeigt sich, dass individuelle Markierung zwar helfen kann, Signalüberlappungen zu klären und Anfangspunkte für einen „sequential walk“ zu liefern, aber nicht das grundsätzliche Problem der Signalverbreiterung durch Austausch lösen kann.

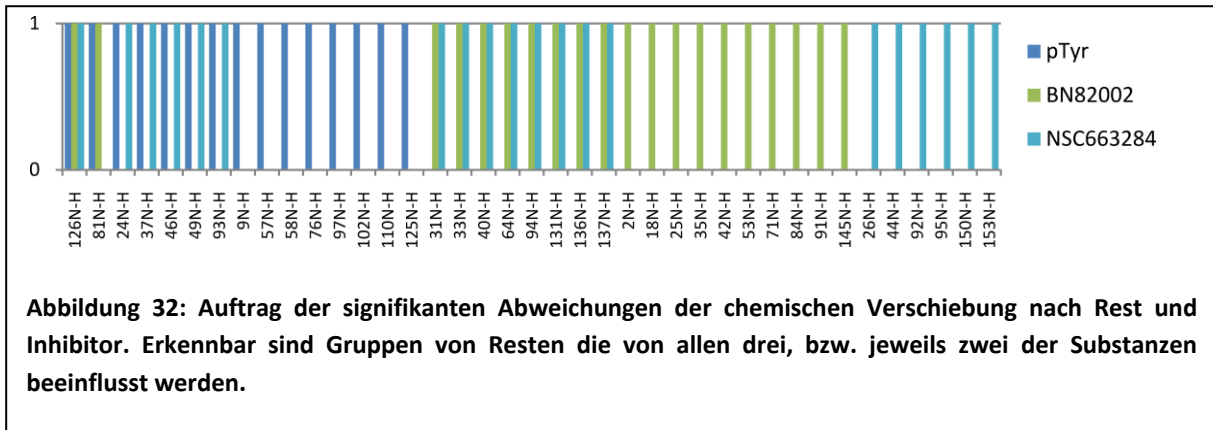


Titration mit Inhibitoren

Zur Identifikation von Aminosäureresten in CDC25A_kat die durch die Bindung von Phosphotyrosin, bzw. den beiden Inhibitoren BN82002 und NSC663284 beeinflusst werden, wurden die Abweichungen der chemischen Verschiebungen gegenüber einem Standardspektrum gemessen. Die Abweichungen in ^1H und ^{15}N -Dimension werden normiert kombiniert. Die kombinierte normierte Abweichung Δ errechnet sich aus den Einzelverschiebungen durch $\Delta = \sqrt{(\Delta^{15}\text{N})^2 + (w \cdot \Delta^{1\text{H}})^2}$ mit dem Korrekturfaktor w als Quotient der Standardabweichungen aller Signale in ^{15}N - und ^1H -Dimension ($w = S(^{15}\text{N})/S(^1\text{H})$). Signale, die den Mittelwert um zwei Standardabweichungen übersteigen, werden als signifikant angesehen, allerdings dürfen Signale, die den Mittelwert um eine Standardabweichung übertreffen in die Betrachtung miteinbezogen werden. Wie Abbildung 31 zeigt, bewirkt Phosphotyrosin stärkere Abweichungen der chemischen Verschiebung als die beiden Inhibitoren, allerdings sind auch die unspezifischen Abweichungen deutlich stärker (Mittelwert um 50% höher, Standardabweichung um 100%). Phosphotyrosin zeigt neun deutliche und weitere sechs schwache Abweichungen, BN82002 und NSC663284 zeigen jeweils acht deutliche und weiter 12 schwache Abweichungen. Da die sequentielle Zuordnung der Aminosäurereste nur lückenhaft ist und die Auftragung in der Grafik daher nicht der Aminosäuresequenz folgt, lassen sich keine Schlüsse über Bereiche im Protein ziehen, die durch Bindung des jeweiligen Moleküls beeinflusst werden. Interessant ist allerdings die Frage, ob sich Signale finden, die durch zwei oder alle drei Sonden gleichzeitig verschoben werden. Zu diesem Zweck wurden in Abbildung 32 alle Reste aufgetragen, die in zumindest einem der Spektren ausreichend verschoben wurden. Es gibt nur eine Aminosäure, deren Rückgrat-NH-Signal sowohl von Phosphotyrosin als auch von beiden Inhibitoren, und nur ein Signal das von Phosphotyrosin und BN82002 ausreichend beeinflusst wird. Allerdings teilt sich NSC663284 mit Phosphotyrosin fünf und mit BN82002 acht Signale mit ausreichender CSP. Außerdem gibt es zahlreiche Signale, die nur von einem der Moleküle verändert werden. Beachtenswert ist die gemischte Gruppierung der Signale. Gilt die grundsätzliche Annahme, dass alle drei Moleküle primär im aktiven Zentrum binden, sollte sich eine sehr große Übereinstimmung der spektralen Veränderungen zeigen. Da Phosphotyrosin und BN82002 kaum eine Übereinstimmung zeigen, würde man davon ausgehen, dass zwei verschiedene Bindungsmodi vorliegen. Wird angenommen, dass Phosphotyrosin im aktiven Zentrum bindet, würde das für BN82002 bedeuten, dass es außerhalb binden muss. Die Frage nach dem Modus der Inhibition ist bleibt dann offen, und würde dann für eine transiente Interaktion und Inhibition durch Modifikation sprechen. Umgekehrt könnte BN82002 fest im aktiven Zentrum binden und so blockieren, während Phosphotyrosin an einer anderen Stelle bindet und tatsächlich nur kurzfristig im aktiven Zentrum verbleibt. Unabhängig davon spricht einiges dafür, dass NSC663284 in die Bindungstasche eindringt, da es eben mit den

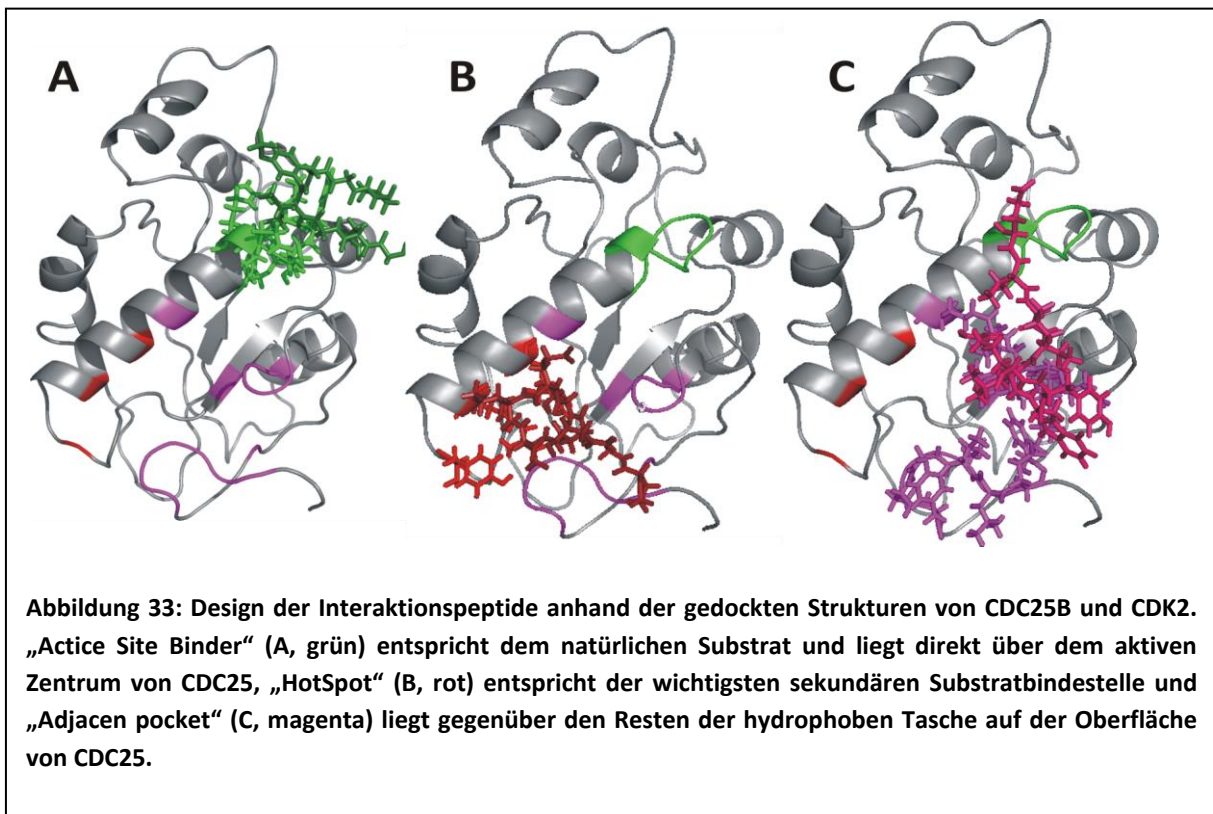
beiden anderen deutliche Peakveränderungen teilt. Möglich wäre hier ein Wechsel zwischen Bindung im aktiven Zentrum und einer zweiten Position auf der Proteinoberfläche oder das ein Teil des Inhibitors, der größer ist als das Phosphotyrosin, aus der Bindungstasche herausragt und so auch einen von BN82002 belegten Bereich erreicht. Leider muss dies ohne weitere Zuordnungserfolge Spekulation bleiben.





Titration mit Interaktionspeptiden

Aufgrund des flachen und den anderen „dual-specificity“-Phosphatasen sehr ähnlichen aktiven Zentrums sind sekundäre Wechselwirkungen an der Kontaktoberfläche zwischen Phosphatase und Substrat als Mittel der Substraterkennung wahrscheinlich. Basierend auf einer per Docking simulierten Struktur von CDC25B mit seinem Substrat CDK2-pTpY/Cyclin A von Sohn et. al. (Sohn, Parks et al. 2005) wurden drei verschiedene Peptide hergestellt, um deren Interaktion mit CDC25A studieren zu können. Das „Active Site Binder“-Peptid (ASB) entspricht der konservierten Aminosäuresequenz um die beiden phosphorylierten Zielaminosäuren Thr14 und Tyr15 von CDK2, diese liegen im synthetisierten Peptid ebenfalls in phosphorylierter Form vor. Dies wurde per ^{31}P -



NMR-Spektroskopie nachgewiesen (nicht gezeigt). „Hotspot“ entspricht der Sequenz, die durch Docking und zielgerichtete Mutagenese als wichtiges Substraterkennungsmerkmal identifiziert wurde. Die Aminosäurereste Asn206 und Asn210 sind für Bindung und Dephosphorylierung von großer Bedeutung. Als drittes Peptid wird ein Bereich auf CDK2 ausgewählt, der von Rudolph als zusätzlicher Interaktionsvermittler postuliert wird (Rudolph 2007). In Nachbarschaft der Hotspot-Aminosäurereste auf CDC25B liegt eine ausgeprägte hydrophobe Tasche auf der Proteinoberfläche, die mit CDK2 in Kontakt steht. Die Schleife, die mit dieser Tasche interagiert, wird als „Adjacent pocket“-Peptid (AP) bezeichnet. In Tabelle 3 sind die Sequenzen der Peptide angegeben und Abbildung 33 zeigt die Struktur von CDC25B und die entsprechenden Abschnitte von CDK2, die ausgewählt wurden. Daran lässt sich die Lage auf der Proteinoberfläche gut erkennen. Für die Peptidbindungsstudien

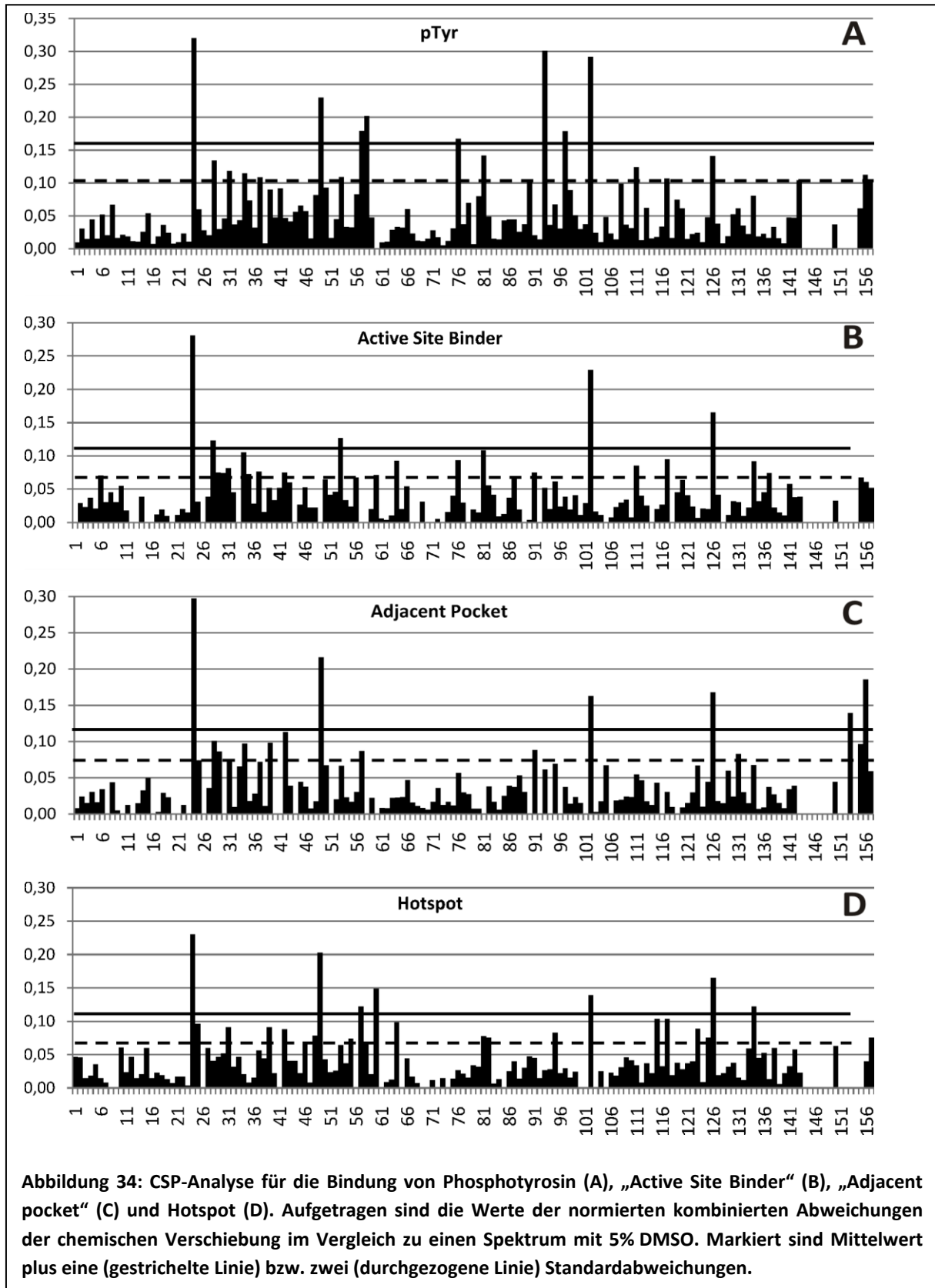
wurde die Cys430Ser-Mutante verwendet, da die Dephosphorylierung des ASB nicht erwünscht ist.

Peptid	Sequenz
Active Site binder	QKVEK IGEGpT pYGVVY KA
Hotspot	PGDSE IDQ
Adjacent pocket	EVVTL WYRAP E

Tabelle 3: Sequenzen der Interaktionspeptide

Wie für die Inhibitoren wurde die kombinierte Abweichung der chemischen Verschiebungen errechnet, dies ist für Phosphotyrosin und alle drei Peptide in Abbildung 34 dargestellt. Für alle vier Moleküle gibt es als „deutliche“ und „schwache“ Abweichungen der chemischen Verschiebung: Für Phosphotyrosin acht, bzw. 11, für ASB fünf, bzw. 14, für HotSpot sieben, bzw. 15 und für AP sechs, bzw. 10. Insgesamt 14 der Peaks sind mit einem Aminosäuretyp assoziiert, von den echt zugeordneten ist keiner dabei. Interessant ist wiederum inwiefern die beeinflussten Aminosäurereste übereinstimmen oder für die verschiedenen Moleküle individuell sind. Da die verschiedenen Peptide spezifisch dafür angepasst wurden an verschiedenen Stellen auf der Moleküloberfläche zu binden, sollten sich einige individuelle Verschiebungsgruppen erkennen lassen. Die größten Übereinstimmungen sind zwischen Phosphotyrosin und ASB zu erwarten, da sie ja beide am aktive Zentrum binden sollten, HotSpot liegt von der Bindungsstelle am weitesten entfernt, AP zwischen der HotSpot-Bindungsstelle und dem aktiven Zentrum. Abbildung 35 zeigt wiederum die Aminosäurereste und die Beeinflussung durch die verschiedenen Moleküle. Insgesamt gibt es vier Peaks, die durch alle vier Moleküle verschoben wurden, sieben, die durch drei der vier Moleküle verschoben wurden und elf Paare. Jedes der Moleküle hat zumindest zwei individuelle CSPs, HotSpot mit deutlichem Abstand neun. Wichtig ist nun, ob sich aus diesen CSP-Mustern „Cluster“ erkennen lassen, um die oben angestellten Vermutungen zu stützen. Phosphotyrosin und ASB-Peptid haben insgesamt zwölf gemeinsame CSPs, vier davon sind exklusiv und vier stimmen mit entweder HotSpot

oder AP überein. Phosphotyrosin hat noch vier Reste, die entweder mit HotSpot oder AP oder beiden übereinstimmen. Im Falle von ASB gilt dies für fünf. Vergleicht man die Übereinstimmung zwischen Phosphotyrosin und ASB mit der von HotSpot und AP, so ist erstere sehr viel deutlicher. HotSpot und



Ergebnisse und Diskussion

AP besitzen nur eine exklusive Übereinstimmung und drei mit zusätzlich jeweils einem der anderen beiden Moleküle. Sowohl für HotSpot als auch für AP ist dies ebenso im Vergleich zu Phosphotyrosin bzw. ASB zu beobachten. Wie bereits erwähnt besitzt HotSpot aber noch zusätzliche neun individuelle CSPs.

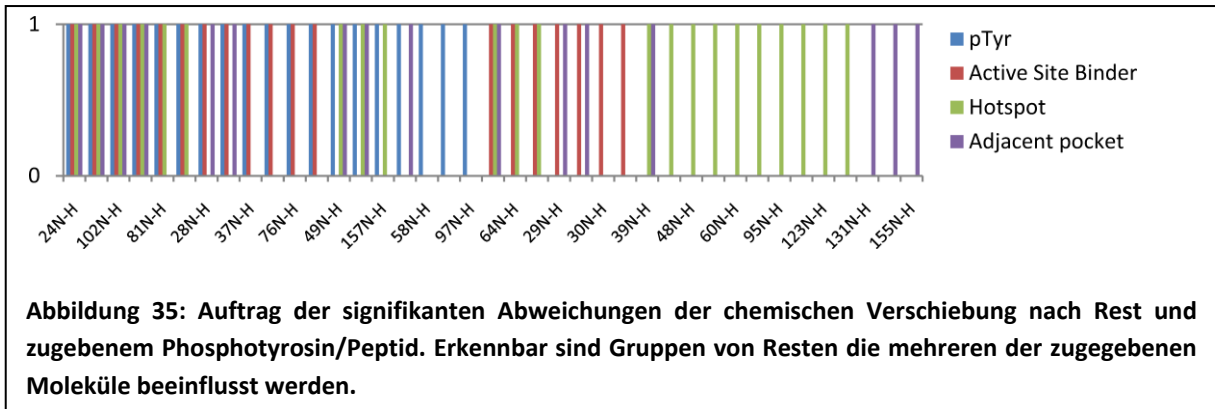
Die hohe Zahl an bei allen Molekülen übereinstimmenden CSPs ist nicht besonders intuitiv, wenn man die entfernte Lage des HotSpot-Peptids zum aktiven Zentrum bedenkt. Eine größere Übereinstimmung zwischen Phosphotyrosin, ASB und AP ist da logischer, weil AP nahe genug am aktiven Zentrum binden sollte. Ein möglicher Grund dafür könnte in einer promiskuitiven Bindungsstelle für Peptide auf der Oberfläche von CDC25 liegen, an der es zu unspezifischer Assoziation kommt. Auch könnte es möglich sein, dass durch die Bindung jedes der Moleküle dieselbe Strukturänderung ausgelöst wird, die nicht direkt an der Bindungsstelle liegt. So könnte die Bindung des HotSpot-Peptids bereits eine aktivierende Wirkung auf CDC25 haben, indem es das reaktive Zentrum strukturell verändert.

Die Zahl der von Phosphotyrosin ausgelösten CSPs ist gleich hoch wie die der Peptide. Dies ist interessant, da die Aminosäure natürlich viel kleiner ist als die Peptide. Gilt die Annahme, dass die Beeinflussung der chemischen Verschiebung nur aufgrund der Nähe zur Proteinoberfläche auftritt, würde das mehrere Bindungsstellen von Phosphotyrosin auf der Proteinoberfläche bedeuten. Andererseits würde eine durch Bindung ausgelöste Strukturänderung die erhöhte Zahl an CSPs erklären.

Fast zwei Drittel der von ASB ausgelösten Peakverschiebungen stimmen mit Phosphotyrosin überein, was aufgrund der gleichen Bindungsstelle nicht überrascht. Die zusätzlichen CSPs und die Übereinstimmungen mit AP sind sehr einfach zu erklären, da das Peptid zumindest in der gedockten Struktur angrenzend an die hydrophobe Tasche von CDC25 bindet. Die Übereinstimmungen mit dem HotSpot-Peptid sind auch hier nicht intuitiv, lassen sich aber ohne Zuordnung und Lage auf der Proteinoberfläche nicht weiter erläutern.

Das „Adjacent Pocket“-Peptid hat mit Phosphotyrosin und ASB-Peptid mehr CSPs gemein als mit dem HotSpot-Peptid. Aufgrund der etwas näheren Lage zum aktiven Zentrum als zu den „HotSpots“ auf CDC25 ist dies gut vertretbar. Interessant wäre allerdings gerade die eine paarweise Übereinstimmung mit dem HotSpot-Peptid zu bestimmen, da eine Interaktion an derselben Stelle genau das Interesse an der hydrophoben Tasche ausmacht. Ziel wäre, durch ein Molekül, das in dieser Tasche bindet die sekundäre Enzym-Substrat-Interaktion zu stören.

Die vielen individuellen CSPs des HotSpot-Peptids weisen darauf hin, dass es in der Tat an einen Bereich des Proteins bindet, welcher von den anderen Molekülen nicht belegt wird. Dies entspricht der genau der Erwartung, wenn man die Lage der verschiedenen Bindungsstellen auf CDC25 vergleicht. Die Übereinstimmungen mit den anderen Bindern sind wiederum der Möglichkeit einer promiskuitiven Bindungsstelle oder einer weiterreichenden Strukturänderung geschuldet.



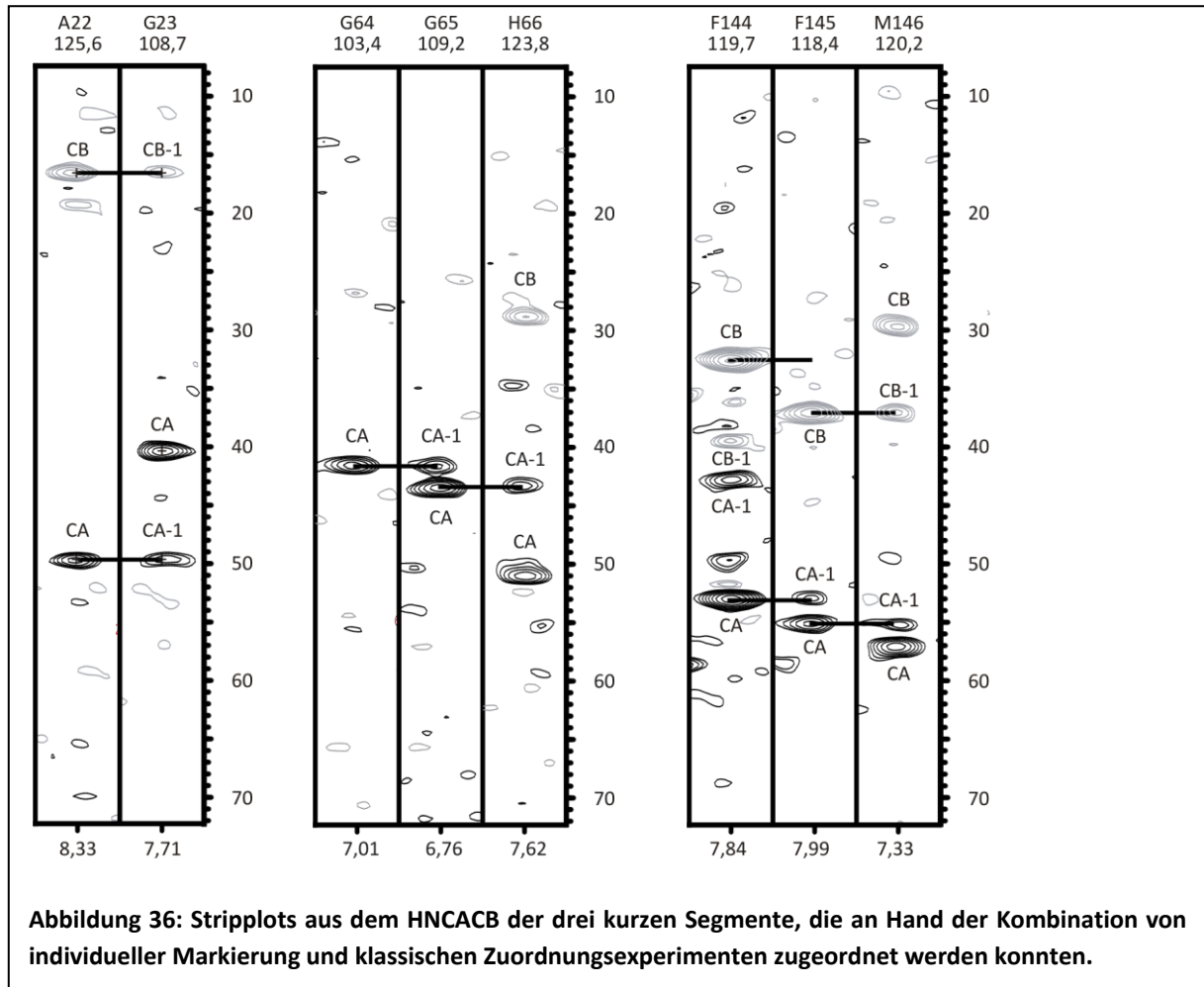
3.2.3 3D-NMR-Experimente

Tripelresonanz-Experimente zur Zuordnung der Rückgratresonanzen

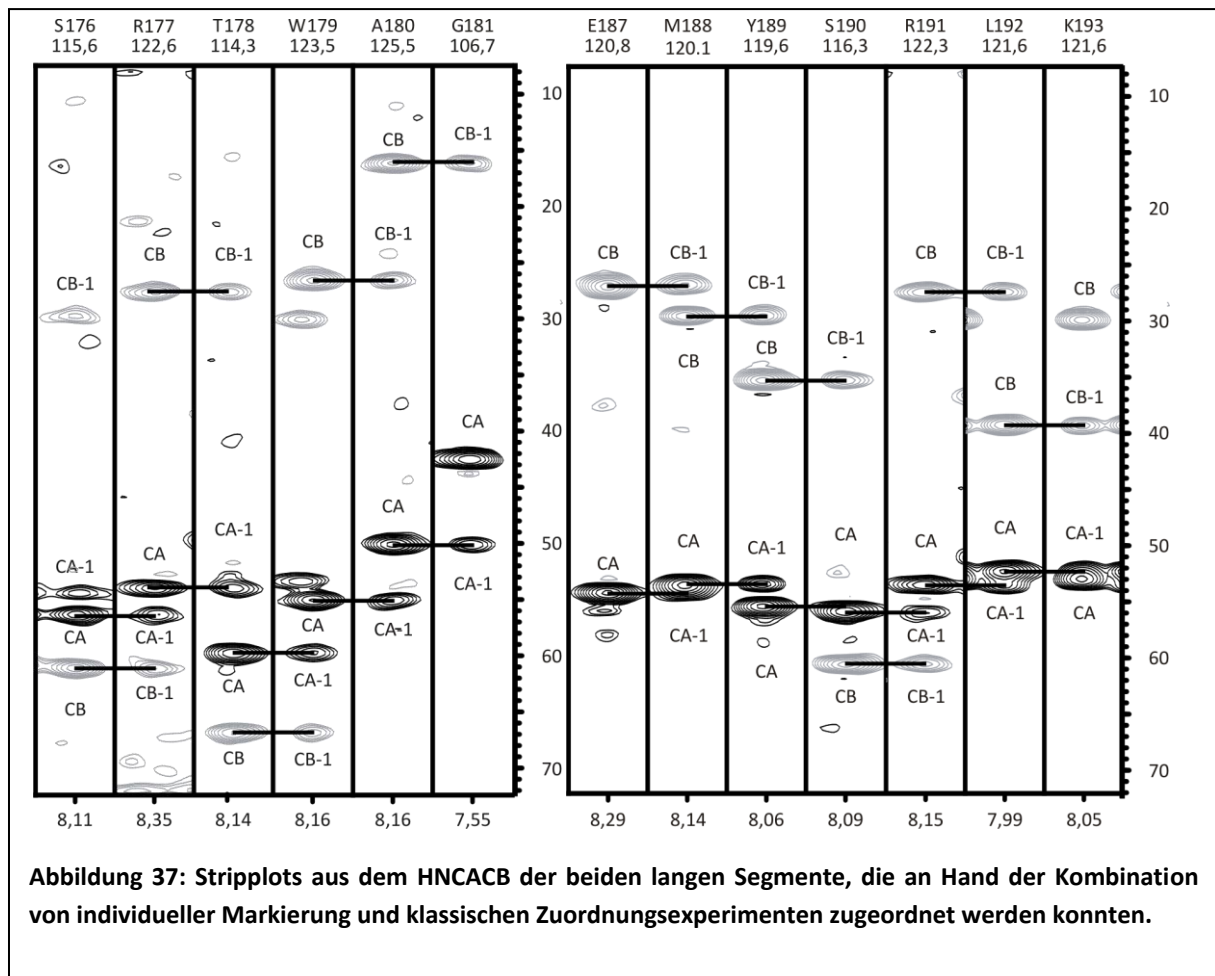
Um die Signale im HSQC-Spektrum den einzelnen Aminosäureresten zuordnen zu können, wurden an einer ^{15}N , ^{13}C -markierten CDC25A_{kat}-Probe die Tripelresonanzexperimente HNCO, HNCA und HNCACB durchgeführt. Eine einfache Analyse der Spektrenqualität auf der Basis der Anzahl der beobachteten Signale ist in Tabelle 4 dargestellt. Ein vollständiges Spinsystem stellt im HNCO einen Peak dar, definiert durch die chemischen Verschiebungen von N und H_N einer Aminosäure und C' der vorhergehenden Aminosäure. Im HNCA sind N und H_N mit dem C_α sowohl der eigenen als auch der vorhergehenden Aminosäure korreliert, der zweite Peak ist jeweils schwächer. Im HNCACB kommen noch die Korrelationen mit den C_β hinzu, diese sind negativ im Vorzeichen. Beim Glycin sind keine Peaks der C_β zu sehen.

Erwartete Spinsysteme	184
Peaks im HSQC	132
Seitenkettenpeakpaare	5
Alle Spinsysteme im HNCACB	86
Alle Spinsysteme im HNCA	119
Alle Spinsysteme im HNCO	121
Komplette Spinsysteme im HNCACB, HNCA, HNCO	57
Spinsysteme vollständig im HNCA und HNCO, unvollständig im HNCACB	19
Spinsysteme vollständig im HNCA und HNCO, nicht vorhanden im HNCACB	17
Spinsysteme nur im HNCO	11
Spinsysteme nur im HNCA	1
Andere unvollständige Systeme	16
Spinsysteme fehlend im HNCACB, HNCA, HNCO	11

Tabelle 4: Übersicht über den Zuordnungserfolg aus den Standard-Rückgrat-Spektren



Die Zuordnung erfolgt nun durch den sogenannten „sequential walk“, es werden Paare von Aminosäuren gesucht, bei denen die chemischen Verschiebungen der entsprechenden C_α und C_β eindeutig übereinstimmen. Derartig gefundene Paare werden wenn möglich erweitert, um so schließlich Sequenzbereiche von einem Prolin zum nächsten erschließen zu können. Sollte es nicht möglich sein, lange Abschnitte eindeutig zuzuordnen, können die Aminosäurereste Glycin, Serin und Threonin hilfreich sein, „Anker“ in der Sequenz zu definieren. Glycin wie bereits erwähnt besitzt kein C_β und die chemische Verschiebung der C_α ist im Vergleich zu den anderen Aminosäuren recht niedrig (im vorliegenden Fall wurden die Glycine durch die individuelle Markierung identifiziert). Serin und Threonin sind deutlich an den Verschiebungen der C_β zu erkennen, diese liegen bei deutlich höheren Werten als bei den anderen Aminosäuren, üblicherweise bei über 60 ppm.



Werden nun Sequenzen aufeinanderfolgender Peakssysteme identifiziert, gilt es diese in Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz zu bringen. Hierzu dient einerseits der durch individuelle Markierung bestimmte Aminosäuretyp als auch der Vergleich der chemischen Verschiebungen mit bereits zugeordneten Aminosäureresten aus der Biological Magnetic Resonance Bank¹³. Darauf basierend errechnet CARA einen Konfidenzwert der Zuordnung eines Segmentes zur Aminosäuresequenz. Tabelle 5 listet die 5 zugeordneten Fragmente mit ihren Konfidenzwerten auf. Die ersten beiden Segmente wurden nur auf Grund der identifizierten Aminosäuretypen zugeordnet, da CARA für kurze Segmente nur sehr niedrige Konfidenzwerte ausgibt. Die Zuordnung von F144 bis M146 basiert auf dem identifizierten F145 und dem guten Konfidenzwert (Abbildung 36). Im Segment S 176 bis G181 wurden einerseits A180 und G181 durch individuelle Markierung identifiziert als auch S176 und T178 auf Grund der hohen Verschiebung der C_β. Für E187 bis K193 ließ sich der

¹³ www.bmrb.wisc.edu

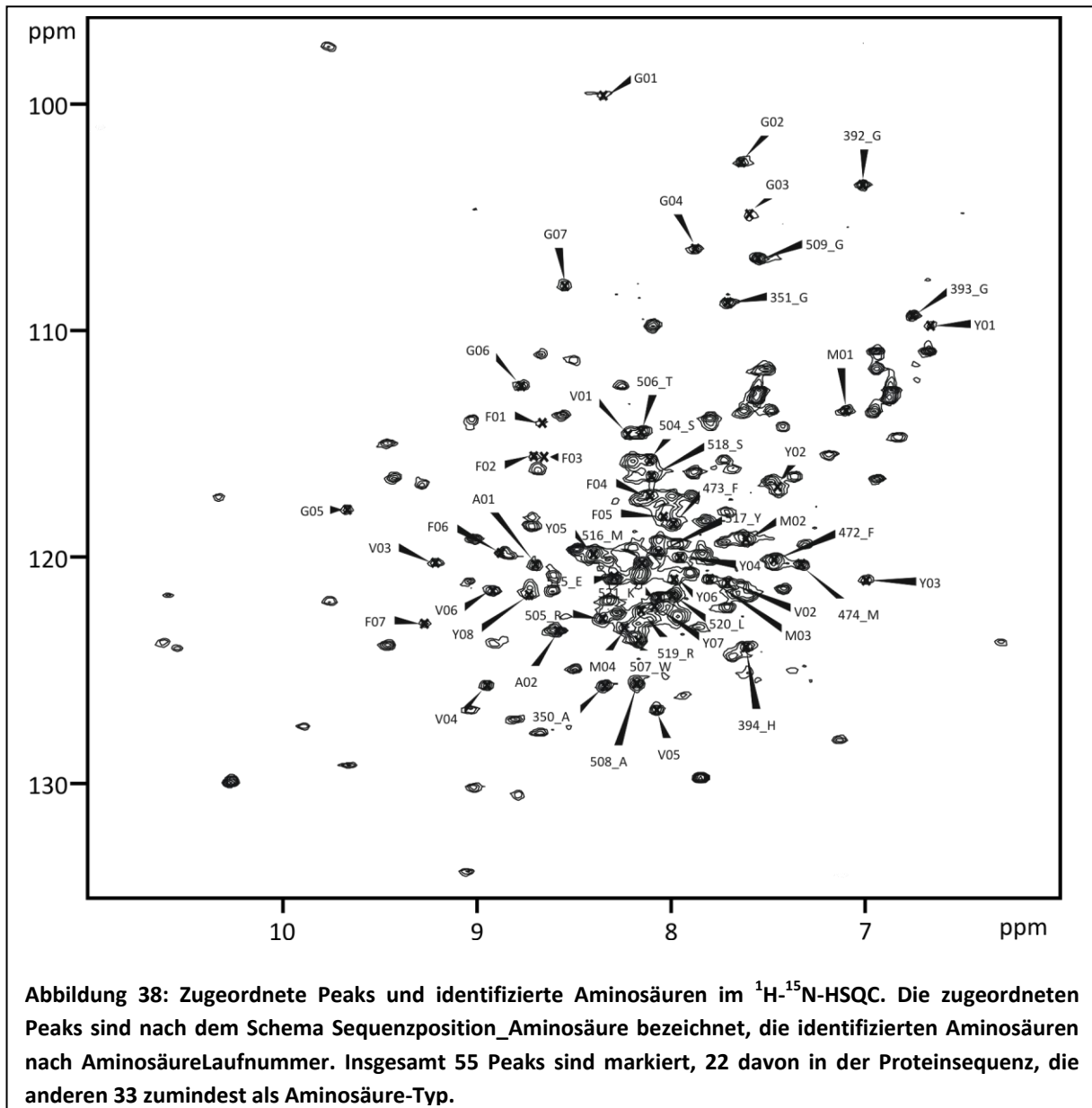
Segment	Konfidenzwert aus CARA
A22 G23	34 %
G64 G65 H66	39 %
F144 F145 M146	71 %
S176 R177 T178 W179 A180 G181	65 %
E187 M188 Y189 S190 R191 L192 K193	68 %

Tabelle 5: Zugordnete Segmente und Konfidenzwerte aus CARA

Aminosäuretyp von M188 und Y189 aus individueller Markierung bestimmen, des Weiteren trägt die hohe C_{β} -Verschiebung zum guten Konfidenzwert bei (Abbildung 37). Insgesamt ist die Ausbeute an Zuordnungen unbefriedigend, insbesondere, da die beiden längsten Segmente im unstrukturierten C-terminalen Bereich des Proteins liegen.

Übersicht über Zuordnung und identifizierte Aminosäuren

In Abbildung 38 ist ein ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum dargestellt, in dem die 55 Peaks, die zugeordnet werden oder mit einem Aminosäuretyp verknüpft werden konnten (Anhang, Tabelle 23). Für 21 Peaks, die aufgrund von Tripelresonanzexperimenten zugeordnet werden konnten, wurde diese für 10 durch die Assoziation mit einem Aminosäuretyp durch individuelle Markierung untermauert. Weitere 34 Peaks bleiben, von denen zumindest der Aminosäuretyp bekannt ist. Diesen 55 Peaks stehen 132 sichtbare Peaks im ^1H - ^{15}N -HSQC gegenüber, wobei grundsätzlich 184 Peaks zu erwarten wären. Trotz Pufferoptimierung, Deuterierung und individueller Markierung von Aminosäuren konnte weder die Zahl der beobachtbaren Peaks, noch die Zuordnungsrate auf ein sinnvolles Maß gesteigert werden. Zusätzliche Versuche zumindest weitere Aminosäurereste durch zellfreie Expression oder durch aminosäurespezifische NMR-Experimente zu identifizieren, konnten nicht erfolgreich durchgeführt werden, da die geringe Stabilität des Proteins oder die hohen Relaxationsraten während der NMR-Experimente dies nicht zuließ.



Betrachtet man die Verteilung der identifizierten Aminosäuren im Spektrum, so liegen praktisch alle markierten Peaks (außer den Glycinen) im zentralen Bereich des Spektrums. Dort sind für CDC25A_kat größere Peakintensitäten zu beobachten, allerdings kommt es dort zu Peaküberlagerungen. Diese hohe Peakdichte im Zentrum spricht dafür, dass das Protein eine hohen strukturelle Flexibilität besitzt oder sogar zum Teil entfaltet ist. Dass für keinen der Peaks im äußeren Spektralbereich Informationen vorliegen, ist insofern seltsam, da solche einzelnen Peaks gut zu identifizieren sein müssten. Die geringere Peakintensität weist aber auf Relaxationseffekte hin, die in den komplizierteren Tripelresonanzexperimenten schnell zum vollständigen Signalverlust führt. Dass allerdings keine der individuell markierten Aminosäuren in diesen spektralen Bereich sichtbar ist, lässt sich nicht schlüssig erklären. Insgesamt zeigt das Spektrum die Schwierigkeit, verlässliche NMR-Parameter für die Klasse der CDC25-Phosphatasen zu erhalten.

Anhang

A.1 Molekularbiologische Protokolle

Tabelle 6: Standard-PCR-Protokoll

Zeit	Temperatur	Wiederholungen
2 min	94 °C	18 Wiederholungen
20 s	92 °C	
30 s	52 °C	
1 min pro kB	68 °C	
∞	4 °C	

Tabelle 7: Ansatz für Restriktionsverdau

10x Puffer	2 µL
100x BSA	0,2 µL
DNA	1 bis 1,5 µg
H ₂ O	ad 20 µL
Enzym€	je 0,5 µL

A.2 Expressionsmedien

Tabelle 8: M9-Minimalmedium zur ¹⁵N/¹³C-Markierung von Proteinen

Komponente	Volumen	Endkonzentration
H ₂ O*	850 ml	
MgSO ₄ 1M*	2 ml	2 mM
CaCl ₂ 1M*	100 µL	0,1 mM
10x M9 Salzbasis (s.u.)*	100 ml	—
Glucose 20 % [†]	20-50 ml	0,4 – 1 %
NH ₄ Cl 0,1 g/ml [†]	10 ml	1 g/l

* autoklaviert, [†] sterilfiltriert

Tabelle 9: Salz-Basis für M9-Minimalmedium

M9 Salzbasis 10x	g/Liter	MW in g/mol	Endkonzentration in M
Na ₂ HPO ₄ × H ₂ O	84,9	178	0,477
KH ₂ PO ₄	30	136,1	0,22
NaCl	5	58,44	0,086

Alle Salze in H₂O lösen, mit 1M NaOH auf pH 7,4 einstellen, autoklavieren.

Tabelle 10: Modifiziertes M9-Medium zur 15N/13C-Markierung individueller Aminosäuren

Komponente	Volumen	Endkonzentration
H ₂ O*	600 mL	
MgSO ₄ 1M*	2 mL	2 mM
CaCl ₂ 1M*	100 µL	0,1 mM
Trp 10 mg/ml	10 mL	100 mg/L
5x M9-AA Salzbasis (s.u.)*	200 mL	—
Glucose 20 % [†]	200 mL	2%
¹⁵ N-markierte AA	s.u.	

*autoklaviert, †sterilfiltriert

Tabelle 11: Salzbasis für modifiziertes M9-Medium

M9-AA Salzbasis 5x	g pro Liter	MW in g/mol	Endkonzentration in M
Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O	42,5	178	0,238
KH ₂ PO ₄	15	136,1	0,11
NaCl	2,5	58,44	0,043
NH ₄ Cl	2,5	53,49	0,046
Aminosäure-Basis	s.u.		
Nukleosid-Basis	s.u.		

Tabelle 12: Aminosäurebasis für modifiziertes M9-Medium

	1 Liter	
	5x	1x
Ala	2,5 g	500 mg
Arg	2,0 g	400 mg
Asp	2,0 g	400 mg
Asn	2,0 g	400 mg
Cys	0,25 g	50 mg
Gln	2,0 g	400 mg
Glu	3,25 g	650 mg
Gly	2,75 g	450 mg
His	0,5 g	100 mg

Ile	1,15 g	230 mg
Leu	1,15 g	230 mg
Lys	2,1g	420 mg
Met	1,25 g	250 mg
Phe	0,65g	130 mg
Pro	0,5 g	100 mg
Ser	10,5 g	2,1 g
Thr	1,15 g	230 mg
Tyr	0,85 g	170 mg
Val	1,15 g	230 mg

Tabelle 13: Nukleosid-Basis für modifiziertes M9-Medium

	1 Liter	
	5×	1×
Adenosin	2,5 g	500 mg
Guanosin	3,25 g	750 mg
Thymin	1,0 g	200 mg
Uracil	2,5 g	500 mg
Cytosin	1,2 g	240 mg

A.3 Faktorlevel für Pufferoptimierungen

Tabelle 14: Gewählte Faktorlevel für die Optimierung des Aufschlusspuffers

Faktorlevel	Faktoren		
	Salzart	Konzentration in mM	pH-Wert
	NaCl	100	6,5
	NaSCN	300	7,0
	NaSO ₄	500	7,5
		700	8,0
			8,5

Tabelle 15: Für die Optimierung des Proteinaufschlusses verwendete Modellpuffer

	Salz	Konzentration in mM	pH
1	NaSCN	500	8,0
2	NaCl	100	7,0
3	NaSCN	100	6,5
4	NaSO ₄	300	7,5
5	NaSO ₄	700	8,5
6	NaCl	300	8,5
7	NaSO ₄	100	8,0
8	NaCl	300	7,0
9	NaSO ₄	500	6,5
10	NaCl	700	8,0
11	NaSO ₄	500	7,0

Anhang

12	NaSO ₄	300	6,5
13	NaSCN	700	7,0
14	NaCl	500	7,5
15	NaSCN	300	8,0
16	NaSO ₄	700	7,5
17	NaSCN	100	7,5
18	NaCl	700	6,5
19	NaSCN	500	8,5
20	NaCl	100	8,5

Tabelle 16: Zusätzliche Puffer zur Kreuzvalidierung der ersten Aufschlussoptimierung

	Salz	Konzentration in mM	pH
1	NaSO ₄	700	6,5
2	NaSO ₄	100	7,0
3	NaSCN	300	8,5
4	NaSCN	700	7,5
5	NaCl	500	8,0
6	NaCl	500	6,5

Tabelle 17: Gewählte Faktorlevel für die NMR-Pufferoptimierung

Faktorlevel	Faktoren		
	Salzart	Konzentration	pH-Wert
	NaCl	100 mM	6,5
	KCl	200 mM	7
	LiCl	400 mM	7,5
	NaBr	600 mM	8
	NaSO ₄		8,5

A.4 Primer und Gensequenzen

Tabelle 18: Klonierungs- und Sequenzierungsprimer

Nr.	Name	Sequenz	Zweck des Primers
1	T7 Promotor	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	Sequenzierung von Plasmiden ausgehend vom T7 promotor
2	T7 Terminator	5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'	Sequenzierung von Plasmiden ausgehend vom T7 terminator
3	Sequenz 583 u	5'-GGG AAT TTC ATT CCT CTTT TTA C-3'	Sequenzierung des CDC25A-Gens, ausgehend von Position 583
4	Nde disrupt u	5'-CGA CTG TCG ATA CCC ATA CGA ATA CGA GGG AGG CC-3'	Disruption der NdeI-Restriktionsschnittstelle in CDC25A an Basenpositon 1160 (univers)
5	Nde disrupt r	5'-GGC CTC CCT CGT ATT CGT ATG GGT ATC GAC AGT CG-3'	Disruption der NdeI-Restriktionsschnittstelle in CDC25A an Basenpositon 1160 (revers)

6	Ase N332 u	GGT GGT GAT TAA TGA CCC AAG GGA CCT TAT AG-3'	Einführung einer AseI- Restriktionsschnittstelle und eines Startcodons vor N332
7	Nde L337 u	5'-GGT GGT GCA TAT GCT TAT AGG AGA CTT CTC CAA G-3'	Einführung einer AseI- Restriktionsschnittstelle und eines Startcodons vor N337
8	BamHI F493Stop r	5'-GGT GGT GGG ATC CTC AGT CCT CGT GGT GCA TGG GC-3'	Ersatz von F493 durch ein Stopp- Codon mit anschließender BamHI- Restriktionsschnittstelle
9	BamHI W508Stop r	5'-GGT GGT GGG ATC CTC AGG TCC GGC TCT TGG TGC G-3'	Ersatz von W508 durch ein Stopp- Codon mit anschließender BamHI- Restriktionsschnittstelle
10	BamHI Endstop r	5'-GTG GTG GGA TCC TCA GAG CTT CTT CAG ACG AC-3'	Einführung einer BamHI- Restriktionsschnittstelle direkt hinter dem natürlich Stopp-Codon
11	His430toSer u	5'-GTC ATT GTT GTG TTT CAC AGC GAG TTT TCT TCT G-3'	Mutation des Histidins im aktiven Zentrum zu einem Serin (universe)
12	His430toSer r	5'-CAG AAG AAA ACT CGC TGT GAA ACA CAA CAA TGA C-3' G	Mutation des Histidins im aktiven Zentrum zu einem Serin (reverse)

A.5 Proteinsequenzen und biochemische Eigenschaften

Tabelle 19: Sequenzen der verschiedenen Proteinkonstrukte

Nummer	Sequenz
1	SENYLFGQHN DPRDLIGDFS KGYLEFHTVAG KHQDLKYISP EIMASVLNGK FANLIKEFVI IDCRYPYEYE GGHIKAVNL HMEEEEVEDFL LKKPIVPTDG KRIVVFHCE FSSERGPRMC RYVRERDRLG NEYPKLHYPE LYVLKGGYKE FFMKCQSYCE PPSYRPMHHE D
2	DFSKGYLFHT VAGKHQDLKY ISPEIMASVL NGKFANLIKE FVIIDCRYPY EYEGGHIKGA VNLHMEEEEVE DFLLKKPIVP TDGKRIVVVF HCEFSSERGP RMCRYVRERD RLGN EYPKLH YPELYVLKGG YKEFFMKCQS YCEPPSYRPM HHED
3	MGHHHHHHHA SENLYFQGHN DPRDLIGDFS KGYLEFHTVAG KHQDLKYISP EIMASVLNGK FANLIKEFVI IDCRYPYEYE GGHIKAVNL HMEEEEVEDFL LKKPIVPTDG KRIVVFHCE FSSERGPRMC RYVRERDRLG NEYPKLHYPE LYVLKGGYKE FFMKCQSYCE PPSYRPMHHE DFKEDLKKFR TKSRT
4	GHNDPRDLIG DFSKGYLFHT VAGKHQDLKY ISPEIMASVL NGKFANLIKE FVIIDCRYPY EYEGGHIKGA VNLHMEEEEVE DFLLKKPIVP TDGKRIVVVF HCEFSSERGP RMCRYVRERD RLGN EYPKLH YPELYVLKGG YKEFFMKCQS YCEPPSYRPM HHEDFKEDLK KFRTKSRT
5	MGHHHHHHHA SENLYFQGHN DPRDLIGDFS KGYLEFHTVAG KHQDLKYISP EIMASVLNGK FANLIKEFVI YKEFFMKCQS YCEPPSYRPM HHEDFKEDLK KFRTKSRTWA GEKSKREMYS IDCRYPYEYE GGHIKAVNL HMEEEEVEDFL LKKPIVPTDG KRIVVFHCE FSSERGPRMC RYVRERDRLG NEYPKLHYPE LYVLKGGRLKLL
6	GHNDPRDLIG DFSKGYLFHT VAGKHQDLKY ISPEIMASVL NGKFANLIKE FVIIDCRYPY EYEGGHIKGA VNLHMEEEEVE DFLLKKPIVP TDGKRIVVVF HCEFSSERGP RMCRYVRERD RLGN EYPKLH YPELYVLKGG YKEFFMKCQS YCEPPSYRPM HHEDFKEDLK KFRTKSRTWA GEKSKREMYS RLKLL
7	MGHHHHHHHA SENLYFQGHM LIGDFSKGYL FHTVAGKHQD LKYISPEIMA SVLNGKFANL IKEFVIIDCR YPYEYEGGHI KGAVNLHMEE EVEDFLLKKP IVPTDGKRVI VVFHCEFSS RGPRMCRYVR ERDRLGNEYP KLHYPELYVL KGGYKEFFMK CQSYCEPPSY RPMHHED

Anhang

8	GHMLIGDFSK GYLFTVAGK HQDLKYISPE IMASVLNGKF ANLIKEFVII DCRYPYEYEG GHIKGAVNLH MEEVEDEFLK KKPIVPTDGK RVIVVFHCEF SSERGPRMCR YVRERDRLGN EYPKLYPELV YVLKGGYKEF FMKCQSYCEP PSYRPMHHED
9	MLIGDFSKGY LFHTVAGKHQ DLKYISPEIM ASVLNGKFAN LIKEFVIIDC RYPYEYEGGH IKGAVNLHME EEVEDEFLKK PIVPTDGKRV IVVFHCEFSS ERGPRMCRYV RERDRLGNEY PKLHYPELYV LKGGYKEFFM KCQSYCEPPS YRPMHHEDFK
10	MGHHHHHHHA SENLYFQGHM LIGDFSKGYL FHTVAGKHQD LKYISPEIMA SVLNGKFANL IKEFVIIDCR YPYEYEGGHI KGAVNLHMEE EVEDFLLKKP IVPTDGKRV VVFHCEFSS RGPRMCRYVR ERDRLGNEYV KLHYPELYV LKGGYKEFFM KCQSYCEPPS YRPMHHEDFK DLKKFRTKSR T
11	GHMLIGDFSK GYLFTVAGK HQDLKYISPE IMASVLNGKF ANLIKEFVII DCRYPYEYEG GHIKGAVNLH MEEVEDEFLK KKPIVPTDGK RVIVVFHCEF SSERGPRMCR YVRERDRLGN EYPKLYPELV YVLKGGYKEF FMKCQSYCEP PSYRPMHHED FKEDLKKFRT KSRT
12	MLIGDFSKGY LFHTVAGKHQ DLKYISPEIM ASVLNGKFAN LIKEFVIIDC RYPYEYEGGH IKGAVNLHME EEVEDEFLKK PIVPTDGKRV IVVFHCEFSS ERGPRMCRYV RERDRLGNEY PKLHYPELYV LKGGYKEFFM KCQSYCEPPS YRPMHHEDFK EDLKKFRTKS RT
13	MGHHHHHHHA SENLYFQGHM LIGDFSKGYL FHTVAGKHQD LKYISPEIMA SVLNGKFANL IKEFVIIDCR YPYEYEGGHI KGAVNLHMEE EVEDFLLKKP IVPTDGKRV VVFHCEFSS RGPRMCRYVR ERDRLGNEYV KLHYPELYV LKGGYKEFFM KCQSYCEPPS YRPMHHEDFK DLKKFRTKSR TWAGEKSKRE MYSLKLL
14	GHMLIGDFSK GYLFTVAGK HQDLKYISPE IMASVLNGKF ANLIKEFVII DCRYPYEYEG GHIKGAVNLH MEEVEDEFLK KKPIVPTDGK RVIVVFHCEF SSERGPRMCR YVRERDRLGN EYPKLYPELV YVLKGGYKEF FMKCQSYCEP PSYRPMHHED FKEDLKKFRT KSRTWAGEKS KREMYSLKLL
15	MLIGDFSKGY LFHTVAGKHQ DLKYISPEIM ASVLNGKFAN LIKEFVIIDC RYPYEYEGGH IKGAVNLHME EEVEDEFLKK PIVPTDGKRV IVVFHCEFSS ERGPRMCRYV RERDRLGNEY PKLHYPELYV LKGGYKEFFM KCQSYCEPPS YRPMHHEDFK EDLKKFRTKS RTWAGEKSKR EMYSRLKLL

Tabelle 20: Eigenschaften der verschiedenen Proteinkonstrukte

Nr.	Startprimer	Endprimer	Modifikation	Länge	Masse in Da	pI	ε
1	ase N332	BamF493stop	mit His-T	181	21338	7,09	16640
2	ase N332	BamF493stop	TEV-Spaltung	164	19237	7,00	15360
3	ase N332	BamW508stop	mit His-T	195	23105	7,90	16640
4	ase N332	BamW508stop	TEV-Spaltung	178	21003	8,08	15360
5	ase N332	BamEndstop	mit His-T	212	25197	8,63	23610
6	ase N332	BamEndstop	TEV-Spaltung	195	23096	8,18	22330
7	Nde L337	BamF493stop	mit His-T	177	20872	7,25	16640
8	Nde L337	BamF493stop	TEV-Spaltung	160	18771	7,23	15360
9	Nde L337	BamF493stop	ohne His-T	158	18577	7,19	15360
10	Nde L337	BamW508stop	mit His-T	191	22638	8,10	16640
11	Nde L337	BamW508stop	TEV-Spaltung	174	20537	8,29	15360
12	Nde L337	BamW508stop	ohne His-T	172	20343	8,29	15360
13	Nde L337	BamEndstop	mit His-T	208	24731	8,77	23610
14	Nde L337	BamEndstop	TEV-Spaltung	191	22629	8,91	22330
15	Nde L337	BamEndstop	ohne His-T	189	22435	8,91	22330

A.6 Peaklisten

Tabelle 21: Peaklisten der Spektren zur Untersuchung der Inhibitorinteraktion

	Zuordnung	Standard		pTyr		BN82002		NSC663284	
		N	H	N	H	N	H	N	H
1	350_A	125,60	8,317	125,66	8,315	125,60	8,310	125,59	8,313
2	351_G	108,73	7,667	108,65	7,672	108,69	7,655	108,70	7,672
3	392_G	103,44	6,985	103,40	6,979	103,44	6,985	103,43	6,986
4	393_G	109,19	6,729	109,22	6,739	109,22	6,731	109,22	6,735
5	394_H	123,89	7,585	123,89	7,585	123,90	7,576	123,90	7,582
6	472_F	119,92	7,438	119,91	7,433	119,92	7,438	119,92	7,433
7	473_F	118,41	7,963	118,54	7,956	118,41	7,963	118,44	7,958
8	474_M	120,28	7,311	120,26	7,321	120,26	7,306	120,27	7,309
9	504_S	115,62	8,086	115,73	8,101	115,59	8,080	115,61	8,086
10	505_R	122,45	8,332	122,49	8,339	122,45	8,332	122,45	8,329
11	506_T	114,36	8,128	114,36	8,113	114,35	8,121	114,35	8,122
12	507_W	123,48	8,150	123,48	8,145	123,48	8,150	123,49	8,148
13	508_A	125,35	8,155	125,35	8,155	125,35	8,150	125,35	8,150
14	509_G	106,75	7,562	106,76	7,553	106,73	7,556	106,73	7,554
15	515_E	120,75	8,261	120,77	8,257	120,75	8,261	120,78	8,262
16	516_M	120,06	8,119	120,06	8,119	120,06	8,113	120,09	8,118
17	517_Y	119,49	8,043	119,51	8,039	119,47	8,038	119,50	8,040
18	518_S	116,17	8,074	116,18	8,067	116,13	8,061	116,14	8,068
19	519_R	122,14	8,127	122,15	8,126	122,14	8,127	122,15	8,124
20	520_L	121,49	7,961	121,47	7,959	121,49	7,961	121,47	7,958
21	521_K	121,51	8,028	121,52	8,025	121,51	8,028	121,54	8,025
22	A01	120,25	8,655	120,27	8,650	120,25	8,655	120,25	8,655
23	A02	123,13	8,552	123,12	8,545	123,16	8,547	123,13	8,552
24	F01	114,13	8,713	114,22	8,775	114,13	8,713	114,21	8,723
25	F02	115,42	8,709	115,34	8,712	115,31	8,691	115,41	8,716
26	F03	115,35	8,674	115,35	8,672	115,34	8,671	115,39	8,688
27	F04	117,23	8,087	117,22	8,078	117,23	8,087	117,21	8,086
28	F05	118,02	8,016	117,91	8,014	118,02	8,016	118,01	8,019
29	F06	119,77	8,844	119,77	8,844	119,77	8,842	119,73	8,850
30	F07	122,95	9,238	122,96	9,246	122,95	9,238	122,95	9,241
31	G01	99,50	8,324	99,42	8,312	99,57	8,307	99,53	8,310
32	G02	102,52	7,611	102,55	7,602	102,51	7,604	102,55	7,605
33	G03	104,62	7,566	104,70	7,549	104,52	7,557	104,69	7,556
34	G04	106,26	7,882	106,23	7,898	106,26	7,882	106,30	7,880
35	G05	117,77	9,649	117,78	9,647	117,82	9,626	117,79	9,641
36	G06	112,32	8,740	112,28	8,738	112,28	8,737	112,29	8,734
37	G07	107,94	8,519	107,68	8,485	107,90	8,527	107,88	8,514
38	M01	113,35	7,075	113,33	7,076	113,34	7,075	113,35	7,075
39	M02	119,17	7,602	119,17	7,602	119,19	7,594	119,19	7,595

Anhang

40	M03	120,86	7,787	120,79	7,789	120,86	7,772	120,86	7,771
41	M04	123,10	8,218	123,10	8,218	123,10	8,218	123,09	8,218
42	V01	114,44	8,178	114,40	8,165	114,43	8,156	114,44	8,178
43	V02	121,00	7,689	120,91	7,680	121,02	7,687	121,00	7,683
44	V03	120,17	9,172	120,17	9,172	120,19	9,175	120,18	9,188
45	V04	125,55	8,915	125,54	8,899	125,55	8,913	125,55	8,921
46	V05	126,77	8,065	126,64	8,050	126,75	8,058	126,75	8,054
47	V06	121,28	8,878	121,34	8,876	121,28	8,878	121,30	8,878
48	Y01	109,74	6,650	109,74	6,650	109,77	6,646	109,76	6,652
49	Y02	117,01	7,429	117,37	7,430	117,06	7,420	117,05	7,420
50	Y03	120,96	6,977	120,97	6,969	120,96	6,977	120,98	6,976
51	Y04	119,95	7,957	119,95	7,957	119,96	7,953	119,98	7,953
52	Y05	119,75	8,375	119,75	8,375	119,73	8,371	119,75	8,374
53	Y06	120,93	7,958	120,83	7,943	120,87	7,945	120,90	7,953
54	Y07	122,08	8,051	122,11	8,052	122,08	8,051	122,10	8,049
55	Y08	121,66	8,714	121,58	8,710	121,66	8,714	121,63	8,709
56		101,37	9,750	101,37	9,750	101,37	9,750	101,37	9,750
57		107,76	6,706	107,87	6,736	107,76	6,706	107,76	6,706
58		107,74	6,479	107,76	6,510	107,74	6,479	107,74	6,479
59		109,67	8,083	109,67	8,082	109,68	8,078	109,68	8,079
60		110,32	6,670	110,32	6,670	110,32	6,670	110,32	6,670
61		110,73	6,921	110,72	6,917	110,70	6,917	110,72	6,918
62		110,74	6,653	110,74	6,653	110,71	6,649	110,72	6,650
63		111,00	8,638	111,01	8,641	111,01	8,643	111,02	8,646
64		111,39	8,489	111,36	8,476	111,33	8,463	111,40	8,465
65		111,54	6,917	111,54	6,913	111,52	6,912	111,54	6,915
66		111,55	7,498	111,55	7,494	111,53	7,492	111,55	7,494
67		112,53	7,520	112,55	7,520	112,54	7,518	112,54	7,518
68		112,03	6,797	112,02	6,797	112,01	6,793	112,02	6,794
69		112,26	8,220	112,35	8,207	112,29	8,221	112,29	8,221
70		112,56	6,842	112,56	6,842	112,54	6,838	112,54	6,839
71		112,72	7,481	112,75	7,490	112,64	7,476	112,67	7,478
72		113,45	6,936	113,47	6,930	113,46	6,929	113,47	6,932
73		113,41	7,455	113,39	7,450	113,42	7,451	113,41	7,455
74		113,44	7,603	113,44	7,603	113,47	7,597	113,47	7,598
75		113,72	7,780	113,82	7,788	113,70	7,775	113,73	7,778
76		113,92	8,522	114,09	8,599	113,93	8,517	113,88	8,523
77		113,94	9,002	113,89	8,991	113,91	9,000	113,92	8,999
78		114,20	7,409	114,17	7,409	114,20	7,408	114,21	7,409
79		114,66	6,827	114,67	6,833	114,67	6,821	114,67	6,822
80		114,89	9,461	114,97	9,457	114,90	9,469	114,88	9,453
81		115,29	7,169	115,51	7,186	115,28	7,152	115,29	7,166
82		115,57	8,173	115,61	8,173	115,58	8,170	115,57	8,168
83		115,64	7,708	115,61	7,707	115,61	7,710	115,62	7,712
84		116,09	8,666	116,09	8,667	116,09	8,653	116,13	8,659

85		116,23	7,863	116,20	7,867	116,22	7,860	116,23	7,862
86		116,31	7,330	116,31	7,324	116,32	7,328	116,34	7,329
87		116,48	9,449	116,54	9,450	116,49	9,447	116,49	9,447
88		116,48	6,929	116,40	6,925	116,51	6,928	116,50	6,936
89		116,62	7,485	116,75	7,484	116,61	7,483	116,64	7,486
90		116,82	9,288	116,79	9,286	116,81	9,289	116,79	9,287
91		117,35	10,339	117,32	10,320	117,34	10,326	117,34	10,331
92		117,10	7,876	117,10	7,876	117,11	7,877	117,10	7,866
93		117,34	8,113	117,58	8,105	117,39	8,116	117,38	8,123
94		117,11	7,969	117,10	7,969	117,13	7,956	117,13	7,959
95		117,90	7,723	117,87	7,713	117,90	7,723	117,94	7,703
96		118,33	7,784	118,26	7,784	118,33	7,784	118,36	7,778
97		118,57	8,681	118,74	8,657	118,55	8,676	118,56	8,678
98		119,02	8,984	119,05	8,982	119,05	8,975	119,06	8,980
99		119,14	8,068	119,14	8,068	119,14	8,068	119,14	8,068
100		119,27	7,698	119,27	7,698	119,28	7,687	119,27	7,694
101		119,40	7,292	119,40	7,292	119,40	7,292	119,38	7,293
102		119,28	7,971	119,38	7,930	119,28	7,971	119,28	7,971
103		119,16	8,474	119,13	8,476	119,17	8,470	119,17	8,472
104		119,76	7,819	119,76	7,819	119,76	7,819	119,73	7,820
105		119,90	8,802	119,90	8,802	119,86	8,792	119,88	8,794
106		120,62	7,916	120,62	7,916	120,63	7,912	120,65	7,913
107		120,45	8,131	120,46	8,129	120,46	8,126	120,46	8,128
108		120,83	8,571	120,87	8,553	120,84	8,564	120,83	8,571
109		120,87	8,151	120,85	8,147	120,88	8,148	120,87	8,146
110		121,05	9,008	121,09	9,028	121,05	9,008	121,06	9,013
111		121,22	7,388	121,18	7,386	121,20	7,384	121,20	7,390
112		121,34	8,574	121,34	8,566	121,34	8,574	121,34	8,574
113		121,51	7,642	121,54	7,647	121,55	7,638	121,52	7,639
114		121,54	7,570	121,57	7,557	121,55	7,563	121,58	7,566
115		121,58	10,574	121,62	10,578	121,62	10,578	121,53	10,579
116		121,75	8,296	121,76	8,297	121,75	8,296	121,73	8,291
117		121,79	9,752	121,73	9,735	121,79	9,752	121,78	9,752
118		122,27	7,687	122,27	7,684	122,26	7,683	122,25	7,684
119		122,16	8,351	122,18	8,340	122,16	8,351	122,15	8,348
120		122,44	7,947	122,52	7,956	122,44	7,947	122,43	7,943
121		122,46	8,096	122,49	8,090	122,46	8,096	122,49	8,092
122		122,84	8,148	122,84	8,149	122,84	8,148	122,81	8,142
123		122,74	7,807	122,78	7,817	122,74	7,807	122,76	7,798
124		123,16	8,154	123,18	8,151	123,16	8,154	123,20	8,153
125		123,70	6,286	123,57	6,298	123,70	6,286	123,69	6,282
126		123,63	8,851	123,51	8,865	123,58	8,821	123,55	8,874
127		123,66	10,611	123,66	10,611	123,66	10,611	123,66	10,611
128		123,77	9,425	123,77	9,425	123,77	9,425	123,79	9,426
129		123,93	10,539	123,93	10,539	123,93	10,539	123,93	10,539

130		124,92	8,472	124,97	8,473	124,93	8,468	124,93	8,466
131		126,04	7,915	126,04	7,915	126,01	7,902	126,08	7,896
132		126,68	9,007	126,68	9,007	126,71	9,006	126,71	9,004
133		127,12	8,797	127,12	8,797	127,15	8,791	127,11	8,797
134		127,49	8,478	127,49	8,478	127,49	8,484	127,45	8,480
135		127,50	9,905	127,50	9,905	127,50	9,899	127,50	9,897
136		127,72	8,666	127,72	8,666	127,72	8,646	127,73	8,654
137		127,89	7,121	127,83	7,106	127,91	7,100	127,91	7,111
138		128,97	9,620	128,97	9,620	129,02	9,628	128,99	9,615
139		129,88	10,262	129,88	10,250	129,89	10,258	129,89	10,255
140		129,48	7,800	129,48	7,800	129,49	7,796	129,50	7,799
141		129,98	8,989	129,95	8,996	130,00	8,982	130,01	8,985
142		130,40	8,752	130,40	8,752	130,41	8,748	130,41	8,760
143		133,86	9,048	133,86	9,048	133,86	9,048	133,86	9,048
144		114,64	8,311	114,66	8,328	114,67	8,304	114,67	8,309
145		118,71	8,273	118,74	8,277	118,65	8,261	118,66	8,266
146		121,67	8,182	121,62	8,175	121,67	8,182	121,66	8,178
147		121,81	7,971	121,81	7,976	121,81	7,971	121,81	7,968
148		119,18	7,922	119,17	7,917	119,14	7,912	119,17	7,916
149		109,02	7,889	109,02	7,899	109,00	7,879	108,99	7,883
150		119,51	8,178	119,51	8,178	119,51	8,169	119,51	8,164
151		119,52	8,260	119,52	8,260	119,53	8,249	119,53	8,253
152		112,03	7,426	112,03	7,426	112,01	7,421	112,01	7,421
153		118,43	7,704	118,37	7,700	118,43	7,704	118,43	7,694
154		125,62	8,435	125,62	8,435	125,62	8,435	125,62	8,435
155		120,41	7,795	120,41	7,795	120,41	7,792	120,41	7,795
156		121,25	7,615	121,25	7,615	121,25	7,615	121,25	7,617
157		121,31	8,729	121,31	8,729	121,31	8,729	121,31	8,729

Tabelle 22: Peaklisten der Spektren zur Untersuchung der Peptidinteraktion

	Zuordnung	Standard		pTyr		Active Site Binder		Adjacent Pocket		HotSpot	
		N	H	N	H	N	H	N	H	N	H
1	350_A	125,70	8,340	125,71	8,341	125,70	8,340	125,70	8,339	125,65	8,340
2	351_G	108,75	7,707	108,73	7,704	108,73	7,705	108,73	7,707	108,74	7,701
3	392_G	103,56	7,013	103,56	7,015	103,56	7,016	103,56	7,015	103,56	7,015
4	393_G	109,33	6,753	109,33	6,759	109,33	6,758	109,32	6,757	109,34	6,755
5	394_H	123,99	7,614	123,99	7,612	123,96	7,614	123,98	7,612	123,95	7,616
6	472_F	120,11	7,467	120,11	7,474	120,15	7,475	120,13	7,471	120,11	7,469
7	473_F	118,53	7,987	118,55	7,989	118,55	7,990	118,53	7,987	118,53	7,988
8	474_M	120,30	7,329	120,31	7,338	120,30	7,335	120,28	7,334	120,30	7,329
9	504_S	115,74	8,109	115,74	8,111	115,74	8,113	115,73	8,109	115,74	8,109
10	505_R	122,71	8,351	122,69	8,350	122,66	8,348	122,71	8,351	122,74	8,358
11	506_T	114,48	8,152	114,47	8,150	114,47	8,150	114,47	8,151	114,47	8,155

12	507_W	123,67	8,167	123,68	8,168	123,67	8,167	123,67	8,167	123,64	8,171
13	508_A	125,58	8,176	125,59	8,177	125,58	8,176	125,58	8,174	125,58	8,178
14	509_G	106,82	7,551	106,81	7,548	106,81	7,546	106,81	7,547	106,80	7,550
15	515_E	120,86	8,293	120,92	8,293	120,86	8,293	120,91	8,293	120,92	8,295
16	516_M	120,26	8,149	120,26	8,150	120,26	8,149	120,26	8,149	120,26	8,151
17	517_Y	119,78	8,065	119,77	8,067	119,77	8,066	119,78	8,065	119,78	8,068
18	518_S	116,40	8,099	116,37	8,097	116,38	8,098	116,37	8,098	116,38	8,098
19	519_R	122,35	8,152	122,33	8,154	122,34	8,153	122,36	8,155	122,34	8,152
20	520_L	121,69	7,992	121,69	7,991	121,69	7,992	121,69	7,992	121,69	7,991
21	521_K	121,78	8,061	121,79	8,061	121,78	8,062	121,78	8,061	121,79	8,061
22	A01	120,33	8,699	120,36	8,699	120,31	8,699	120,32	8,698	120,35	8,699
23	A02	123,25	8,584	123,26	8,583	123,25	8,586	123,25	8,584	123,25	8,584
24	F01	114,07	8,664	114,16	8,705	114,13	8,701	114,16	8,702	114,12	8,694
25	F02	115,54	8,706	115,55	8,714	115,51	8,705	115,51	8,697	115,47	8,697
26	F03	115,57	8,654	115,55	8,652	115,57	8,654	115,57	8,654	115,57	8,654
27	F04	117,29	8,108	117,28	8,106	117,27	8,112	117,27	8,112	117,28	8,116
28	F05	118,20	8,036	118,07	8,031	118,08	8,033	118,11	8,031	118,19	8,031
29	F06	119,81	8,875	119,80	8,871	119,80	8,865	119,78	8,864	119,79	8,869
30	F07	122,94	9,270	122,95	9,276	122,93	9,280	122,94	9,270	122,94	9,277
31	G01	99,63	8,349	99,53	8,340	99,60	8,339	99,59	8,341	99,54	8,351
32	G02	102,58	7,636	102,60	7,632	102,54	7,633	102,58	7,635	102,59	7,632
33	G03	104,85	7,595	104,81	7,597	104,85	7,595	104,82	7,587	104,81	7,593
34	G04	106,38	7,873	106,41	7,888	106,40	7,887	106,39	7,886	106,40	7,872
35	G05	117,90	9,667	117,83	9,669	117,83	9,669	117,89	9,665	117,90	9,668
36	G06	112,45	8,771	112,44	8,767	112,43	8,769	112,43	8,770	112,45	8,773
37	G07	108,02	8,546	107,93	8,538	107,94	8,544	107,95	8,546	107,96	8,546
38	M01	113,54	7,099	113,53	7,099	113,54	7,101	113,54	7,100	113,53	7,093
39	M02	119,19	7,614	119,20	7,626	119,23	7,617	119,28	7,616	119,28	7,616
40	M03	120,95	7,801	120,93	7,807	120,93	7,805	120,95	7,801	120,95	7,804
41	M04	123,11	8,238	123,04	8,246	123,10	8,245	123,11	8,238	123,11	8,238
42	V01	114,59	8,220	114,61	8,214	114,61	8,210	114,54	8,207	114,63	8,209
43	V02	121,13	7,708	121,08	7,709	121,08	7,713	121,09	7,710	121,09	7,709
44	V03	120,25	9,214	120,27	9,221	120,25	9,214	120,25	9,214	120,26	9,219
45	V04	125,66	8,948	125,62	8,942	125,64	8,948	125,62	8,950	125,69	8,948
46	V05	126,74	8,074	126,68	8,075	126,70	8,079	126,70	8,075	126,69	8,080
47	V06	121,50	8,919	121,49	8,917	121,49	8,922	121,50	8,918	121,50	8,918
48	Y01	109,78	6,663	109,78	6,674	109,78	6,660	109,80	6,664	109,71	6,659
49	Y02	116,88	7,451	117,11	7,450	116,88	7,451	117,10	7,451	117,09	7,452
50	Y03	121,02	6,994	120,93	6,994	120,96	6,993	121,01	6,985	120,99	6,991
51	Y04	120,01	7,955	120,00	7,957	119,97	7,957	120,01	7,955	119,99	7,957
52	Y05	119,86	8,400	119,85	8,394	119,83	8,395	119,84	8,399	119,83	8,400
53	Y06	120,98	7,984	120,91	7,972	120,93	7,968	120,95	7,976	121,00	7,976
54	Y07	122,16	8,085	122,15	8,089	122,15	8,089	122,16	8,088	122,16	8,090
55	Y08	121,67	8,732	121,64	8,730	121,66	8,735	121,69	8,731	121,67	8,722
56		97,44	9,764	97,41	9,754	97,43	9,755	97,42	9,761	97,44	9,764

Anhang

57		107,73	6,677	107,81	6,699	107,73	6,677	107,78	6,687	107,81	6,690
58		107,76	6,452	107,74	6,479	107,76	6,452	107,76	6,452	107,78	6,443
59		109,79	8,093	109,75	8,091	109,77	8,092	109,77	8,092	109,78	8,091
60		110,28	6,653	110,28	6,653	110,23	6,660	110,28	6,653	110,33	6,672
61		110,90	6,945	110,90	6,944	110,90	6,945	110,90	6,944	110,90	6,945
62		110,90	6,672	110,89	6,671	110,89	6,672	110,90	6,673	110,90	6,671
63		111,05	8,671	111,07	8,668	111,06	8,672	111,05	8,668	111,04	8,672
64		111,32	8,502	111,35	8,504	111,34	8,514	111,32	8,505	111,24	8,511
65		111,68	6,940	111,66	6,943	111,66	6,941	111,66	6,939	111,68	6,940
66		111,69	7,510	111,68	7,502	111,67	7,503	111,67	7,504	111,69	7,504
67		112,65	7,545	112,62	7,546	112,65	7,545	112,63	7,545	112,63	7,546
68		112,63	6,863	112,62	6,864	112,63	6,863	112,62	6,864	112,63	6,864
69		112,44	8,250	112,45	8,251	112,45	8,246	112,44	8,249	112,44	8,250
70		112,94	6,876	112,95	6,878	112,94	6,876	112,94	6,876	112,94	6,876
71		112,92	7,561	112,94	7,563	112,92	7,561	112,93	7,560	112,93	7,561
72		113,56	6,953	113,54	6,952	113,55	6,953	113,54	6,949	113,56	6,953
73		113,53	7,485	113,53	7,485	113,53	7,485	113,52	7,484	113,53	7,483
74		113,55	7,624	113,54	7,624	113,54	7,622	113,53	7,623	113,55	7,624
75		113,88	7,801	113,89	7,805	113,89	7,806	113,87	7,802	113,86	7,801
76		113,72	8,561	113,66	8,582	113,70	8,573	113,70	8,568	113,71	8,564
77		113,90	9,027	113,93	9,024	113,90	9,023	113,90	9,023	113,92	9,026
78		114,22	7,424	114,29	7,428	114,22	7,424	114,25	7,426	114,24	7,425
79		114,69	6,833	114,68	6,833	114,68	6,831	114,69	6,832	114,66	6,830
80		114,97	9,460	115,00	9,470	114,99	9,460	114,97	9,459	114,96	9,464
81		115,47	7,187	115,57	7,200	115,56	7,194	115,47	7,187	115,53	7,193
82		115,76	8,197	115,71	8,198	115,71	8,197	115,72	8,197	115,69	8,198
83		115,71	7,725	115,71	7,727	115,68	7,728	115,73	7,725	115,72	7,725
84		116,18	8,684	116,17	8,685	116,18	8,685	116,19	8,684	116,19	8,684
85		116,23	7,879	116,21	7,884	116,22	7,879	116,21	7,877	116,23	7,879
86		116,42	7,366	116,42	7,360	116,40	7,362	116,46	7,363	116,40	7,365
87		116,52	9,428	116,52	9,434	116,51	9,437	116,52	9,433	116,50	9,433
88		116,53	6,938	116,51	6,936	116,51	6,937	116,52	6,945	116,52	6,939
89		116,67	7,488	116,69	7,492	116,67	7,488	116,68	7,484	116,67	7,484
90		116,81	9,284	116,71	9,282	116,81	9,284	116,81	9,284	116,77	9,283
91		117,34	10,331	117,32	10,332	117,35	10,321	117,43	10,333	117,35	10,337
92		117,30	7,894	117,29	7,895	117,30	7,894	117,30	7,894	117,30	7,896
93		117,48	8,161	117,71	8,134	117,52	8,156	117,51	8,154	117,49	8,158
94		117,30	7,995	117,27	7,997	117,29	7,996	117,30	7,995	117,29	7,992
95		118,02	7,707	117,95	7,706	117,96	7,710	117,97	7,714	117,94	7,710
96		118,40	7,822	118,38	7,825	118,37	7,822	118,40	7,822	118,39	7,819
97		118,62	8,720	118,74	8,702	118,63	8,715	118,59	8,717	118,63	8,716
98		119,19	9,017	119,10	9,013	119,17	9,018	119,17	9,016	119,17	9,018
99		119,23	8,060	119,20	8,065	119,20	8,063	119,22	8,062	119,21	8,062
100		119,33	7,728	119,33	7,732	119,32	7,729	119,33	7,730	119,33	7,728
101		119,46	7,310	119,46	7,315	119,48	7,313	119,46	7,310	119,46	7,310

102		119,39	7,979	119,46	7,941	119,44	7,949	119,44	7,958	119,43	7,961
103		119,65	8,486	119,64	8,489	119,65	8,488	119,65	8,486	119,65	8,486
104		119,84	7,840	119,85	7,839	119,83	7,840	119,83	7,841	119,82	7,842
105		119,94	8,835	119,90	8,831	119,94	8,835	119,93	8,826	119,94	8,835
106		120,69	7,902	120,68	7,899	120,69	7,901	120,69	7,902	120,69	7,899
107		120,65	8,153	120,64	8,153	120,63	8,153	120,63	8,152	120,63	8,152
108		120,79	8,607	120,87	8,599	120,81	8,609	120,81	8,606	120,76	8,605
109		120,84	8,164	120,88	8,165	120,88	8,163	120,87	8,164	120,89	8,163
110		121,06	9,039	121,08	9,042	121,06	9,040	121,08	9,040	121,08	9,044
111		121,39	7,420	121,28	7,428	121,31	7,426	121,34	7,424	121,36	7,423
112		121,49	8,612	121,48	8,612	121,46	8,609	121,48	8,606	121,49	8,611
113		121,58	7,657	121,55	7,664	121,57	7,660	121,57	7,658	121,58	7,652
114		121,69	7,598	121,69	7,596	121,69	7,598	121,70	7,597	121,69	7,601
115		121,68	10,589	121,67	10,589	121,66	10,588	121,71	10,593	121,68	10,603
116		121,91	8,318	121,87	8,319	121,88	8,317	121,91	8,318	121,87	8,317
117		121,88	9,762	121,96	9,752	121,97	9,756	121,90	9,759	121,98	9,767
118		122,21	7,712	122,21	7,714	122,21	7,712	122,21	7,711	122,22	7,714
119		122,47	8,280	122,47	8,290	122,47	8,286	122,47	8,280	122,47	8,285
120		122,62	7,965	122,61	7,973	122,58	7,971	122,63	7,964	122,60	7,964
121		122,75	8,110	122,75	8,112	122,71	8,108	122,74	8,110	122,73	8,106
122		122,92	8,170	122,92	8,167	122,92	8,167	122,92	8,166	122,91	8,165
123		123,07	7,861	123,06	7,858	123,08	7,861	123,07	7,852	123,07	7,849
124		123,42	8,190	123,43	8,190	123,43	8,188	123,42	8,189	123,43	8,190
125		123,74	6,300	123,72	6,306	123,72	6,302	123,74	6,306	123,70	6,309
126		123,84	8,906	123,71	8,914	123,73	8,923	123,72	8,922	123,71	8,919
127		123,75	10,614	123,71	10,616	123,71	10,615	123,74	10,612	123,73	10,614
128		123,87	9,459	123,87	9,460	123,87	9,459	123,88	9,457	123,87	9,456
129		124,02	10,544	124,00	10,544	124,01	10,545	124,02	10,536	124,01	10,540
130		124,95	8,496	124,96	8,503	124,96	8,500	124,96	8,499	124,96	8,501
131		126,09	7,934	126,14	7,939	126,10	7,938	126,11	7,923	126,11	7,933
132		126,72	9,034	126,74	9,030	126,71	9,034	126,71	9,038	126,73	9,033
133		127,16	8,801	127,16	8,804	127,16	8,804	127,16	8,803	127,16	8,809
134		127,51	8,527	127,54	8,517	127,60	8,529	127,52	8,518	127,63	8,521
135		127,47	9,893	127,45	9,892	127,46	9,889	127,46	9,893	127,48	9,887
136		127,75	8,673	127,76	8,676	127,76	8,679	127,75	8,674	127,76	8,680
137		128,08	7,130	128,07	7,132	128,08	7,140	128,08	7,135	128,07	7,129
138		129,19	9,659	129,17	9,663	129,19	9,662	129,16	9,658	129,20	9,651
139		129,95	10,268	129,94	10,266	129,95	10,266	129,95	10,266	129,96	10,268
140		129,75	7,849	129,76	7,849	129,76	7,848	129,76	7,849	129,77	7,850
141		130,16	9,021	130,12	9,017	130,13	9,014	130,14	9,017	130,17	9,017
142		130,48	8,786	130,46	8,792	130,44	8,789	130,45	8,790	130,45	8,793
143		133,89	9,045	133,88	9,059	133,88	9,050	133,89	9,045	133,88	9,042
144		114,64	8,311	114,64	8,311	114,64	8,311	114,64	8,311	114,64	8,311
145		118,71	8,273	118,71	8,273	118,71	8,273	118,71	8,273	118,71	8,273
146		121,67	8,182	121,67	8,182	121,67	8,182	121,67	8,182	121,67	8,182

Anhang

147		121,81	7,971	121,81	7,971	121,81	7,971	121,81	7,971	121,81	7,971
148		119,18	7,922	119,18	7,922	119,18	7,922	119,18	7,922	119,18	7,922
149		109,02	7,889	109,02	7,889	109,02	7,889	109,02	7,889	109,02	7,889
150		119,56	8,194	119,57	8,199	119,55	8,198	119,56	8,200	119,54	8,202
151		119,52	8,260	119,52	8,260	119,52	8,260	119,52	8,260	119,52	8,260
152		112,03	7,426	112,03	7,426	112,03	7,426	112,03	7,426	112,03	7,426
153		118,43	7,704	118,43	7,704	118,43	7,704	118,39	7,686	118,43	7,704
154		125,62	8,435	125,62	8,435	125,62	8,435	125,62	8,435	125,62	8,435
155		120,21	7,800	120,14	7,799	120,21	7,791	120,21	7,787	120,21	7,800
156		121,26	7,640	121,24	7,655	121,23	7,647	121,25	7,615	121,22	7,642
157		121,36	8,729	121,27	8,720	121,35	8,722	121,30	8,727	121,28	8,726

Tabelle 23: Zugeordnete Reste und aufgrund individueller Markierung identifizierte Aminosäuren

Nummer	Zuordnung	Zuordnung aus CARA		Individual labelling	
		N	H	N	H
1	350_A	125,62	8,332	125,61	8,361
2	351_G	108,69	7,709	108,74	7,702
3	392_G	103,50	7,017	103,59	7,010
4	393_G	109,25	6,760	109,29	6,752
5	394_H	123,87	7,615		
6	472_F	120,00	7,474	120,31	7,481
7	473_F	118,44	7,992	118,45	7,992
8	474_M	120,26	7,327		
9	504_S	115,63	8,108		
10	505_R	122,63	8,345		
11	506_T	114,38	8,146		
12	507_W	123,56	8,165		
13	508_A	125,51	8,164	125,53	8,200
14	509_G	106,77	7,552	106,83	7,541
15	515_E	120,86	8,293		
16	516_M	120,12	8,141	120,19	8,146
17	517_Y	119,68	8,064	119,72	8,060
18	518_S	116,31	8,097		
19	519_R	122,26	8,151		
20	520_L	121,62	7,990		
21	521_K	121,67	8,054		
22	A01	120,24	8,696	120,24	8,713
23	A02	123,18	8,586	123,22	8,588
24	F01	114,13	8,713	114,04	8,698
25	F02	115,42	8,709	115,46	8,706
26	F03	115,42	8,672	115,42	8,667
27	F04	117,17	8,108	117,19	8,098
28	F05	118,13	8,039	118,14	8,039
29	F06	119,73	8,876	119,79	8,873

30	F07	122,89	9,270	122,89	9,262
31	G01	99,51	8,347	99,57	8,338
32	G02	102,52	7,632	102,55	7,623
33	G03	104,86	7,602	104,87	7,599
34	G04	106,33	7,881	106,40	7,871
35	G05	117,74	9,643	117,73	9,635
36	G06	112,35	8,762	112,40	8,753
37	G07	107,91	8,545	108,02	8,529
38	M01	113,46	7,107	113,46	7,100
39	M02	119,19	7,614	119,06	7,645
40	M03	120,86	7,792	120,90	7,801
41	M04	123,04	8,246	123,11	8,242
42	V01	114,51	8,210	114,60	8,220
43	V02	121,04	7,715	121,09	7,714
44	V03	120,17	9,203	120,17	9,217
45	V04	125,60	8,951	125,61	8,952
46	V05	126,60	8,068	126,65	8,067
47	V06	121,37	8,919	121,44	8,922
48	Y01	109,71	6,660	109,71	6,667
49	Y02	117,03	7,456	116,85	7,456
50	Y03	120,93	6,994	120,99	6,993
51	Y04	119,94	7,958	119,97	7,953
52	Y05	119,69	8,400	119,67	8,398
53	Y06	120,81	7,977	120,83	7,978
54	Y07	122,07	8,082	122,14	8,080
55	Y08	121,64	8,724	121,63	8,730

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Rolle von CDC25A im Zellzyklus: Am G1/S-Checkpoint wird durch Aktivierung von Cyclin E/CDK2 die S-Phase eingeleitet, deren Fortschreiten durch positives Feedback gesichert wird. Während des Durchlaufens der S-Phase wird auch Cyclin A/CDK2 aktiviert. Am G2/M-Übergang wird Cyclin B/CDK1 von CDC25B (nicht gezeigt) aktiviert und erneut bildet sich ein Feedback-loop mit CDC25A aus. 8

Abbildung 2: Übersicht über die Regulationsarten und -stellen von CDC25A: Phosphorylierungsstellen, Interaktionen mit anderen Proteinen und nukleäre Lokalisations- und Exportsequenzen sind in der regulatorischen Domäne dargestellt. Die Kinasen Pim-1, CDK1 und CDK2 aktivieren, während CHK1, CHK2 und p38 durch Phosphorylierung Abbau und Sequestrierung auslösen. 14-3-3 bindet CDC25A nach Phosphorylierung und entzieht es so dem Pool, Abbau durch den SCF-Komplex wird durch gebundenes β -TrCP getriggert, der APC/C-Komplex wird durch CDH1 rekrutiert. Eine zusätzliche Bindestelle für 14-3-3 (T507) in der katalytischen Domäne ist hier nicht dargestellt..... 10

Abbildung 3: Mechanismen der CDC25A-Regulation: Die positiven und negativen Wirkungen verschiedener Transkriptionsfaktoren beeinflussen die Gesamtkonzentration des in der Zelle vorhandenen CDC25A. Dieses „shuttled“ aufgrund gleichzeitig vorhandener NES und NLS zwischen Zytoplasma und Kern hin und her. Im Kern muss es durch Phosphorylierung aktiviert werden (grün), CDC14A kann dieses Phosphat wieder abspalten. Im Kern kann CDC25A einerseits durch Oxidation des aktiven Zentrums durch ROS inhibiert werden, als auch durch die Kinase p160^{ROCK}. Werden die Signalwege von p38, ATM oder ATR z.B. durch DNA-Schädigungen aktiviert, wird CDC25A an verschiedenen Stellen phosphoryliert und dadurch entweder die SCF- oder APC/C-Komplexe abgebaut und so dem zytoplasmatischen Pool endgültig entzogen..... 11

Abbildung 4: Alignment der vollständigen Sequenzen von CDC25A, B und C. Dunkelblau markiert sind die Reste mit vollständiger Übereinstimmung, hellblau sind paarweise Übereinstimmungen markiert. In Braun bis Gelb darunter der Konservierungswert der Aminosäuren. Insgesamt beträgt die Übereinstimmung 20 %, für die regulatorische Domäne 6 %, für die katalytische 50 %. Der Beginn der katalytischen Domäne wird durch die konservierte LIGD-Sequenz bei Position 399 (Konsensussequenz) definiert. Regionen mit starker Homologie sind mit Rahmen markiert. Das Alignment wurde durchgeführt mit CLUSTALW (<http://align.genome.jp/>); die Darstellung erfolgte mit Jalview (<http://www.jalview.org/>). Die kanonische Proteinsequenz der verschiedenen CDC25 wurden der Uniprot-Datenbank entnommen (<http://www.uniprot.org>)..... 14

- Abbildung 5: Struktur der katalytischen Domäne von CDC25A_{kat} (pdb:1c25) in Ribbon- und Oberflächendarstellung. Im Zentrum das fünfsträngige β -Faltblatt, das zwischen α -Helices eingebettet ist. Der unstrukturierte C-Terminus ragt oberhalb des aktiven Zentrums heraus. In Gelb das katalytisch aktive Cystein in dem allen PTPs verwandten Motiv aus β -Faltblatt, Loop und α -Helix in Rot. Die beiden CH-Motive in grün (CH2A) und blau (CH2B). Das nahe des aktiven Zentrum gelegene Cystein („backdoor“) in Orange. 15
- Abbildung 6: Aktives Zentrum von CDC25A. Die CDC25A-Konsensussequenz HCFESSER formt den P-Loop, in dessen Zentrum die Seitenkette des aktiven Cysteins weist. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass nicht die Seitenketten die chemische Umgebung des Cysteins bilden, sondern hauptsächlich die NH-Gruppen des Rückgrats in Richtung des Cysteins orientiert sind. 17
- Abbildung 7: Mechanismus der zweistufigen Dephosphorylierung durch CDC25B. A: Säurekatalysierte Umesterung mit deprotoniertem Cystein als Nukleophil. B: Basenkatalysierte Verseifung des Thioesters unter Freisetzung des freien Phosphats und Regenerierung des aktiven Thiolats. 19
- Abbildung 8: Grundgerüste wirksamer Chinoninhibitoren: Chinolin-5,8-dion (A), Benzo[d]thiazol-4,7-dion(B), Menadion(2-methylnaphthalin-1,4-dion, C), substituierte para-Chinone(D), 3,4 substituiertes 1,2-Naphtochinon(E) 21
- Abbildung 9: Durchschnittliche Konstanten der ^1J und ^2J -Kopplungen im Proteinerückgrat und der Seitenketten 33
- Abbildung 10: Magnetisierungstransfer ausgewählter homo- und heteronuklearer Experimente. A: COSY-Korrelationen ^3J -gekoppelter Spins (durchgezogene Pfeile), TOCSY-Transfer über das gesamte ^3J -gekoppelte Spinsystem (gepunktete Pfeile), NOESY-Transfer über die dipolare Kopplung durch den Raum (gestrichelte Pfeile). B: HNCQ-Transfer im Rückgrat vom NH zum CO der vorhergehenden Aminosäure. Der Transfer innerhalb der Aminosäure findet nicht statt. C: HNCA-Transfer vom NH zu beiden benachbarten C_α (durchgezogene Pfeile), zusätzlicher Transfer zum C_β im HNCACB (gestrichelte Pfeile). 34
- Abbildung 11: Schematische Darstellung der erzeugten CDC25A-Konstrukte. In Blau und Grün die konservierten CH2-Motive, in Rot das konservierte aktive Zentrum mit dem reaktiven Cystein in Gelb. In Rosa der N-terminale Überhang. 49
- Abbildung 12: Expressionstest für die sechs verschiedenen Konstrukte (-: nicht induziert, +: induziert, Std: Standard). Grundsätzlich ist für alle Konstrukte Expression feststellbar, allerdings für die längeren

Konstrukte deutlich höher. Konstrukt 3 zeigt gerade im Vergleich zum kürzeren Konstrukt 1 eine besonders stark ansteigende Bande	50
Abbildung 13: Löslichkeitstest der verschiedenen Konstrukte. L: Rohlysat, P: Pellet, S: Überstand, Std: Standard. Hier zeigt sich eindeutig die starke pH-Abhängigkeit beim Aufschluss, bei allen Konstrukten ist unterhalb pH 7 kein lösliches Protein nachweisbar. Ebenso wie bei der Expression zeigt sich eine Stabilisierung des Proteins mit zusätzlicher Länge des C-terminalen Überhangs.	51
Abbildung 14: In der Arbeitsgruppe etabliertes Standardprotokoll für die Aufreinigung von Phosphatasen.	52
Abbildung 15: Die Einflüsse der verschiedenen Faktorlevel auf den Extraktionswert. Besonders stark ist der Einfluss der Salzsorte, der Einsatz von Natriumsulfat erzielt die stärkste Stabilisierung. Eine ansteigende Salzkonzentration erhöht die Stabilität, während niedrigere pH-Werte zur Stabilität beitragen.	53
Abbildung 16: Neu berechnete Extraktionsbeiträge der verschiedenen Faktorlevels nach Einbeziehung der zusätzlichen Extraktionsbedingungen. Im Vergleich zur ursprünglichen Berechnung ergeben sich sehr deutliche Änderungen, nur die Stabilisierung durch Natriumsulfat bleibt eindeutig. Für Konzentration und pH-Wert gibt es deutliche Veränderungen, tendenziell zeigt sich in den mittleren Bereichen die beste Stabilisation, allerdings sind die Fehler so groß, dass die Aussage zweifelhaft bleibt. Salzkonzentrationen um 300 mM und pH-Werte um 8,0 decken sich aber mit Erfahrungswerten.	54
Abbildung 17: Endgültiges Aufreinigungsprotokoll nach Optimierung. Durch den Einsatz von NaSO ₄ wurde die Proteinstabilität während der gesamten Aufreinigung deutlich erhöht. Die Trennung von Umpufferung und TEV-Spaltung minimierte den Proteinverlust durch Ausfällen. Der Einsatz von Phosphatpuffer und die geringe Salzkonzentration im endgültigen Puffer erhöht die Effektivität der NMR-Messungen (s.u.).	56
Abbildung 18: Lichtmikroskopische Überprüfung der Proteinpräzipitation. Oben deutlich zu sehen die Präzipitation des Proteins, während unten die Lösung klar bleibt.	57
Abbildung 19: Klassischer pNPP-Hydrolyse-Enzymtest mit 40 mM pNPP und 2 µM CDC25A _{kat} bei 30° C bei verschiedenen Pufferbedingungen. Der Assay-Puffer entspricht den üblicherweise verwendeten Bedingungen (pH 8,0, 100 mM Tris, 1 mM DTT, 1 mM EDTA), der NMR-Puffer entspricht den optimierten Bedingungen für hohe Stabilität und Spektrenqualität (25 mM NaHPO ₄ , pH 6,5,	

Abbildungsverzeichnis

- 100 mM NaSO₄, 20 mM). Die Reaktion läuft bei den gewählten Bedingungen über die gesamte Zeit mit gleichbleibender Geschwindigkeit ab, die bestimmten R-Werte liegen bei über 0,99. 59
- Abbildung 20: Strukturen der für den Enzymtest verwendeten Inhibitoren 60
- Abbildung 21: Inhibitoren im Enzymtest: Die gemessene Aktivität mit Inhibitor wird auf die Basalaktivität mit DMSO im Reaktionsansatz normiert. 61
- Abbildung 22: Referenzierung der Diffusionskonstante des DTT im reinen NMR-Puffer gegen zugesetztes Dioxan. Peaks 1 bis 4 gehören zu Dioxan, 5 bis 12 zu DTT. 63
- Abbildung 23: DOSY-Spektrum mit geringer Gradientenstärke mit für die Berechnung verwendeten Peaks. Peaks 1 bis 5 gehören zu Amidprotonen des Backbone von CDC25A_{kat}, während Peaks 6 bis 11 aliphatischen Seitenketten zugeordnet werden können. Peaks a bis d gehören zu DTT. 64
- Abbildung 24: Berechnete Diffusionsraten aller einzelnen Peaks aus zwei verschiedenen Messungen, die Fehlerindikatoren ergeben sich aus dem Fit der sigmoidalen Kurven. Bei den Raten der Signale von CDC25A_{kat} sind leichte Abweichungen zu beobachten, allerdings ist der Mittelwert (durchgezogene Linie) in beiden Fällen gleich. Bei DTT zeigen zwei der Signale eine deutlich höhere Diffusionsrate und auch die Mittelwerte differieren. 64
- Abbildung 25: Referenzspektrum von CDC25A für die STD-Messung mit Phosphotyrosin. Vergrößert sind der Bereiche der Aliphatischeitenketten, auf deren Frequenz für den STD-Effekt eingestrahlt wird und der Aromatenbereich, der die starken Signale von Phosphotyrosin zeigt. 65
- Abbildung 26: Vergleich der STD-Spektren für CDC25A mit Phosphotyrosin: Ganz oben das Referenzspektrum, bei dem weit entfernt von allen Resonanzen eingestrahlt wird, darunter das STD-Spektrum mit Einstrahlung auf die aliphatischen Seitenketten. 67
- Abbildung 27: 1D-Protonenspektren der Seitenkettenregion von α -Lactalbumin. A zeigt das native Protein mit scharfen Linien und einer großen Bandbreite an chemischer Verschiebung. B zeigt den teilweise gefalteten Zustand des „molten globule“ mit starker Linienverbreiterung. C schließlich zeigt den komplett ungefalteten Zustand in dem die Beweglichkeit der Aminosäuren und damit auch die Linienschärfe wieder zunehmen. 69
- Abbildung 28: ¹⁵N-HSQC-Spektren von CDC25A_{kat} vor und nach Optimierung: A zeigt das Spektrum einer Probe mit nativem CDC25A, in B ist die Cys431Ser-Mutante von CDC25A verwendet worden. Außerdem wurde in A das ursprüngliche Puffersystem (25 mM HEPES pH 7,4, 5 mM Imidazol, 200

mM NaCl, 10 mM Mercaptoethanol) verwendet, in B der optimierte endgültige Puffer (25 mM NaHPO ₄ pH 6,5, 100 mM NaSO ₄ , 20 mM DTT)	70
Abbildung 29: ¹⁵ N-HSQC von CDC25A3M_kat bei verschiedenen Bedingungen: A zeigt ein Spektrum einer Probe im optimierten Puffer (25 mM NaPO ₄ pH 6,5, 100 mM NaSO ₄ , 20 mM DTT) bei 25 °C, bei B enthält der Probenpuffer zusätzlich je 50 mM Glutamat und Arginin. C und D zeigen Spektren mit denselben Bedingungen wie A, allerdings bei 30, bzw. 35 °C.....	71
Abbildung 30: CDC25A3M mit individuell ¹⁵ N-markierten Aminosäuren: Die sechs Panele zeigen Ausschnitte der ¹⁵ N-HSQC-Spektren individuell mit Alanin, Glycin, Methionin, Phenylalanin, Tyrosin und Valin ¹⁵ N-markierter Proben. Es werden jeweils alle sichtbaren Peaks in einem möglichst großen Ausschnitt gezeigt.	74
Abbildung 31: CSP-Analyse für die Bindung von Phosphotyrosin (A), BN82002 (B) und NSC663284 (C). Aufgetragen sind die Werte der normierten kombinierten Abweichungen der chemischen Verschiebung im Vergleich zu einem Spektrum mit 5% DMSO. Markiert sind Mittelwert plus eine (gestrichelte Linie) bzw. zwei (durchgezogene Linie) Standardabweichungen. Die Nummerierung der Peaks entspricht nicht der Sequenz, allerdings liegen die zugeordneten Reste bei 1-bis 21, die Reste mit zumindest bestimmter Aminosäure bei 22 bis 55.	76
Abbildung 32: Auftrag der signifikanten Abweichungen der chemischen Verschiebung nach Rest und Inhibitor. Erkennbar sind Gruppen von Resten die von allen drei, bzw. jeweils zwei der Substanzen beeinflusst werden.....	77
Abbildung 33: Design der Interaktionspeptide anhand der gedockten Strukturen von CDC25B und CDK2. „Active Site Binder“ (A, grün) entspricht dem natürlichen Substrat und liegt direkt über dem aktiven Zentrum von CDC25, „HotSpot“ (B, rot) entspricht der wichtigsten sekundären Substratbindestelle und „Adjacent pocket“ (C, magenta) liegt gegenüber den Resten der hydrophoben Tasche auf der Oberfläche von CDC25.....	77
Abbildung 34: CSP-Analyse für die Bindung von Phosphotyrosin (A), „Active Site Binder“ (B), „Adjacent pocket“ (C) und Hotspot (D). Aufgetragen sind die Werte der normierten kombinierten Abweichungen der chemischen Verschiebung im Vergleich zu einem Spektrum mit 5% DMSO. Markiert sind Mittelwert plus eine (gestrichelte Linie) bzw. zwei (durchgezogene Linie) Standardabweichungen.....	79

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 35: Auftrag der signifikanten Abweichungen der chemischen Verschiebung nach Rest und zugebenem Phosphotyrosin/Peptid. Erkennbar sind Gruppen von Resten die mehreren der zugegebenen Moleküle beeinflusst werden. 81
- Abbildung 36: Stripplots aus dem HNCACB der drei kurzen Segmente, die an Hand der Kombination von individueller Markierung und klassischen Zuordnungsexperimenten zugeordnet werden konnten. 83
- Abbildung 37: Stripplots aus dem HNCACB der beiden langen Segmente, die an Hand der Kombination von individueller Markierung und klassischen Zuordnungsexperimenten zugeordnet werden konnten. 84
- Abbildung 38: Zugeordnete Peaks und identifizierte Aminosäuren im ^1H - ^{15}N -HSQC. Die zugeordneten Peaks sind nach dem Schema Sequenzposition_Aminosäure bezeichnet, die identifizierten Aminosäuren nach AminosäureLaufnummer. Insgesamt 55 Peaks sind markiert, 22 davon in der Proteinsequenz, die anderen 33 zumindest als Aminosäure-Typ. 86

Literaturverzeichnis

- Alonso, A., J. Sasin, et al. (2004). "Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome." Cell **117**(6): 699-711.
- Ambrus, A., K. Friedrich, et al. (2006). "Oligomerization of nitrophorins." Anal Biochem **352**(2): 286-295.
- Arantes, G. M. (2008). "The catalytic acid in the dephosphorylation of the Cdk2-pTpY/CycA protein complex by Cdc25B phosphatase." J Phys Chem B **112**(47): 15244-15247.
- Audic, S., F. Lopez, et al. (1997). "SAmBA: an interactive software for optimizing the design of biological macromolecules crystallization experiments." Proteins **29**(2): 252-257.
- Aue, W. P., E. Bartholdi, et al. (1976). "Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance." The Journal of Chemical Physics **64**(5): 2229-2246.
- Bansal, P. and J. S. Lazo (2007). "Induction of Cdc25B regulates cell cycle resumption after genotoxic stress." Cancer Res **67**(7): 3356-3363.
- Barford, D., A. J. Flint, et al. (1994). "Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B." Science **263**(5152): 1397-1404.
- Barr, A. J., E. Ugochukwu, et al. (2009). "Large-scale structural analysis of the classical human protein tyrosine phosphatome." Cell **136**(2): 352-363.
- Barre, B., A. Vigneron, et al. (2005). "The STAT3 transcription factor is a target for the Myc and riboblastoma proteins on the Cdc25A promoter." J Biol Chem **280**(16): 15673-15681.
- Bäurle, S., T. Blume, et al. (2004). "Design and synthesis of macrocyclic inhibitors of phosphatase cdc25B." Bioorg Med Chem Lett **14**(7): 1673-1677.
- Bax, A. and D. G. Davis (1985). "Practical aspects of two-dimensional transverse NOE spectroscopy." Journal of Magnetic Resonance (1969) **63**(1): 207-213.
- Bessette, D. C., P. C. W. Wong, et al. (2007). "PRL-3: A Metastasis-Associated Phosphatase in Search of a Function." Cells Tissues Organs **185**(1-3): 232-236.
- Bhowmick, N. A., M. Ghiassi, et al. (2003). "TGF-beta-induced RhoA and p160ROCK activation is involved in the inhibition of Cdc25A with resultant cell-cycle arrest." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 15548-15553.
- Bialy, L. and H. Waldmann (2005). "Inhibitors of protein tyrosine phosphatases: next-generation drugs?" Angew Chem Int Ed Engl **44**(25): 3814-3839.
- Blobel, J., S. Schmidl, et al. (2007). "Protein Tyrosine Phosphatase Oligomerization Studied by a Combination of ¹⁵N NMR Relaxation and ¹²⁹Xe NMR. Effect of Buffer Containing Arginine and Glutamic Acid." Journal of the American Chemical Society **129**(18): 5946-5953.
- Blomberg, I. and I. Hoffmann (1999). "Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases." Mol Cell Biol **19**(9): 6183-6194.
- Bodenhausen, G. and D. J. Ruben (1980). "Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy." Chemical Physics Letters **69**(1): 185 - 189.
- Bottini, N., E. Bottini, et al. (2002). "Low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase and human disease: in search of biochemical mechanisms." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **50**(2): 95-104.
- Boutros, R., V. Lobjois, et al. (2007). "CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets?" Nat Rev Cancer **7**(7): 495-507.

- Braunschweiler, L. and R. R. Ernst (1983). "Coherence Transfer by Isotropic Mixing: Application to Proton Correlation Spectroscopy." Journal of magnetic resonance **53**(3): 521-528.
- Brezak, M. C., M. Quaranta, et al. (2004). "A novel synthetic inhibitor of CDC25 phosphatases: BN82002." Cancer Res **64**(9): 3320-3325.
- Brisson, M., T. Nguyen, et al. (2004). "Discovery and characterization of novel small molecule inhibitors of human Cdc25B dual specificity phosphatase." Mol Pharmacol **66**(4): 824-833.
- Buhrman, G., B. Parker, et al. (2005). "Structural Mechanism of Oxidative Regulation of the Phosphatase Cdc25B via an Intramolecular Disulfide Bond." Biochemistry **44**(14): 5307-5316.
- Busino, L., M. Donzelli, et al. (2003). "Degradation of Cdc25A by beta-TrCP during S phase and in response to DNA damage." Nature **426**(6962): 87-91.
- Cao, S., C. Foster, et al. (2005). "Halenaquinone and xestoquinone derivatives, inhibitors of Cdc25B phosphatase from a Xestospongia sp." Bioorg Med Chem **13**(4): 999-1003.
- Cao, S., C. Foster, et al. (2005). "Sesterterpenoids and an alkaloid from a Thorectandra sp. as inhibitors of the phosphatase Cdc25B." Bioorg Med Chem **13**(17): 5094-5098.
- Carr, H. Y. and E. M. Purcell (1954). "Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments." Physical Review **94**(3): 630.
- Carter, C. W. J. (1999). Crystallisation of Nucleic Acids and Proteins: A Practical Approach. A. Ducruix and R. Giegé. New York, Oxford University Press: 1-16.
- Cavanagh, J., W. J. Fairbrother, et al. (1996). Protein NMR Spectroscopy: principles and practice. San Diego, CA, USA., Academic Press.
- Cavanagh, J. and R. A. Venters (2001). "Protein dynamic studies move to a new time slot." Nat Struct Biol **8**(11): 912-914.
- Chen, X. and R. Prywes (1999). "Serum-induced expression of the cdc25A gene by relief of E2F-mediated repression." Mol Cell Biol **19**(7): 4695-4702.
- Cheon, H. G., S. M. Kim, et al. (2004). "Discovery of a novel protein tyrosine phosphatase-1B inhibitor, KR61639: potential development as an antihyperglycemic agent." Eur J Pharmacol **485**(1-3): 333-339.
- Clore, G. M., P. C. Driscoll, et al. (1990). "Analysis of the backbone dynamics of interleukin-1 beta using two-dimensional inverse detected heteronuclear 15N-1H NMR spectroscopy." Biochemistry **29**(32): 7387-7401.
- Clore, G. M., A. Szabo, et al. (1990). "Deviations from the simple two-parameter model-free approach to the interpretation of nitrogen-15 nuclear magnetic relaxation of proteins." J. Am. Chem. Soc. **112**(12): 4989-4991.
- Cohen, P. (2001). "The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture." Eur J Biochem **268**(19): 5001-5010.
- Cornilescu, G., F. Delaglio, et al. (1999). "Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology." J Biomol NMR **13**(3): 289-302.
- Craig, A., G. Shapiro, et al. (2004). "218 A phase I and pharmacokinetic trial ARQ 501, an Activated Checkpoint Therapy (TM) agent, in patients with advanced solid tumors." European Journal of Cancer Supplements **2**(8): 67-67.
- Czisch, M. and R. Boelens (1998). "Sensitivity enhancement in the TROSY experiment." J Magn Reson **134**(1): 158--160.
- Deb-Basu, D., A. Karlsson, et al. (2006). "MYC can enforce cell cycle transit from G1 to S and G2 to S, but not mitotic cellular division, independent of p27-mediated inhibition of cyclin E/CDK2." Cell Cycle **5**(12): 1348-1355.

- Deschamps, M. L., E. S. Pilka, et al. (2005). "Probing protein-peptide binding surfaces using charged stable free radicals and transverse paramagnetic relaxation enhancement (PRE)." J Biomol NMR **31**(2): 155-160.
- Donzelli, M., M. Squatrito, et al. (2002). "Dual mode of degradation of Cdc25 A phosphatase." EMBO J **21**(18): 4875-4884.
- Ducat, T., N. Declerck, et al. (2006). "Rapid determination of protein solubility and stability conditions for NMR studies using incomplete factorial design." J Biomol NMR **34**(3): 137-151.
- Eglen, R. M. and T. Reisine (2009). "The Current Status of Drug Discovery Against the Human Kinome." ASSAY and Drug Development Technologies **7**(1): 22-43.
- el-Deiry, W. S., T. Tokino, et al. (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." Cell **75**(4): 817-825.
- Erdogan-Orhan, I., B. Sener, et al. (2004). "Polyprenyl-hydroquinones and -furans from three marine sponges inhibit the cell cycle regulating phosphatase CDC25A." Nat Prod Res **18**(1): 1-9.
- Erlanson, D. A., J. A. Wells, et al. (2004). "Tethering: fragment-based drug discovery." Annu Rev Biophys Biomol Struct **33**: 199-223.
- Esteban, V., M. D. Vazquez-Novelle, et al. (2006). "Human Cdc14A reverses CDK1 phosphorylation of Cdc25A on serines 115 and 320." Cell Cycle **5**(24): 2894-2898.
- Fauman, E. B., J. P. Cogswell, et al. (1998). "Crystal structure of the catalytic domain of the human cell cycle control phosphatase, Cdc25A." Cell **93**(4): 617-625.
- Fuhrmann, G., C. Leisser, et al. (2001). "Cdc25A phosphatase suppresses apoptosis induced by serum deprivation." Oncogene **20**(33): 4542-4553.
- Galaktionov, K. and D. Beach (1991). "Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatases by B-type cyclins: evidence for multiple roles of mitotic cyclins." Cell **67**(6): 1181-1194.
- Galaktionov, K., X. Chen, et al. (1996). "Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc." Nature **382**(6591): 511-517.
- Galaktionov, K., A. K. Lee, et al. (1995). "CDC25 phosphatases as potential human oncogenes." Science **269**(5230): 1575-1577.
- Gallego, M. and D. M. Virshup (2005). "Protein serine/threonine phosphatases: life, death, and sleeping." Current Opinion in Cell Biology **17**(2): 197-202.
- García de la Torre, J., M. L. Huertas, et al. (2000). "Calculation of Hydrodynamic Properties of Globular Proteins from Their Atomic-Level Structure." Biophysical Journal **78**(2): 719-730.
- Goddard, T. D. and D. G. Kneller SPARKY 3. San Francisco, University of California.
- Golovanov, A. P., G. M. Hautbergue, et al. (2004). "A simple method for improving protein solubility and long-term stability." Journal of the American Chemical Society **126**(29): 8933-8939.
- Grzesiek, S. and A. Bax (1992). "Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein." Journal of Magnetic Resonance (1969) **96**(2): 432 - 440.
- Ham, S. W., J. I. Choe, et al. (2004). "Fluorinated quinoid inhibitor: possible "pure" arylator predicted by the simple theoretical calculation." Bioorg Med Chem Lett **14**(15): 4103-4105.
- Hanks, S. K. and T. Hunter (1995). "Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification." FASEB J **9**(8): 576-596.
- Harper, J. W., S. J. Elledge, et al. (1995). "Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21." Mol Biol Cell **6**(4): 387-400.

- Heinrich, R., B. G. Neel, et al. (2002). "Mathematical models of protein kinase signal transduction." Mol Cell **9**(5): 957-970.
- Hoffmann, I., G. Draetta, et al. (1994). "Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition." EMBO J **13**(18): 4302-4310.
- Hofmeister, F. (1888). "Zur Lehre von der Wirkung der Salze." Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology **24**(4): 247-260.
- Huang, W. G., Y. Y. Jiang, et al. (2005). "Synthesis and biological evaluation of (\pm)-cryptotanshinone and its simplified analogues as potent CDC25 inhibitors." Tetrahedron **61**(7): 1863-1870.
- Hunter, T. (1987). "A thousand and one protein kinases." Cell **50**(6): 823-829.
- Ishima, R., J. Baber, et al. (2004). "Carbonyl carbon transverse relaxation dispersion measurements and ms-micros timescale motion in a protein hydrogen bond network." J Biomol NMR **29**(2): 187-198.
- Ishima, R. and D. A. Torchia (1999). "Estimating the time scale of chemical exchange of proteins from measurements of transverse relaxation rates in solution." J Biomol NMR **14**(4): 369-372.
- Ishima, R. and D. A. Torchia (2003). "Extending the range of amide proton relaxation dispersion experiments in proteins using a constant-time relaxation-compensated CPMG approach." J Biomol NMR **25**(3): 243-248.
- Jaime, M., M. J. Pujol, et al. (2002). "The p21(Cip1) protein, a cyclin inhibitor, regulates the levels and the intracellular localization of CDC25A in mice regenerating livers." Hepatology **35**(5): 1063-1071.
- Jemc, J. and I. Rebay (2007). "The Eyes Absent Family of Phosphotyrosine Phosphatases: Properties and Roles in Developmental Regulation of Transcription." Annual Review of Biochemistry **76**(1): 513-538.
- Kallstrom, H., A. Lindqvist, et al. (2005). "Cdc25A localisation and shuttling: characterisation of sequences mediating nuclear export and import." Exp Cell Res **303**(1): 89-100.
- Kanemori, Y., K. Uto, et al. (2005). "Beta-TrCP recognizes a previously undescribed nonphosphorylated destruction motif in Cdc25A and Cdc25B phosphatases." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(18): 6279-6284.
- Kar, S., M. Wang, et al. (2006). "H32, a non-quinone sulfone analog of vitamin K3, inhibits human hepatoma cell growth by inhibiting Cdc25 and activating ERK." Cancer Biol Ther **5**(10): 1340-1347.
- Kar, S., M. Wang, et al. (2006). "PM-20, a novel inhibitor of Cdc25A, induces extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation and inhibits hepatocellular carcinoma growth in vitro and in vivo." Mol Cancer Ther **5**(6): 1511-1519.
- Karplus, M. (1959). "Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments." Journal of Chemical Physics **30**(1): 11-15.
- Kay, L. E., G. Y. Xu, et al. (1994). "Enhanced-Sensitivity Triple-Resonance Spectroscopy with Minimal H₂O Saturation." Journal of Magnetic Resonance, Series A **109**(1): 129 - 133.
- Keller, R. (2004). The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial. Goldau, S, CANTINA Verlag.
- Keyse, S. M. (1993). "The induction of gene expression in mammalian cells by radiation." Semin Cancer Biol **4**(2): 119-128.
- Kim, K. R., J. L. Kwon, et al. (2005). "EK-6136 (3-methyl-4-(O-methyl-oximino)-1-phenylpyrazolin-5-one): a novel Cdc25B inhibitor with antiproliferative activity." Eur J Pharmacol **528**(1-3): 37-42.

- Kristjansdottir, K. and J. Rudolph (2004). "Cdc25 Phosphatases and Cancer." Chemistry & Biology **11**(8): 1043-1051.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680--685.
- Landrieu, I., M. da Costa, et al. (2004). "A small CDC25 dual-specificity tyrosine-phosphatase isoform in Arabidopsis thaliana." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(36): 13380--13385.
- Laura, H. L. and K. L. Cynthia (2004). "Measuring ligand-protein binding using NMR diffusion experiments." Concepts in Magnetic Resonance Part A **20A**(1): 24-41.
- Lavergne, O., A. C. Fernandes, et al. (2006). "Synthesis and biological evaluation of novel heterocyclic quinones as inhibitors of the dual specificity protein phosphatase CDC25C." Bioorg Med Chem Lett **16**(1): 171-175.
- Lazo, J. S., D. C. Aslan, et al. (2001). "Discovery and Biological Evaluation of a New Family of Potent Inhibitors of the Dual Specificity Protein Phosphatase Cdc25." Journal of Medicinal Chemistry **44**(24): 4042-4049.
- Lee, L. and B. D. Sykes (1981). "Proton nuclear magnetic resonance determination of the sequential ytterbium replacement of calcium in carp parvalbumin." Biochemistry **20**(5): 1156-1162.
- Leisser, C., G. Rosenberger, et al. (2004). "Subcellular localisation of Cdc25A determines cell fate." Cell Death Differ **11**(1): 80-89.
- Lindqvist, Y., G. Schneider, et al. (1994). "Crystal structures of rat acid phosphatase complexed with the transition-state analogs vanadate and molybdate. Implications for the reaction mechanism." Eur J Biochem **221**(1): 139-142.
- Lipari, G. and A. Szabo (1982). "Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity." **104**(17): 4546-4559.
- Lipari, G. and A. Szabo (1982). Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results. **104**: 4559-4570.
- Lipsitz, R. S. and N. Tjandra (2004). "Residual dipolar couplings in NMR structure analysis." Annu Rev Biophys Biomol Struct **33**: 387-413.
- Lyon, M. A., A. P. Ducruet, et al. (2002). "DUAL-SPECIFICITY PHOSPHATASES AS TARGETS FOR ANTINEOPLASTIC AGENTS." Nature Reviews Drug Discovery **1**(12): 961-976.
- Mailand, N., J. Falck, et al. (2000). "Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage." Science **288**(5470): 1425-1429.
- Mailand, N., A. V. Podtelejnikov, et al. (2002). "Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability." EMBO J **21**(21): 5911-5920.
- Malumbres, M. and M. Barbacid (2005). "Mammalian cyclin-dependent kinases." Trends Biochem Sci **30**(11): 630-641.
- Mandel, A. M., M. Akke, et al. (1996). "Dynamics of ribonuclease H: temperature dependence of motions on multiple time scales." Biochemistry **35**(50): 16009-16023.
- Manning, G., D. B. Whyte, et al. (2002). "The Protein Kinase Complement of the Human Genome." Science **298**(5600): 1912-1934.
- Martin, L. J., M. J. Hahnke, et al. (2007). "Double-lanthanide-binding tags: design, photophysical properties, and NMR applications." J Am Chem Soc **129**(22): 7106-7113.
- Mayer, M. and B. Mayer (1999). Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. **38**: 1784-1788.

- McCain, D. F., I. E. Catrina, et al. (2002). "The catalytic mechanism of Cdc25A phosphatase." J Biol Chem **277**(13): 11190--11200.
- Meekhof, A. E. and S. M. V. Freund (1999). "Separating the contributions to ¹⁵N transverse relaxation in a fibronectin type III domain." J Biomol NMR **14**(1): 13-22.
- Meiboom, S. and D. Gill (1958). "Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times." Review of Scientific Instruments **29**(8): 688-691.
- Meinecke, R. and B. Meyer (2001). "Determination of the binding specificity of an integral membrane protein by saturation transfer difference NMR: RGD peptide ligands binding to integrin alphaIIb beta3." J Med Chem **44**(19): 3059-3065.
- Meissner, A. (1998). "Double spin-state-selective coherence transfer. Application for twodimensional selection of multiplet components with long transverse relaxation times." Molecular Physics **95**(6): 1137--1142.
- Millet, O., J. P. Loria, et al. (2000). "The Static Magnetic Field Dependence of Chemical Exchange Linebroadening Defines the NMR Chemical Shift Time Scale." Journal of the American Chemical Society **122**(12): 2867-2877.
- Mochizuki, T., C. Kitanaka, et al. (1997). "Pim-1 kinase stimulates c-Myc-mediated death signaling upstream of caspase-3 (CPP32)-like protease activation." Oncogene **15**(12): 1471-1480.
- Molinari, M., C. Mercurio, et al. (2000). "Human Cdc25 A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis." EMBO Rep **1**(1): 71-79.
- Mori, S., C. Abeygunawardana, et al. (1995). "Improved sensitivity of HSQC spectra of exchanging protons at short interscan delays using a new fast HSQC (FHSQC) detection scheme that avoids water saturation." J Magn Reson B **108**(1): 94--98.
- Muhandiram, D. R. and L. E. Kay (1994). "Gradient-Enhanced Triple-Resonance Three-Dimensional NMR Experiments with Improved Sensitivity." Journal of Magnetic Resonance, Series B **103**(3): 203 - 216.
- Mulder, F. A., A. Mittermaier, et al. (2001). "Studying excited states of proteins by NMR spectroscopy." Nat Struct Biol **8**(11): 932-935.
- Mulder, F. A., N. R. Skrynnikov, et al. (2001). "Measurement of slow (micros-ms) time scale dynamics in protein side chains by (¹⁵N) relaxation dispersion NMR spectroscopy: application to Asn and Gln residues in a cavity mutant of T4 lysozyme." J Am Chem Soc **123**(5): 967-975.
- Mulder, F. A., P. J. van Tilborg, et al. (1999). "Microsecond time scale dynamics in the RXR DNA-binding domain from a combination of spin-echo and off-resonance rotating frame relaxation measurements." J Biomol NMR **13**(3): 275-288.
- Mulder, F. A. A., R. A. de Graaf, et al. (1998). "An Off-resonance Rotating Frame Relaxation Experiment for the Investigation of Macromolecular Dynamics Using Adiabatic Rotations." Journal of Magnetic Resonance **131**(2): 351-357.
- Noble, M. E., J. A. Endicott, et al. (2004). "Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure." Science **303**(5665): 1800-1805.
- Overhauser, A. W. (1953). "Polarization of Nuclei in Metals." Physical Review **92**(2): 411.
- Parks, J. M., H. Hu, et al. (2009). "Mechanism of Cdc25B phosphatase with the small molecule substrate p-nitrophenyl phosphate from QM/MM-MFEP calculations." J Phys Chem B **113**(15): 5217-5224.
- Pervushin, K., R. Riek, et al. (1997). "Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12366--12371.

- Pervushin, K., G. Wider, et al. (1998). "Single Transition-to-single Transition Polarization Transfer (ST2-PT) in [15N,1H]-TROSY." Journal of Biomolecular NMR **12**(2): 345--348.
- Prestegard, J. H., C. M. Bougault, et al. (2004). Residual Dipolar Couplings in Structure Determination of Biomolecules. **104**: 3519-3540.
- Rance, M., J. P. Loria, et al. (1999). "Sensitivity Improvement of Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy." Journal of Magnetic Resonance **136**(1): 92 - 101.
- Reynolds, R. A., A. W. Yem, et al. (1999). "Crystal structure of the catalytic subunit of Cdc25B required for G2/M phase transition of the cell cycle." J Mol Biol **293**(3): 559-568.
- Robinson, D. R., Y. M. Wu, et al. (2000). "The protein tyrosine kinase family of the human genome." Oncogene **19**(49): 5548-5557.
- Rodriguez-Castaneda, F., P. Haberz, et al. (2006). "Paramagnetic tagging of diamagnetic proteins for solution NMR." Magn Reson Chem **44 Spec No**: S10-16.
- Rother, K., R. Kirschner, et al. (2007). "p53 downregulates expression of the G1/S cell cycle phosphatase Cdc25A." Oncogene **26**(13): 1949-1953.
- Rudolph, J. (2005). "Redox Regulation of the Cdc25 Phosphatases." Antioxidants & Redox Signaling **7**(5-6): 761-767.
- Rudolph, J. (2007). "Inhibiting transient protein-protein interactions: lessons from the Cdc25 protein tyrosine phosphatases." Nat Rev Cancer **7**(3): 202-211.
- Rudolph, J., D. M. Epstein, et al. (2001). "Specificity of natural and artificial substrates for human Cdc25A." Anal Biochem **289**(1): 43-51.
- Sambrook, J. and D. W. Russel (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York, NY, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santoni-Rugiu, E., J. Falck, et al. (2000). "Involvement of Myc activity in a G(1)/S-promoting mechanism parallel to the pRb/E2F pathway." Mol Cell Biol **20**(10): 3497-3509.
- Sattler, M., J. Schleucher, et al. (1999). "Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients." Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy **34**(2): 93-158.
- Schleucher, J., M. Sattler, et al. (1993). "Coherence Selection by Gradients without Signal Attenuation: Application to the Three-Dimensional HNCO Experiment." Angewandte Chemie International Edition in English **32**(10): 1489--1491.
- Seth, D. and J. Rudolph (2006). "Redox control of cell cycle progression via Cdc25 phosphatase (Mih1p) in *S. cerevisiae*." Cell Cycle **5**(18): 2172-2173.
- Shimazawa, R., T. Suzuki, et al. (2004). "Design and synthesis of dysidiolide analogs from vitamin D3: novel class of Cdc25A inhibitors." Bioorg Med Chem Lett **14**(12): 3291-3294.
- Shuker, S. B., P. J. Hajduk, et al. (1996). "Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR." Science **274**(5292): 1531-1534.
- Sohn, J., G. Buhrman, et al. (2007). "Kinetic and Structural Studies of Specific Protein-Protein Interactions in Substrate Catalysis by Cdc25B Phosphatase." Biochemistry **46**(3): 807-818.
- Sohn, J., B. Kiburz, et al. (2003). "Inhibition of Cdc25 phosphatases by indolyldihydroxyquinones." J Med Chem **46**(13): 2580-2588.
- Sohn, J., K. Kristjansdottir, et al. (2004). "Remote hot spots mediate protein substrate recognition for the Cdc25 phosphatase." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(47): 16437-16441.
- Sohn, J., J. M. Parks, et al. (2005). "Experimental Validation of the Docking Orientation of Cdc25 with Its Cdk2-CycA Protein Substrate." Biochemistry **44**(50): 16563-16573.

- Sorensen, C. S., R. G. Syljuasen, et al. (2004). "ATR, Claspin and the Rad9-Rad1-Hus1 complex regulate Chk1 and Cdc25A in the absence of DNA damage." Cell Cycle **3**(7): 941-945.
- Staunton, D., R. Schlinkert, et al. (2006). "Cell-free expression and selective isotope labelling in protein NMR." Magnetic Resonance in Chemistry **44**(S1): S2-S9.
- Stuckey, J. A., H. L. Schubert, et al. (1994). "Crystal structure of Yersinia protein tyrosine phosphatase at 2.5 Å and the complex with tungstate." Nature **370**(6490): 571-575.
- Su, X. D., N. Taddei, et al. (1994). "The crystal structure of a low-molecular-weight phosphotyrosine protein phosphatase." Nature **370**(6490): 575-578.
- Tautz, L., M. Pellecchia, et al. (2006). "Targeting the PTPome in human disease." Expert Opin Ther Targets **10**(1): 157-177.
- Thomas Langer, M. V. B. E. M. B. U. S. K. S. H. S. (2004). "NMR Backbone Assignment of a Protein Kinase Catalytic Domain by a Combination of Several Approaches: Application to the Catalytic Subunit of cAMP-Dependent Protein Kinase." ChemBioChem **5**(11): 1508-1516.
- Todd, J. L., K. G. Tanner, et al. (1999). "Extracellular regulated kinases (ERK) 1 and ERK2 are authentic substrates for the dual-specificity protein-tyrosine phosphatase VHR. A novel role in down-regulating the ERK pathway." J Biol Chem **274**(19): 13271-13280.
- Tollinger, M., N. R. Skrynnikov, et al. (2001). "Slow dynamics in folded and unfolded states of an SH3 domain." J Am Chem Soc **123**(46): 11341-11352.
- Tolman, J. R. (2001). "Dipolar couplings as a probe of molecular dynamics and structure in solution." Curr Opin Struct Biol **11**(5): 532-539.
- Tomko, R. J., Jr. and J. S. Lazo (2008). "Multimodal control of Cdc25A by nitrosative stress." Cancer Res **68**(18): 7457-7465.
- Vassilev, L. T., B. T. Vu, et al. (2004). "In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2." Science **303**(5659): 844-848.
- Verbeek, S., M. van Lohuizen, et al. (1991). "Mice bearing the E mu-myc and E mu-pim-1 transgenes develop pre-B-cell leukemia prenatally." Mol Cell Biol **11**(2): 1176-1179.
- Vigneron, A., J. Cherier, et al. (2006). "The cell cycle inhibitor p21waf1 binds to the myc and cdc25A promoters upon DNA damage and induces transcriptional repression." J Biol Chem **281**(46): 34742-34750.
- Vigo, E., H. Muller, et al. (1999). "CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase." Mol Cell Biol **19**(9): 6379-6395.
- Visintin, R., K. Craig, et al. (1998). "The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation." Mol Cell **2**(6): 709-718.
- Vogtherr, M., K. Saxena, et al. (2005). "NMR backbone assignment of the mitogen-activated protein (MAP) kinase p38." Journal of Biomolecular NMR **32**(2): 175-175.
- von Hippel, P. H. and Schleich (1969). Marcel Dekker, New York.
- Wang, Q., D. Dube, et al. (2004). "Catalytic inactivation of protein tyrosine phosphatase CD45 and protein tyrosine phosphatase 1B by polyaromatic quinones." Biochemistry **43**(14): 4294-4303.
- Wang, Y. and O. Jardetzky (2002). "Probability-based protein secondary structure identification using combined NMR chemical-shift data." Protein Sci **11**(4): 852-861.
- Wirmer, J., C. Schlorb, et al. (2004). "Modulation of compactness and long-range interactions of unfolded lysozyme by single point mutations." Angew Chem Int Ed Engl **43**(43): 5780-5785.
- Wishart, D. S., C. G. Bigam, et al. (1995). "¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shift referencing in biomolecular NMR." J Biomol NMR **6**(2): 135-140.

- Wishart, D. S., B. D. Sykes, et al. (1992). "The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy." Biochemistry **31**(6): 1647-1651.
- Wittekind, M. and L. Mueller (1993). "HNCACB, a High-Sensitivity 3D NMR Experiment to Correlate Amide-Proton and Nitrogen Resonances with the Alpha- and Beta-Carbon Resonances in Proteins." Journal of Magnetic Resonance, Series B **101**(2): 201 - 205.
- Wohnert, J., K. J. Franz, et al. (2003). "Protein alignment by a coexpressed lanthanide-binding tag for the measurement of residual dipolar couplings." J Am Chem Soc **125**(44): 13338-13339.
- Wu, D. H., A. D. Chen, et al. (1995). "An Improved Diffusion-Ordered Spectroscopy Experiment Incorporating Bipolar-Gradient Pulses." Journal of Magnetic Resonance, Series A **115**(2): 260 - 264.
- Zhang, M., R. L. Van Etten, et al. (1994). "Crystal structure of bovine heart phosphotyrosyl phosphatase at 2.2-A resolution." Biochemistry **33**(37): 11097-11105.
- Zhu, G., X. M. Kong, et al. (1999). "Gradient and sensitivity enhancement of 2D TROSY with water flip-back, 3D NOESY-TROSY and TOCSY-TROSY experiments." Journal of Biomolecular NMR **13**(1): 77--81.
- Zou, X., T. Tsutsui, et al. (2001). "The Cell Cycle-Regulatory CDC25A Phosphatase Inhibits Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1." Molecular and Cellular Biology **21**(14): 4818-4828.

Danksagung

Zum Abschluss meiner Doktorarbeit bedanke ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuerst gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Harald Schwalbe für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in einem hervorragend ausgestatteten Umfeld durchzuführen. Seine vorbehaltlose Unterstützung ermöglichte es mir, verschiedenste Lösungsansätze auszuprobieren. Er war trotz vielfältiger Belastungen stets zur Beratung bereit und trug durch Diskussionen und konstruktive Kritik viel zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Dank an Prof. Volker Dötsch für die Begutachtung meiner Dissertation.

Außerordentlichen Dank an das beste Sekretariat, das man sich wünschen kann: Anna Paulus und Elena Hartmann. Diesen beiden gebührt höchster Respekt für ihren unermüdlichen Einsatz, alle organisatorischen Probleme zu meistern. Ihre Bedeutung für den Arbeitskreis kann nicht überschätzt werden.

Vielen Dank an Dr. Christian Richter, der trotz vieler Aufgaben immer noch Zeit für Unterstützung „am Gerät“ gefunden hat. Seine Geduld beim Beantworten meiner Fragen war einzigartig und seine Erklärungen haben mich immer vorangebracht.

Dank an Dr. Krishna Saxena für die Unterstützung beim Anschieben des Projektes und der verschiedenen molekularbiologischen Arbeiten.

Dank an Elke Stirnal und Marie Anders-Maurer für die Herstellung und Aufreinigung der benötigten Peptide.

Dank an folgende Personen für die Unterstützung bei verschiedenen Aufgaben: Dr. Julia Wirmer (DOSY), Dr. Marc Böhm (Proteinstabilitätstests), Dr. Ulrich Schieberr (Auswahl von Inhibitoren), und Florian Durst (Tests zur zellfreien Proteinexpression).

Dank an Dr. Christian Schlörb, Martin Hähnke, Fabian Hiller und Daniel Mathieu für allgemeinen und speziellen Tech-Support, letzterem auch noch für Hilfe am 400er.

Besonderen Dank an Dr. Kai Schlepckow, Anke Reining, Senada Nozinovic und Katja Barthelmes für Korrekturlesen und Ansporn beim Endspurt.

Vielen Dank für die gute Stimmung im Büro an Dr. Gottfried Zimmermann, Dr. Jonas Noeske, Dr. Christian Gerum, Dr. Jörg Rinnenthal und Dr. Holger Berk.

Danksagung

Dank an alle noch nicht genannten Mitglieder des Arbeitskreis für Beiträge zu meiner Doktorarbeit, die gute Stimmung bei zahlreichen Feiern und während der „Group Trips“.

Vielen Dank an Britta Schraml und Familie für langjährige Unterstützung.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meine beiden Schwestern samt Familien für die ausdauernde Unterstützung während aller Phasen meiner Promotion.

Publikationen

Nielsen G., Stadler, M., Jonker, H., Betz, M., und Schwalbe, 2009, NMR: Applications in Chemical Biology, in Begley, T. P., ed., *Wiley encyclopedia of Chemical Biology, Volume 3*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, p. 350-373.

Stadler, M., Saxena, K., und Schwalbe, H.: Towards NMR-based ligand structure of phosphatases – in Vorbereitung

Curriculum Vitae

Max Stadler

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 14. Juni 1979

Geburtsort: Berlin

Staatsangehörigkeit: deutsch

Promotion

01/2005 - 10/2010
Goethe-Universität Frankfurt am Main
Doktorarbeit bei Prof. Dr. Harald Schwalbe
"NMR-spektroskopische Untersuchungen zur Bindung
kleiner Moleküle an das Zellzyklusprotein CDC25A"

Studium

12/2003 - 08/2004
Universität Regensburg
Diplomarbeit bei Prof. Dr. Eike Brunner
„Hochauflösende NMR-Untersuchungen zur
Wechselwirkung zwischen Proteinen und kleinen
Sondenmolekülen in Lösung“

09/2001 - 08/2002
Wesleyan University, Connecticut, USA
Studium im „Graduate Program“ des Department for
Molecular Biology and Biochemistry

09/2000
Universität Regensburg
Vordiplom

11/1998 - 08/2004
Universität Regensburg
Studium der Biochemie

Zivildienst

10/97 - 10/98
Zivildienst beim BRK Landsberg

Schulbildung

09/89 - 07/97
Ignaz-Kögler-Gymnasium, Landsberg am Lech

09/1987 - 07/1989
Volksschule am Spitalplatz, Landsberg am Lech

09/1985 - 07/1987
Conrad-Grundschule, Berlin-Wannsee

Akademische Lehrer an der Universität Regensburg, der Wesleyan University, Middletown CT, USA, und -Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main waren (in alphabetischer Reihenfolge):

Prof. Dr. David Beveridge, Prof. Dr. Eike Brunner, Prof. Dr. Rainer Deutzmann, Prof. Dr. Volker Dötsch, Prof. Dr. Clemens Glaubitz, Prof. Dr. Günther Hauska, Prof. Dr. Jürgen Heinze, Prof. Dr. Manju Hingorani, Prof. Dr. Scott Holmes, Prof. Dr. Hans-Robert Kalbitzer, Prof. Dr. Hans-Helmut Kohler, Prof. Dr. Burkhard König, Prof. Dr. Nikolaus Korber, Prof. Dr. Armin Kurtz, Prof. Dr. Ludwig Lehle, Prof. Dr. Michael McAlear, Prof. Dr. Donald Oliver, Prof. Dr. Rex Pratt, Prof. Dr. Irina Russu, Prof. Dr. Jürgen Sauer, Prof. Dr. Rüdiger Schmitt, Prof. Dr. Stephan Schneuwly, Prof. Dr. Harald Schwalbe, Prof. Dr. Manfred Sumper, Prof. Dr. Widmar Tanner, Prof. Dr. Reinhardt Wirth, Prof. Dr. Jens Wöhnert