

Kritische Aminosäurepositionen für die Bindung von ApoCalmodulin an die Stickoxidsynthase Typ I und II

Petra Censarek

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3920

ISSN 0944-2952

Institut für Biologische Informationsverarbeitung Jül-3920

Institut 1: Zelluläre Signalverarbeitung

D38 (Diss., Köln, Univ., 2001)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461/61-5220 · Telefax: 02461/61-61 03 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Zusammenfassung

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

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

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

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

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

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

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

Abstract

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

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

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

CaM-binding studies with the peptides revealed, that the exchange of position 6 in the NOS-I CaM-binding site results in ApoCaM binding. Further exchanges at positions 3, 9, and 13 enhanced the affinity for ApoCaM. Mutations at the critical positions in the NOS-II CaM-binding site resulted in a decrease of ApoCaM affinity. The peptide with a single mutation at position 6 bound neither ApoCaM nor Ca^{2+} /CaM.

A striking difference lay in the thermodynamic of peptide CaM-binding. The binding of NOS peptides to Ca^{2+} /CaM was enthalpically favoured, whereas the binding to ApoCaM was entropically driven.

Classical ApoCaM-binding motifs (IQ-motifs) show a highly conserved positive charge at position 6. This positive amino acid is also found in the NOS-II CaM-binding sequence and appears to be decisive for ApoCaM binding. Decrease of the NOS-II CaM-binding site's hydrophobic character especially in the N-terminal part leads to an decrease in ApoCaM affinity. The N-terminal part of the motif seems to be responsible for ApoCaM-interaction, as it is the case for IQ-motifs.

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

	Zusammenfassung	
	Abstract	
	Inhaltsverzeichnis	i
	Abkürzungsverzeichnis	vi
	Aminosäuren	ix
1	Einleitung	1
1.1	Ca ²⁺ und seine Bedeutung in der zellulären Signaltransduktion	1
1.2	Ca ²⁺ -Bindungsproteine	1
1.3	Calmodulin	2
1.3.1	Struktur und Konformation von Ca ²⁺ /CaM und ApoCaM	2
1.3.2	Calmodulin-Bindungsmotive	4
1.4	Stickoxid-Synthasen	7
1.4.1	Katalytischer Mechanismus	10
1.4.2	Stickoxid	11
1.4.3	Regulation der NO-Synthasen	12
1.4.4	CaM-Bindungsstelle der NOS-I und -II	14
1.5	Zielsetzung der Arbeit	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Chemikalien und Materialien	18
2.2	Peptide	20
2.2.1	Herstellung der Peptidlösungen	21
2.2.2	Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Peptidlösungen bei $\lambda = 205 \text{ nm}$	21
2.2.3	Konzentrationsbestimmung von Peptiden mit N-terminalem Cystein	21
2.2.4	Reduktion von Peptiden mit N-terminalem Cysteinrest	22
2.2.5	Herstellung von CaM-Lösungen	23
2.2.6	Konzentrationsbestimmung nach BRADFORD	23
2.2.7	Konzentrationsbestimmung mit dem BCA-Assay	23
2.3	CaM-Peptid-Interaktionsstudien	24
2.3.1	Puffer	24
2.3.2	Isotherme Titrationskalorimetrie	24
2.3.3	Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie	26
2.3.3.1	Immobilisierung der Liganden	27
2.3.3.2	Messung der Wechselwirkung zwischen Ligand und Analyt	27

2.4	Größenausschlußchromatographie	28
2.5	Amplifizierung und Präparation von Plasmid-DNA	29
2.5.1	Vektoren und <i>E. coli</i> -Stämme	29
2.5.2	Herstellung kompetenter Zellen	29
2.5.3	Retransformation	29
2.5.4	Anzucht von <i>E. coli</i> -Zellen	30
2.5.5	Alkalische Mini-Präparation	30
2.5.6	Lithiumchlorid-Präparation	30
2.5.7	DNA-Agarosegelelektrophorese	31
2.5.8	Reinigung der DNA aus Agarosegelen	32
2.6	DNA-Sequenzierung	32
2.6.1	Reinigung von DNA für die Sequenzierung	32
2.6.2	Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Primern	33
2.6.3	Fluoreszenzmarkierte Primer für die Sequenzierung	33
2.7	DNA-Mutagenese	34
2.7.1	Restriktionsverdau	34
2.7.2	Auffüllen von überhängenden, einzelsträngigen DNA-Enden	34
2.7.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	35
2.7.4	Herstellung und Reinigung von Oligonucleotiden	35
2.7.5	Bedingungen der PCR	35
2.7.6	Phosphorylierung von DNA-5'-Enden	36
2.7.7	Dephosphorylierung von geschnittenen Vektoren	36
2.7.8	Ligation	36
2.7.9	Transformation von Ligationsprodukten	36
2.7.10	Mutagenesestrategie für die NOS-I-cDNA	37
2.7.11	Mutagenesestrategie für die NOS-II-cDNA	38
2.8	Expression der Enzyme	39
2.8.1	Transiente Transfektion von HEK-293-Zellen	39
2.8.2	Zellfixierung mit Paraformaldehyd	40
2.8.3	Nachweis der NO-Synthasen in fixierten Zellen	41
2.8.3.1	Immuncytochemie	41
2.8.3.2	NADPH-Diaphorase-Aktivität	41
2.8.3.3	Colokalisation von NOS und NADPH-Diaphorase-Aktivität	42
2.8.4	Zellernte und Lyse	42

2.8.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach BRADFORD	42
2.8.6	Nachweis der NOS in Zelllysaten	42
2.8.6.1	Polyacrylamidgelelektrophorese	42
2.8.6.2	Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen	44
2.8.6.3	Transfer von Proteinen auf Membranen (Western blotting)	44
2.8.6.4	Immunologischer Nachweis der NOS	44
2.8.6.5	„Stripping“ von Blotmembranen	45
2.8.6.6.	Amido-Schwarz-Färbung von Blotmembranen	45
2.8.7	NOS-Quantifizierung	45
2.9	NOS-Aktivitätsstudien	46
2.9.1	Tritiumassay	46
2.9.2	Griessassay	47
2.10	Statistische Auswertung der Daten	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Peptide	49
3.2	Isotherme Titrationskalorimetrie	51
3.2.1	Kontrollmessungen und Auswertung der Daten	51
3.2.2	Bindung des NOS-I WT-Peptides und seiner Mutanten an Ca^{2+} /CaM	54
3.2.3	Bindung der NOS-I-Peptidmutanten an ApoCaM	57
3.2.4	Bindung der NOS-II-Peptidmutanten an ApoCaM	60
3.2.5	Zusammenfassung der ITC-Daten	65
3.3	Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR)-Spektroskopie	68
3.3.1	Problematik der Meßmethode	68
3.3.2	Kontrollmessungen	69
3.3.3	Auswertung der Daten	70
3.3.4	SPR-Messungen mit den NOS-Peptiden	75
3.3.4.1	Abhängigkeit des Resonanzsignals von der Immobilisierungsdichte	76
3.3.4.2	CaM-Bindung des Peptides NOS-I WT und seiner Mutanten	78
3.3.4.3	CaM-Bindung des Peptides hhNOS-II WT	82
3.3.4.4	CaM-Bindung der mutierten NOS-II-Peptide	85
3.3.5	Zusammenfassung der SPR-Daten	89
3.4	Größenausschlußchromatographie	91
3.5	Zusammenfassung der Peptidstudien	96
3.6	Herstellung von Mutanten der NOS-I und -II	99

3.6.1	Sequenzierung der Wildtyp-cDNA von NOS-I und -II	99
3.6.2	Herstellung der NOS-Mutanten	100
3.7	Heterologe Expression der NO-Synthasen	101
3.7.1	Transfektionseffizienz	101
3.7.2	Zelllyse	103
3.7.3	„Größenanomalie“ der Mutanten NOS-I VKF und NOS-I E737V	103
3.8	Aktivitätsstudien mit heterolog exprimierten NO-Synthasen	105
3.8.1	Quantifizierung der NOS	105
3.8.2	Griessassay	107
3.8.2.1	Allgemeiner Vergleich der Aktivitäten in den Zelllysaten	107
3.8.2.2	Spezifische Aktivität der NOS-I und ihrer Mutanten	112
3.8.3	Tritiumassay	112
3.8.4	Zusammenfassung der Aktivitätsstudien	113
4	Diskussion	114
4.1	Das CaM-Bindungsverhalten der Wildtyp-Peptide	114
4.2	Auswirkungen der Mutationen auf das CaM-Bindungsverhalten der Peptide	116
4.2.1	Welche Auswirkungen hatten die Mutationen auf die Affinität zu Ca^{2+} /CaM?	116
4.2.2	Welche Auswirkungen hatten die Mutationen auf die Affinität zu ApoCaM?	117
4.2.3	Es muß zwischen der Bindung an ApoCaM und der Ca^{2+} -Abhängigkeit der CaM-Bindung unterschieden werden.	118
4.2.4	Welche Auswirkungen hatten die Mutationen auf die Thermodynamik der Bindung?	118
4.2.5	Kann man die Unterschiede in der CaM-Bindung strukturell erklären?	119
4.3	Diskussion der verwendeten Methoden für die Peptidstudien	122
4.3.1	Aggregation von Peptiden	122
4.3.2	Isotherme Titrationskalorimetrie	123
4.3.3	Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Studien	124
4.4	Aktivität der Wildtypenzyme in An- und Abwesenheit von Ca^{2+}	126
4.5	Auswirkungen der Mutationen auf die Enzymaktivität in An- und Abwesenheit von Ca^{2+}	127
4.6	Diskussion der verwendeten Methoden für die Enzymaktivitätsstudien	128
4.6.1	Mutationen in den Wildtyp-cDNAs	128

4.6.2	Quantifizierung der NOS im Zelllysate	129
4.6.3	Bestimmung der NOS-Aktivitäten im Zelllysate	129
4.6.4	Vergleich von Enzymaktivitäten im Zelllysate	130
4.7	Vergleich der Ergebnisse der Peptid- und Enzymstudien	131
4.7.1	Was sagen Peptidstudien über die Vorgänge im gesamten Protein aus?	131
4.7.2	Welche Ergebnisse der Peptidstudien lassen sich auf das gesamte Enzym beziehen?	132
4.8	Ausblick	134
5	Anhang	135
5.1	Gelshiftexperimente	135
5.2	Beispiele für Scatchard- und EC ₅₀ -Plots aus den SPR-Messungen	137
5.3	Hydrophobizität und Amphiphilie der Peptide	140
6	Literaturverzeichnis	142

Abkürzungsverzeichnis

ΔG	Bindungsenergie
ΔH	Bindungsenthalpie
ΔS	Bindungsentropie
μH	Amphiphilie
$^{\circ}C$	Temperatur in Grad Celsius
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ac	Essigsäure
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
amp	Ampicillin
ApoCaM	Ca ²⁺ -freies Calmodulin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
AV	Ausschlußvolumen
BCA	Bicinchoninsäure
BES	N,N,-bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
Bp (kBp)	Basenpaar(e) (Kilobasenpaare)
BSA	Rinderserumalbumin
Ca ²⁺ /CaM	Calcium/Calmodulin
cal	Kalorien
CaM	Calmodulin
CaMK	CaM Kinase
CAPON	carboxyterminaler PDZ Ligand der neuronalen NOS
CM	Calcium-Magnesium
C-Terminus	Carboxy-Terminus einer Polypeptidkette
Da (kDa)	Dalton (Kilodalton)
DAB	Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphate
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	halbmaximale Effektkonzentration
EDC	N-Ethyl-N'(dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol

FAD	Flavinadenindinucleotid
FMN	Flavinmononucleotid
FPLC	Fast protein liquid chromatography
FR	Flußrate
g	Gramm bzw. Normal-Fallbeschleunigung (9,81 m/s ²)
h	Stunde(n)
H ₂ O bid.	bidestilliertes Wasser
Hb	Hydrophobizität
HEK-Zellen	humane, embryonale Nierenzellen
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
hh	human, hepatisch
HMW	Molekulargewichtsstandard für den hochmolekularen Bereich
HSP	Hitzeschockprotein
ID	Immobilisierungsdichte
IgG	Immunglobulin G
IP	Inkubationspuffer
IQ	IQ-Motiv
IRS-1	Insulinrezeptor Substrat 1
ITC	isothermes Titrationskalorimeter bzw. Titrationskalorimetrie
J	Joule
K	Kelvin
K _A	Assoziationskonstante
k _a	Assoziationsratenkonstante
K _D	Dissoziationskonstante
k _d	Dissoziationsratenkonstante
l	Liter
L-Arg	L-Arginin
L-Cit	L-Citrullin
LMW	Molekulargewichtsstandard für den niedermolekularen Bereich
L-NAME	N ω -Nitro-L-Arginin Methyl Ester
L-NNA	N ω -Nitro-L-Arginin
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
MCS	multiple Klonierungsstelle
MG	Molekulargewicht
min	Minute(n)
mm	Mausmarkrophagen bzw. Millimeter
NADPH	Nicotinamadenindinucleotid (reduzierte Form)
NAP110	NOS-assoziiertes Protein 110
NBT	Nitroblautetrazolium
NGS	normales Ziegenserum
NGS ⁺	normales Ziegenserum mit Natriumazid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NOS	Stickoxidsynthase

NOSIP	mit der endothelialen NOS interagierendes Protein
NTB	5-Thio-2-Nitrobenzoesäure
N-Terminus	Amino-Terminus einer Polypeptidkette
OD	optische Dichte
PA	Paraformaldehyd
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDEA	2-(2-Pyridyldithio)ethanamin
pH	pH-Wert
PhK	Phosphorylase Kinase
PI	Proteaseinhibitoren
PIN	Proteininhibitor der neuronalen NOS
R	Gaskonstante
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
RU	Resonanzeinheit(en)
RV	Retentionsvolumen
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschlußchromatographie
sec	Sekunde(n)
S-ETU	S-Ethylisothioharnstoff
skMLCK	Myosin-Leichtkettenkinase aus dem Skelettmuskel
smMLCK	Myosin-Leichtkettenkinase aus glatter Muskulatur
SPR	Oberflächen-Plasmon-Resonanz
Std.	Standardabweichung vom Mittelwert
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
Taq Polymerase	hitzestabile Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TE	Tris / EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiaminomethan
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
Tween 20	Polyoxyethylen (20) sorbitanmonolaureat
U	Unit (Einheit für die Enzymaktivität)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen zu Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht zu Volumen
ZNS	Zentralnervensysteme

Einbuchstabensymbol für Aminosäuren

<u>Aminosäure</u>	<u>Buchstabensymbol</u>
Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Aspartat	D
Cystein	C
Glutamin	Q
Glutamat	E
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

1 Einleitung

1.1 Ca^{2+} und seine Bedeutung in der zellulären Signaltransduktion

Ca^{2+} ist ein wichtiger intrazellulärer Botenstoff, der in vielen Signaltransduktionswegen eine Rolle spielt. Zu diesem Zweck wird ein Ca^{2+} -Konzentrationsgradient über den Zellmembranen aufrecht erhalten. Die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration beträgt im Ruhezustand in den meisten Zellen ca. 100 nM. Sie liegt damit um mehrere Größenordnungen niedriger, als die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration (ca. 1-2 mM). Der Gradient wird durch Ca^{2+} -Pumpen aufrecht erhalten, die die Ca^{2+} -Ionen gegen das Konzentrationsgefälle aus dem Cytosol heraus transportieren. Bei Ca^{2+} -abhängigen Signalwegen werden Signale durch einen transienten Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration weitergeleitet. Das Ca^{2+} stammt entweder aus dem extrazellulären Raum, oder aber aus intrazellulären Speichern, z.B. dem sarcoplasmatischen Reticulum. Das Signal wird intrazellulär durch eine Vielzahl von Ca^{2+} -Bindungsproteinen (1.2) weitergeleitet. Eine Übersicht über die Ca^{2+} -Signaltransduktion geben z. B. TSIEN und TSIEN (1990), POZZAN et al. (1994) und CLAPHAM (1995).

1.2 Ca^{2+} -Bindungsproteine

Ca^{2+} -Bindungsproteine können verschiedene Funktionen erfüllen. Zum einen können sie als Ca^{2+} -Reservoir bzw. -puffer dienen (z.B. Parvalbumin in Skelettmuskelzellen, PECHERE et al., 1977; SOMLYO et al., 1981). Zum anderen können sie in der Ca^{2+} -Signaltransduktion eine Rolle spielen, indem sie je nach intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration Zielproteine aktivieren oder inhibieren (modulatorische Ca^{2+} -Bindungsproteine, z.B. Calmodulin (1.3) oder Recoverin, GRAY-KELLER et al., 1993; KAWAMURA, 1993; BURGOYNE und WEISS, 2001).

Viele Ca^{2+} -Bindungsproteine gehören zur Familie der EF-Hand-Proteine. Diese Proteinfamilie wurde nach ihrer Ca^{2+} -Bindungsstruktur benannt, die sich aus zwei α -Helices mit einer verbindenden Schleife zusammensetzt (KRETSINGER und NOCKOLDS, 1973). Die meisten EF-Hand-Proteine besitzen mehrere EF-Hand-Strukturen, von denen eine unterschiedliche Anzahl funktionell ist. Sie kommen meist paarweise vor, wobei sie mit einem kurzen, antiparallel verlaufenden β -Faltblatt verbunden sind und Ca^{2+} -Ionen kooperativ binden. Während bei Proteinen, die der Ca^{2+} -Pufferung dienen, nur eine geringe Konformationsänderung bei der Ca^{2+} -Bindung stattfindet, kann die Bindung bei modulatorischen Proteinen große Änderungen in der Tertiärstruktur hervorrufen (1.3.1). Eine Zusammenfassung über EF-Hand-Proteine findet sich zum Beispiel bei PERSECHINI et al. (1989) und IKURA (1996).

1.3 Calmodulin

Calmodulin (CaM) ist ein ubiquitäres, modulatorisches Ca^{2+} -Bindungsprotein aus der EF-Hand-Familie. Es vermittelt eine Vielzahl von Ca^{2+} -abhängigen Prozessen in der Zelle, wie zum Beispiel: Genregulation, DNA-Synthese, Regulation des Zellzyklus, Mitose, Organisation des Cytoskelettes, Muskelkontraktion, Signaltransduktion, Regulation des Metabolismus, Exocytose und Regulation des Ionenhaushaltes der Zelle. Zusammenfassungen über Calmodulin und seine Funktion finden sich z.B. bei MEANS et al. (1982); COHEN und KLEE (1988) und WEINSTEIN und MEHLER (1994). Ca^{2+} -freies Calmodulin wird als ApoCalmodulin (ApoCaM) bezeichnet. Auch ApoCaM ist in der Lage, Proteine zu binden. Neuromodulin bindet z.B. ausschließlich an ApoCaM (ANDREASEN et al., 1983). Eine Übersicht über ApoCaM und ApoCaM-bindende Proteine geben JURADO et al. (1999).

1.3.1 Struktur und Konformation von Ca^{2+} /CaM und ApoCaM

CaM ist ein hochkonserviertes Protein mit über 90 % Homologie innerhalb eukaryotischer Organismen, das sich bei Säugetieren aus 148 Aminosäuren (AS) zusammensetzt und ein Molekulargewicht von 16.700 Da hat. Es besitzt vier funktionelle EF-Hand-Strukturen, je zwei in einer C-terminalen und einer N-terminalen Domäne. Die C-terminalen EF-Hand-Strukturen weisen eine höhere Affinität zu Ca^{2+} auf, als die beiden N-terminalen Strukturen (541 bis 820 nM am C-Terminus bzw. 2,3 bis 12 μM am N-Terminus, GILLI et al., 1998). Anhand von Peptidstudien konnte gezeigt werden, daß die Affinität von CaM für Ca^{2+} bei der Bindung an ein Zielprotein ansteigt (MIRZOEVA et al., 1999). Die beiden Domänen sind durch eine flexible Helix von 26 Aminosäuren Länge miteinander verbunden, was dem Protein eine hantelförmige Struktur verleiht (BABU et al., 1985). Die Helix setzt sich aus den Helices D und E der EF-Hände II und III zusammen. Diese flexible, zentrale Helix ermöglicht die Bindung an unterschiedlich lange Zielsequenzen.

ApoCaM unterscheidet sich in seiner Sekundärstruktur nicht von Ca^{2+} /CaM (URBAUER et al., 1995), allerdings bestehen Unterschiede in der Tertiärstruktur. Die Helices der EF-Hände in ApoCaM liegen nahezu antiparallel zueinander. So entstehen zwei relativ kompakte Domänen. Man bezeichnet dies als „geschlossene Konformation“ (Abb. 1.1 A), in der die hydrophoben Bereiche unzugänglich im Inneren liegen. Bei der Bindung von Ca^{2+} verschiebt sich die Lage der Helices jeder EF-Hand zueinander, so daß sie im rechten Winkel zueinander zu liegen kommen. In dieser „offenen Konformation“ (Abb. 1.1 B) bilden sich an jeder Domäne von außen zugängliche, hydrophobe Taschen aus (LAPORTE et al., 1980; FINN et al.,

1995; KUBONIWA et al., 1995). Bei der Bindung an eine Zielsequenz verändert sich die Konformation von Ca^{2+} /CaM ebenfalls (Abb. 1.1 C).

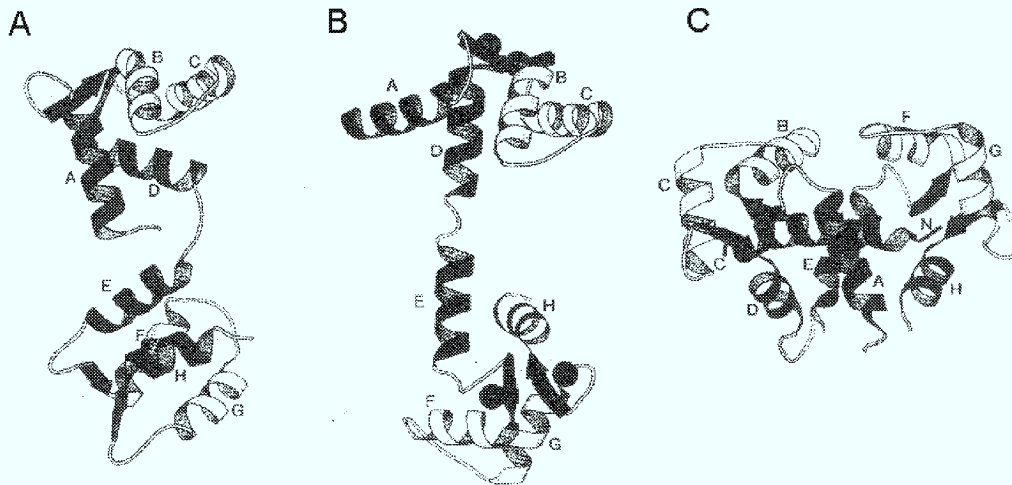


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der dreidimensionalen Struktur von CaM nach ZHANG und YUAN (1998). Die Buchstaben bezeichnen die Helices der EF-Hände: EF-Hand I: A&B, II: C&D, III: E&F, IV: G&H. Der Deutlichkeit halber sind die beiden Helices einer EF-Hand in schwarz und weiß dargestellt. **A** Ca^{2+} -freies CaM (ZHANG et al., 1995). Die Helices der EF-Hände liegen jeweils nahezu antiparallel zueinander: geschlossene Konformation. **B** Ca^{2+} /CaM (BABU et al., 1988). Die Helices der EF-Hände liegen im rechten Winkel zueinander. Die zentrale Helix ist gestreckt: offene Konformation. **C** Ca^{2+} /CaM im Komplex mit dem CaM-Bindungspeptid aus der skelettalen Myosin-Leichtkettenkinase (IKURA et al., 1992). Das Peptid (schwarz, im Vordergrund) liegt horizontal. N- und C-Terminus sind gekennzeichnet.

Die Bindung an Ca^{2+} /CaM erfolgt über hydrophobe Interaktionen zwischen den konservierten hydrophoben Aminosäureresten der Zielsequenz (1.3.2) und den hydrophoben Taschen an jeder Domäne des Ca^{2+} /CaM. CaM besitzt einen überdurchschnittlich hohen Methioninanteil. Je vier Methioninreste befinden sich am Eingang jeder hydrophoben Tasche, wobei deren Boden von aromatischen und verzweigten aliphatischen Aminosäuren gebildet wird (BABU et al., 1988). Diese hydrophobe Umgebung interagiert mit den konservierten Resten der CaM-Bindungssequenzen. Den Methioninresten wird große Bedeutung für die hohe Flexibilität zugeschrieben, die CaM in Bezug auf die Zielsequenzen zeigt (GELLMAN, 1991; ZHANG et al., 1994). Die Art und Weise wie ApoCaM an seine Zielproteine bindet ist weitgehend ungeklärt. Ein Modell der ApoCaM-Bindung an IQ-Motive (1.3.2) wurde anhand der hohen Homologie des ApoCaMs zur leichten Kette aus unkonventionellen Myosinen erstellt (HOUDUSSE et al., 1996). Danach bindet ApoCaM an einen langen Bereich der Zielsequenz (ca. 30 Aminosäuren). Der C-Terminus nimmt eine semioffene Konformation an, was die Interaktion mit α -helikalen Strukturen ermöglicht (SWINDELLS und IKURA, 1996).

1.3.2 Calmodulin-Bindungsmotive

CaM-Bindungsstellen zeichnen sich durch eine große Diversität aus und zeigen nur eine sehr geringe Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz. Fast alle beinhalten einen hohen Anteil an basischen und hydrophoben Aminosäuren, wobei die hydrophoben Reste häufig an konservierten Positionen liegen. In der Projektion im SCHIFFER-EDMUNDSON-Diagramm (SCHIFFER und EDMUNDSON, 1967) zeigen die Bindungsstellen meist einen α -helicalen, amphipathischen Charakter. Die CaM-Bindung findet im wesentlichen über hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen statt. In fast allen Fällen bindet der C-Terminus des CaMs an den N-Terminus der Zielsequenz (antiparallele Bindung). Eine Ausnahme hiervon bildet z.B. Melittin.

Man kann die CaM-Bindungsstellen mehreren Kategorien zuordnen (RHOADS und FRIEDBERG, 1997). Dabei werden die Bindungsstellen nach Homologien sortiert:

Bindungsstellen für Ca^{2+} -abhängige CaM-Bindung

Die Unterteilung in eine Bindungsstelle für die Ca^{2+} /CaM- oder ApoCaM-Bindung kann nicht klar getroffen werden, da bei genauer Betrachtung immer mehr Protein-CaM-Interaktionen nicht diesem Raster entsprechen. Außerdem berücksichtigen Begriffe wie „ Ca^{2+} -abhängige“ und „ Ca^{2+} -unabhängige“ Bindung nicht, daß die Bindung an CaM über einen weiten Bereich an Ca^{2+} -Konzentrationen erfolgen kann. Trotzdem spricht man bei den 1-8-14 und 1-5-10 Motiven (s.u.) von „klassischen Ca^{2+} /CaM-Bindungsstellen“, da der größte Teil der Proteine, die eine solche Bindungsstelle aufweisen, nur in Anwesenheit von Ca^{2+} an CaM binden.

Die CaM-Bindungsstellen für Ca^{2+} -abhängige CaM-Bindung besitzen oft eine nanomolare Affinität zu CaM, wie z.B. Adenylat Cyclase (VORHERR et al., 1993); Calcineurin (TAKANO et al., 1994) und NO-Synthase I (VORHERR et al., 1993; ZOCHE et al., 1996). Charakteristisch für diese Bindungsstellen sind zwei hydrophobe oder aromatische Aminosäurereste, die durch ca. 12 Aminosäuren voneinander getrennt sind. Sie stellen die Verbindung zu den globulären CaM-Domänen her und binden dort in den hydrophoben Taschen (1.3.1). Die Anzahl an Aminosäuren zwischen den hydrophoben Ankern kann variieren, was durch die Flexibilität der zentralen Helix des CaMs ausgeglichen wird. Die Bindungsmotive können je nach Position der konservierten, hydrophoben oder aromatischen Reste in zwei Gruppen unterteilt werden:

1-8-14 Motiv

Das 1-8-14 Motiv findet man häufig bei Proteinen, die Ca^{2+} /CaM mit hoher Affinität binden. Es kann in zwei Typen unterteilt werden: 1-8-14 Typ A und 1-8-14 Typ B. Das Bindungsmotiv vom Typ A kann auch als 1-5-8-14 Motiv bezeichnet werden, da es an allen vier Positionen konservierte hydrophobe Aminosäurereste aufweist. Die amphipathische Helix des Typ A Motives weist meist eine Nettoladung von +3 bis +6 auf. Die Nettoladung des Typen B liegt zwischen +2 und +4.

Die Konsensussequenzen beider Untergruppen lauten:

Typ A: (F/I/L/V/W)xxx(F/A/I/L/V/W)xx(F/A/I/L/V/W)xxxxx(F/I/L/V/W)

Typ B: (F/I/L/V/W)xxxxxx(F/A/I/L/V/W)xxxxx(F/I/L/V/W)

Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt, wobei der Buchstabe x für beliebige Aminosäuren steht. Beispiele für Proteine mit diesen Bindungsmotiven sind in Tab 1.1 aufgeführt.

1-5-10 Motiv

Dieses CaM-Bindungsmotiv ist etwas kürzer als das 1-8-14 Motiv. Die Interaktion zu CaM findet hauptsächlich über die Positionen 1 und 10 statt. Die Konsensussequenz dieses CaM-Bindungsmotives ist:

xxx(F/I/L/V/W)xxx(F/I/L/V)xxxx(F/I/L/V/W).

Beispiele für Bindungsproteine mit einem solchen Motiv finden sich ebenfalls in Tab. 1.1.

Auch natürlich vorkommende Peptide können eine hochaffine Bindung an CaM aufweisen. Zu ihnen gehören u.a. Mastoparan (MALENCIK und ANDERSON, 1983), Mellitin (COMTE et al., 1983) und einige Peptidhormone. Sie alle bilden eine amphipathische Helix aus. Auf der Basis dieser Peptidsequenzen synthetisierten COX et al. (1985) Modellpeptide mit ähnlichen Eigenschaften, deren Untersuchung zu folgenden Verallgemeinerungen des Ca^{2+} /CaM-Bindungsverhaltens führte: die Peptide müssen eine Länge von mindestens 12 Aminosäureresten haben und eine amphipathische Helix ausbilden. Neben den hydrophoben Resten an konservierten Positionen, ist eine Ansammlung basischer Aminosäuren wichtig für die Affinität der Peptide zu CaM. So konnte ein hochaffines CaM-Bindungspeptid nur aus Leucin und Lysin synthetisiert werden. Mit einem Tryptophan in der ersten Position des CaM-Bindungsmotives konnte die Affinität noch gesteigert werden (DEGRADO et al., 1985).

Bindungsstellen für Ca^{2+} -unabhängige CaM-Bindung

Die Bindungsstellen für die Bindung an ApoCaM sind weit weniger erforscht als die Bindungsstellen für Ca^{2+} /CaM. Es ist ein Motiv bekannt, dem ApoCaM-Bindung zugeschrieben wird. Dieses leitet sich von der Myosin-CaM-Bindungsstelle ab und wird als IQ-Motiv bezeichnet. Es basiert auf 14 Aminosäuren mit der folgenden Konsensussequenz: $(I/V/L)QxxxRxxx(R/K)xx(F/I/L/V/W/Y)$.

ApoCaM-Bindung über ein IQ-Motiv wurde z.B. bei Neuromodulin und Neurogranin festgestellt. Allerdings konnte auch eine Ca^{2+} -abhängige Bindung an IQ-Motive gefunden werden (z.B. Insulinrezeptor Substrat 1, MUNSHI et al., 1996).

Synergistische Bindungsstellen

Eine weitere Möglichkeit der ApoCaM-Bindung besteht in Bindungsstellen, die sich aus zwei nicht kontinuierlichen Teilbereichen zusammensetzen. Ein Beispiel für eine solche synergistische Bindungsstelle ist die CaM-Bindungsstelle der Phosphorylase-b-Kinase. CaM ist eine feste Untereinheit dieser Phosphorylase-Kinase (COHEN et al., 1978). Ein CaM bindet über zwei nicht kontinuierliche Bindungsstellen fest an die regulatorische Einheit des Enzyms. Während die beiden Bindungsstellen auch einzeln Ca^{2+} -abhängig an CaM binden können, ist die Bindung von CaM an beide Bindungsstellen zusammen nicht durch Ca^{2+} -Komplexierung zu lösen (DASGUPTA et al., 1989).

Tab. 1.1: Identifizierte CaM-Bindungsmotive für Ca^{2+} -abhängige und -unabhängige CaM-Bindung.

Bindungstyp	CaM-Bindungsmotiv	Beispiel
Ca^{2+} -abhängige CaM-Bindung	1-8-14 Motiv Typ A	Calcineurin, NO-Synthasen, skMLCK, Mastoparan
	1-8-14 Motiv Typ B	smMLCK, Caldesmon, Titin
	1-5-10 Motiv	CaM-Kinase I und II, HSP90, Synapsin
	IQ-Motiv	Insulinrezeptor Substrat 1 (IRS-1, besitzt 2 IQ-Motive)
Ca^{2+} - unabhängige CaM- Bindung	IQ-Motiv	Neuromodulin, Neurogranin
	Synergistische Bindungsstellen	Phosphorylase-b-Kinase (PhK5 & PhK13)

Das IQ-Motiv gilt im Allgemeinen als klassisches Bindungsmotiv für Ca^{2+} -unabhängige CaM-Bindung. Eine Ca^{2+} -abhängige CaM-Bindung an dieses Motiv ist eher eine Ausnahme. Für jedes Motiv sind repräsentativ einige Proteine aufgeführt (skMLCK = Myosin-Leichtkettenkinase der Skelettmuskulatur; smMLCK = Myosin-Leichtkettenkinase der glatten Muskulatur; HSP = Hitzeschockprotein).

Es existieren auch Proteine, die keines der aufgeführten Bindungsmotive tragen und trotzdem an CaM binden. Ein Beispiel hierfür sind Syntrophine (NEWBELL et al., 1997), sowie die Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase (CHOI et al., 1990).

		1					5					8					10					14							
NOS-I	K	R	R	A	I	G	F	K	K	L	A	E	A	V	K	F	S	A	K	L	M	G	Q	A	M	A			
NOS-II	R	R	R	E	I	R	F	R	V	L	V	K	V	V	F	F	A	S	M	L	M	R	K	V	M	A			
skMLCK				K	R	R	W	K	K	N	F	I	A	V	S	A	A	N	R	F	K	K	I	S	S	S	G	A	L
Calcineurin	A	R	K	E	V	I	R	N	K	I	R	A	I	G	K	M	A	R	V	F	S	V	L	R					
Mastoparan						I	N	L	K	A	L	A	A	L	A	K	K	I	L										
smMLCK		A	R	R	K	W	Q	K	T	G	H	A	V	R	A	I	G	R	L	S	S								
Melittin	G	I	G	A	V	L	K	V	L	T	T	G	L	P	A	L	I	S	W	I	K	R	K	R	Q	Q			
CaMK-II		A	R	R	K	L	K	G	A	I	L	T	T	M	L	A	T	R	N	F	S								
							1													14									
IRS-1 (IQ1)		W	Y	Q	A	L	L	Q	L	H	N	R	A	K	A	H	H	D	G	A	G	G							
IRS-1 (IQ2)		K	V	D	T	A	A	Q	T	N	S	R	L	A	P	T	R	L	S	L	G								
Neuromodulin	A	H	K	A	A	T	K	I	Q	A	S	F	R	G	H	I	T	R	K	K	L	K	G	E	K	K	G	D	
Neurogranin	A	N	A	A	A	A	K	I	Q	A	S	F	R	G	H	M	A	R	K	K	I	K	S	G	E	R	G	R	
PhK13	A	N	A	A	A	A	K	I	Q	A	S	F	R	G	H	M	A	R	K	K	I	K	S	G	E	R	G	R	
PhK5	L	R	R	L	I	D	A	Y	A	F	R	I	Y	G	H	W	V	K	K	G	Q	Q	Q	N	R				

Abb. 1.2: Aminosäuresequenzen CaM-bindender Domänen, nach CRIVICI und IKURA (1995), JURADO et al. (1999) und MOORHTY et al. (1999). Die konservierten Aminosäuren sind grau unterlegt. Kursiv geschrieben sind die teilweise konservierten Aminosäuren aus dem IQ-Motiv. Die Zuordnung zu Bindungstypen und -motiven kann Tab. 1.1 entnommen werden. Melittin bindet im Gegensatz zu den anderen Sequenzen parallel an CaM (N-Terminus an N-Terminus). (NOS = Stickoxid Synthase; skMLCK = Myosin-Leichtkettenkinase der Skelettmuskulatur; smMLCK = Myosin-Leichtkettenkinase der glatten Muskulatur; CaMK-II = CaM-Kinase II; IRS-1 = Insulinrezeptor Substrat 1; IQ = IQ-Motiv; PhK = Phosphorylase-b-Kinase).

1.4 Stickoxid-Synthesen

Stickoxid-Synthasen (NO-Synthasen / NOS; EC1.14.13.39) sind NADPH-abhängige Dioxygenasen. Es sind drei Isoformen des Enzyms bekannt: NOS-I oder neuronale NOS (nNOS), NOS-II oder induzierbare NOS (iNOS) und NOS-III oder endotheliale NOS (eNOS). Sie weisen untereinander eine hohe Sequenzhomologie von 51-57 % auf. Ihr Molekulargewicht beträgt 160 kDa (NOS-I), 134 kDa (NOS-III) und 130 kDa (NOS-II). Man kann die Enzymstruktur in zwei Hauptdomänen gliedern, die durch die CaM-Bindungsstelle miteinander verbunden sind: die Oxygenase- und die Reduktasedomäne.

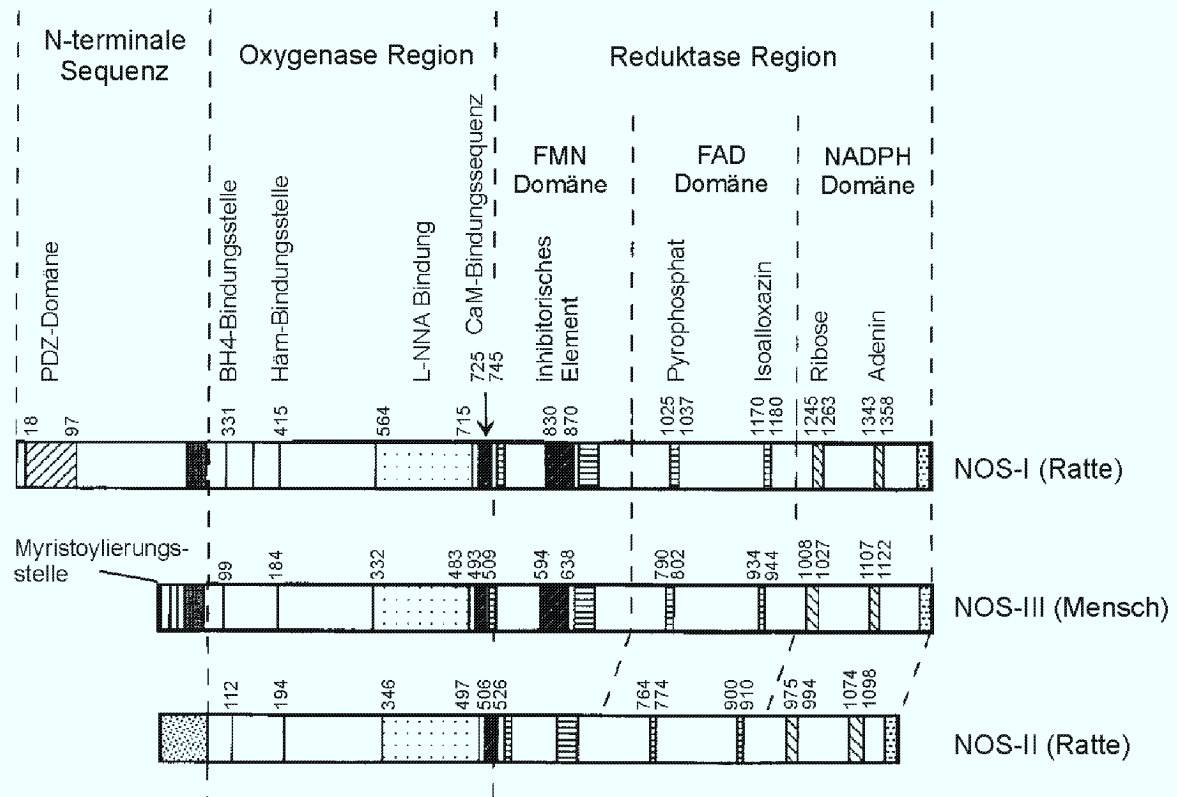


Abb. 1.3: Strukturvergleich der drei NOS-Isoformen, nach HEMMENS und MAYER (1998). Die Struktur der NO-Synthasen kann grob in zwei Domänen gegliedert werden, die durch die CaM-Bindungsstelle miteinander verbunden sind: die N-terminale Oxygenasedomäne und die C-terminale Reduktasedomäne. Die N-terminale Sequenz dient der Lokalisation der Enzyme (NOS-I : PDZ-Domäne, NOS-III : Myristoylierungsstelle). Die Oxygenase Region beinhaltet die Substratbindungsstelle. Dies konnte durch Bindung des inhibitorischen Substratanalogs L-NNA (N ω -nitro-L-Arginin, NISHIMURA et al., 1995) nachgewiesen werden. Außerdem findet sich hier eine Bindungsstelle für Tetrahydrobiopterin (BH₄), sowie eine Häm-Einheit. Die Oxygenase Region ist homolog zum Enzym Cytochrom P₄₅₀. Die Reduktase Region beinhaltet die Bindungsstellen für die essentiellen Cofaktoren NADPH, FAD und FMN und zeigt Homologien zu Cytochrom P₄₅₀ Reduktasen. Bei der NOS-I und NOS-III findet sich hier außerdem ein Einschub in der FMN-Bindungsregion, der als inhibitorisches Element bezeichnet wird (SALERNO et al., 1997) und in der NOS-II fehlt.

Die Oxygenasedomäne liegt N-terminal der CaM-Bindungsstelle (Abb. 1.3). Ihre Oxygenase Region weist eine hohe Homologie zu dem Enzym Cytochrom P₄₅₀ auf. In ihr befinden sich die Bindungsstellen für das Substrat L-Arginin und für Tetrahydrobiopterin, einem Cofaktor. Außerdem befindet sich hier eine Häm-Einheit, die der Katalyse dient. N-terminal der Oxygenase Region liegen Sequenzen, die der subzellulären Lokalisation der NOS-I und NOS-III dienen. Die NOS-I besitzt eine PDZ-Domäne, über die sie mit anderen Proteinen interagieren kann. So bindet die NOS-I z.B. an Syntrophin und PSD 95 (PSD: postsynaptic density protein, BRENNAN et al., 1996). Die PDZ-Domäne dient der Lokalisation des Enzyms

in der Nähe der Plasmamembran. Die NOS-III wird N-terminal mit langkettigen Fettsäuren modifiziert. Es können ein Myristoylrest (BUSCONI und MICHEL, 1993) und ein oder zwei Palmitoylreste (LIU et al., 1995; GARCIA-CARDENA et al., 1996) angehängen werden. Diese verankern das Enzym in der Plasmamembran. Für die NOS-II wurde bisher keine Funktion dieser N-terminalen Sequenz festgestellt.

Die Reduktasedomäne zeigt mindestens 50 % Homologie zu den Cytochrom P₄₅₀ Reduktasen (WANG et al., 1997). Sie beinhaltet die Bindungsstellen für die essentiellen Cofaktoren NADPH, FAD und FMN. Außerdem findet sich in der NOS-I und -III innerhalb der FMN-Bindungsstelle ein sogenanntes inhibitorisches Element (SALERNO et al., 1997). Hierbei handelt es sich um einen Einschub von ca. 45 Aminosäuren Länge, der für die Ca²⁺-Abhängigkeit der beiden Enzyme eine große Rolle spielt (1.4.3).

NOS-I und -II bilden Homodimere aus und sind nur als solche katalytisch aktiv und in der Lage, Tetrahydrobiopterin zu binden (SCHMIDT et al., 1991b; STUEHR et al., 1991). Ausschließlich die Oxygenasedomäne ist für die Dimerisierung der Enzyme ausschlaggebend. Für die NOS-II konnte nachgewiesen werden, daß die Reduktasedomäne des einen Monomers Elektronen auf die Oxygenasedomäne des anderen Monomers überträgt (SIDDHANTA et al., 1998). Auch die NOS-III scheint Homodimere auszubilden, die aber im Gegensatz zu den anderen Isoformen sowohl über die Oxygenase-, als auch die Reduktasedomäne interagieren (LEE et al., 1995) und nicht von der Tetrahydrobiopterinbindung abhängen (RODRIGUEZ-CRESPO et al., 1996).

Tab. 1.2: Zusammenfassung der wichtigsten Merkmale der NO-Synthasen.

	MG (kDa)	Expression	Aktivität	Lokalisation	Vorkommen
NOS-I	160	konstitutiv	Ca ²⁺ -reguliert	PDZ-Domäne	Neuronale Zellen, Skelettmuskelzellen
NOS-II	130	induziert (Cytokine, LPS)	konstitutiv aktiv	cytosolisch	Zellen des Immunsystems, Astrocyten, Zellen des glatten Muskelgewebes, etc.
NOS-III	134	konstitutiv	Ca ²⁺ -reguliert	Myristoylierung, Palmitoylierung	Endotheliale Zellen, Epithelzellen, Cardiomyocyten

(MG = Molekulargewicht; LPS = Lipopolysaccharide)

1.4.1 Katalytischer Mechanismus

Stickoxid-Synthasen synthetisieren NO in einer sequentiellen Oxidation aus L-Arginin. Hierbei wird die terminale Aminogruppe des L-Arginins mit Hilfe von Sauerstoff und NADPH als Reduktionsäquivalent oxidiert (KWON et al., 1990). Dabei werden pro Mol an synthetisiertem NO je 2 Mol Sauerstoff und 1,5 Mol NADPH verbraucht (STUEHR et al., 1991b). Als Zwischenprodukt entsteht N ω -Hydroxyl-L-Arginin und neben NO als Endprodukt L-Citrullin in stöchiometrischen Mengen.

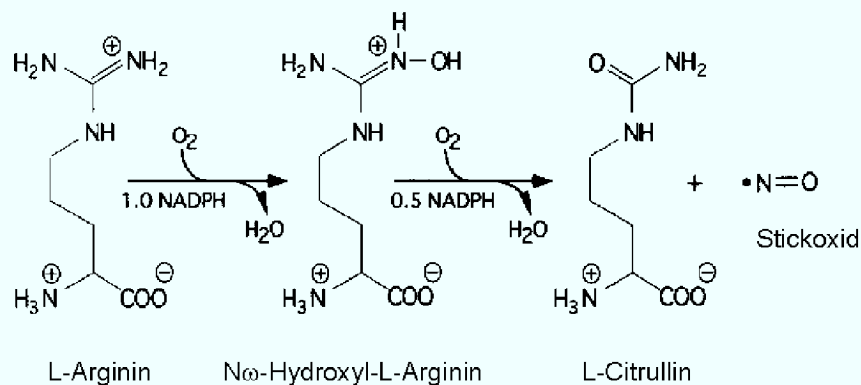


Abb. 1.4: Reaktionsmechanismus der NO-Synthese aus L-Arginin. Es werden pro Mol synthetisiertem NO 2 Mol Sauerstoff und 1,5 Mol NADPH verbraucht (STUEHR et al., 1991b). Nach HEMMENS und MAYER (1998).

Die Übertragung der Elektronen erfolgt nicht direkt von NADPH auf das Substrat. Dazwischen liegt eine Elektronentransportkette, die sich über beide Domänen der NOS erstreckt. Die Elektronen des NADPH werden zunächst auf FAD und dann auf FMN übertragen. Das Flavinmononucleotid überträgt die Elektronen anschließend auf die Häm-Einheit in der Oxygenasedomäne. Das Häm dient als Elektronenakzeptor, als Bindungsstelle für Sauerstoff und ist gleichzeitig an der Substratbindung beteiligt. Auch NO kann an das Häm binden und führt damit zu einer Inhibierung des Enzyms (feedback-Regulation). Weitere Regulationswege sind unter 1.4.3 aufgeführt. Die Rolle des Tetrahydrobiopterins als Cofaktor ist bisher nicht genau bekannt. Es ist für die Aktivität des Enzyms essentiell und spielt eine Rolle bei der Dimerisierung (CRANE et al., 1998; GHOSH et al., 1999).

Eine Übersicht über den katalytischen Mechanismus geben GRIFFITH und STUEHR (1995).

1.4.2 Stickoxid

Stickoxid (NO) ist ein gasförmiges Signalmolekül, das durch Zellmembranen diffundieren kann (GORETSKI und HOLLOCHER, 1988). Seine kurze Lebensdauer ermöglicht nur eine Wirkung auf kurzer Distanz. NO ist ein radikalisches, hochreaktives Gas, das cytotoxisch wirken kann. Trotz, oder eben wegen seiner cytotoxischen Wirkung wird NO in fast allen Bereichen des Körpers zur Signaltransduktion oder Immunabwehr eingesetzt. Beispiele für Gewebe, in denen NO produziert wird, und die dadurch erzielten Wirkungen sind in Tab. 1.3 aufgeführt. Besonders herauszustellen ist hier die gefäßrelaxierende Wirkung (IGNARRO et al., 1987; PALMER et al., 1987), die antithrombotische Wirkung (SNEDDON und VANE, 1988; RADOMSKI et al., 1990) und die Wirkungen im ZNS (BREDT und SNYDER, 1989; GARTHWAITE et al., 1989). Aus diesen und anderen Wirkungen erklärt sich die große medizinische Relevanz des NO. Ein besonders gut untersuchtes Zielprotein des NO ist die lösliche Guanylat-Cyclase (sGC), die durch NO-Bindung an der Häm-Einheit aktiviert wird (IGNARRO et al., 1982).

Tab. 1.3: Produktionsort und Wirkungsweise von NO.

Gewebe	Wirkung
Blutgefäße	Gefäßrelaxation, antithrombotische Wirkung
Herz	Koronarperfusion, negativ inotrope Wirkung
Lunge	Abstimmung von Ventilation und Perfusion, Mukus Sekretion, Immunabwehr
Niere	Tubuloglomerulärer Feedback, Perfusion der Glomeruli, Renin Sekretion
ZNS	Synaptogenese, Gedächtnisbildung, Neuroendokrinsekretion, Signaltransduktion im Sehvorgang und der Olfaktion, Perfusion
Pankreas	Endokrine und exokrine Sekretion
Darmtrakt	Perfusion, Peristaltik, exokrine Sekretion, Aufbau der Schleimhaut, antimikrobielle Wirkung
Immunsystem	Cytotoxische Wirkung auf Tumorzellen, antimikrobielle Wirkung

Verändert nach SCHMIDT und WALTER (1994). Die vielfältigen Funktionen von NO erklären seine große medizinische Relevanz (ZNS = Zentralnervensystem).

1.4.3 Regulation der NO-Synthasen

Sowohl die cytotoxische Wirkung des NO, wie auch seine Rolle in der Signaltransduktion machen eine präzise Regulation der NO-Synthasen unabdingbar. Diese Regulation kann auf zwei Ebenen erfolgen: der Expression des Proteins oder der Enzymaktivität.

Die NOS-II wird hauptsächlich über ihre Expression reguliert, die wiederum durch Cytokine und Lipopolysaccharide induziert wird. Das exprimierte Enzym ist anschließend konstitutiv aktiv. Es konnte inzwischen gezeigt werden, daß es zusätzliche Regulationsmechanismen auf Proteinebene gibt. So wurde in Mausmakrophagen ein Protein (NAP110 = NOS-assoziiertes Protein 110) gefunden, das die Dimerisierung der NOS-II verhindert und sie damit inaktiviert (RATOVITSKI et al., 1999).

Die beiden NOS-Isoformen I und III werden konstitutiv exprimiert. Für die NOS-III konnte gezeigt werden, daß externe Stimuli das Expressionsniveau modifizieren können (TEICHERT et al., 1998). Hauptsächlich werden diese Isoformen aber durch Proteininteraktionen reguliert. Eine Modulation der NOS-III-Aktivität erfolgt zum Beispiel durch Phosphorylierung (DIMMELER et al., 1999), Bindung von NOSIP (eNOS interacting protein, DEDIO et al., 2001), Hsp90 (heat shock protein 90, GARCIA-CARDENA et al., 1998) und Caveolin (MICHEL et al., 1997). Die Lokalisation der NOS-I über seine PDZ-Domäne kann durch das Protein CAPON (carboxy-terminal PDZ ligand of nNOS, JAFFREY et al., 1998) reguliert werden. Außerdem wird die Aktivität durch Hsp90 (SONG et al., 2001) und PIN (protein inhibitor of nNOS, JARRFEY und SNYDER, 1996) moduliert.

Regulation über den Ca^{2+} -Spiegel der Zelle

Die Hauptregulation der beiden konstitutiv exprimierten NOS erfolgt über den Ca^{2+} -Spiegel der Zelle. NOS-I und NOS-III sind nur aktiv, wenn sie Ca^{2+} /CaM gebunden haben. Die Bindung von Ca^{2+} /CaM bewirkt eine Konformationsänderung im Enzym, wodurch sich Oxygenase- und Reduktasedomäne annähern. Erst in dieser Konformation können die Elektronen vom FMN in der Reduktasedomäne auf das Häm in der Oxygenasedomäne übertragen werden (Abb. 1.5 A) (ABU-SOUD und STUEHR, 1993).

Im Gegensatz zu den beiden konstitutiv exprimierten NOS bleibt CaM an der NOS-II in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} gebunden. Diese Isoform ist damit unabhängig vom Ca^{2+} -Spiegel der Zelle aktiv (Abb. 1.5 B).

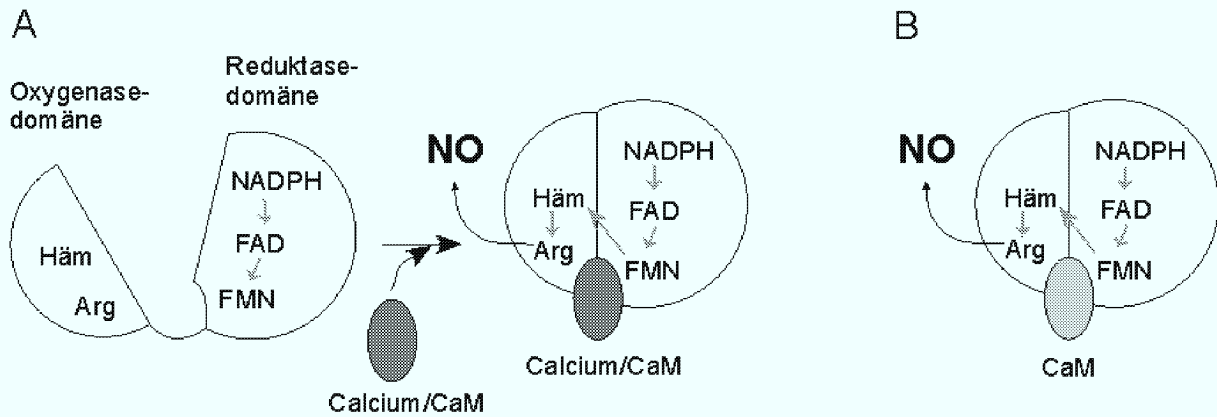


Abb. 1.5: **A** Aktivierung der NOS-I und -III durch Ca^{2+} /CaM-Bindung. Die grauen Pfeile symbolisieren den Elektronenfluß. Dieser endet in CaM-freier NOS-I und -III in der Reduktasedomäne. In dieser offenen Konformation können die Elektronen zur Reduktion anderer Substrate wie z.B. Cytochrom c verwendet werden. Durch Bindung von Ca^{2+} /CaM wird der Elektronenfluß geschlossen und NO kann synthetisiert werden. **B** In der NOS-II bleibt CaM unabhängig vom Ca^{2+} -Spiegel der Zelle gebunden. Das Enzym ist damit konstitutiv aktiv. In dieser Darstellung bleiben andere Regulationswege sowie die notwendige Dimerisierung der NOS unberücksichtigt.

Die unterschiedliche CaM-Bindung der NOS-Isoformen wird zum einen auf die CaM-Bindungsstelle der Enzyme zurückgeführt (1.4.4). Zum anderen gibt es zahlreiche Hinweise darauf, daß noch weitere Regionen der NOS-I und -III zu ihrer Ca^{2+} -Abhängigkeit beitragen. So konnte ein inhibitorisches Element in der FMN-Bindungsdomäne von NOS-I (AS 830-870, SALERNO et al., 1997; DAFF et al., 1999) und NOS-III (AS 594-638, SALERNO et al., 1997; NISHIDA und ORTIZ DE MONTELLANO, 1999) identifiziert werden (Abb. 1.3). Die Wirkung dieses inhibitorischen Einschubs ist in Abb. 1.6 schematisch dargestellt. Die Sequenz fehlt komplett in der NOS-II.

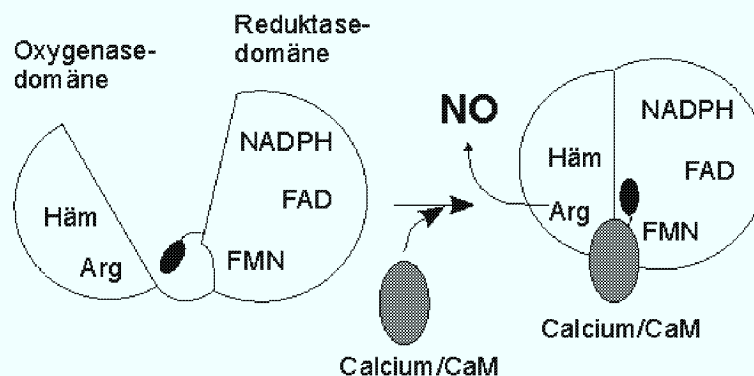
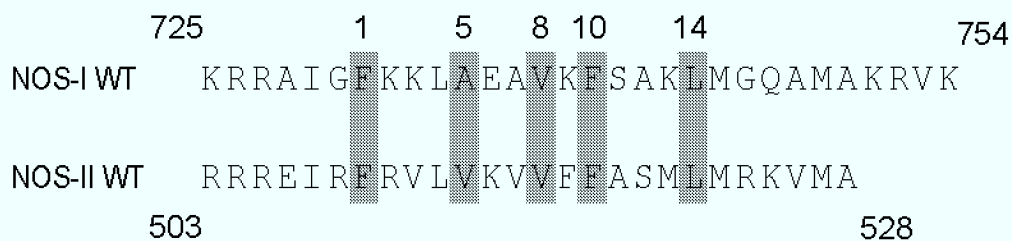


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der NOS-I- und -III-Inhibition durch das inhibitorische Element (schwarz). Das Element erschwert eine CaM-Bindung und wird durch $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ verdrängt (SALERNO et al., 1997). Es scheint zumindest in der NOS-III die Ca^{2+} -Abhängigkeit des Enzyms zu beeinflussen und die Gesamtaktivität der NOS-III herunterzusetzen (NISHIDA und ORTIZ DE MONTELLANO, 1999).

1.4.4 CaM-Bindungsstelle der NOS-I und -II

Anhand der Merkmale von CaM-Bindungsstellen (1.3.2) kann nach solchen in Proteinen gesucht werden. Auf diesem Wege wurden für die NOS-I und -II potentielle CaM-Bindungsstellen mit amphipathischem Charakter und konservierten hydrophoben Aminosäureresten gefunden. Sie befanden sich für die NOS-I aus der Ratte im Bereich von AS 725-754 und für die NOS-II aus Mausmakrophagen im Bereich von AS 499-532. Für beide Sequenzbereiche konnte mit Hilfe von Peptidstudien eine CaM-Bindung gezeigt werden (VORHERR et al., 1993; ZHANG und VOGEL, 1994; ANAGLI et al., 1995; STEVENS-TRUSS und MARLETTA, 1995; WATANABE et al., 1997). Für die NOS-I-CaM-Bindungsstelle konnte in Kompetitionsstudien eine Bindung an Ca^{2+} /CaM mit einer Affinität von 2,2 nM (ZHANG und VOGEL, 1994) nachgewiesen werden. Für die NOS-II-CaM-Bindungsstelle wurde anhand von fluoreszenzspektroskopischen Messungen eine Bindung an dansyliertes CaM mit einer subnanomolaren Affinität festgestellt (ANAGLI et al., 1995). Eine N- bzw. C-terminale Begrenzung der Bindungsstellen ist nicht ohne weiteres festzulegen. Die Studien zeigten allerdings, daß diese Sequenzbereiche für die CaM-Bindung ausreichen.

Beide Bindungsstellen tragen ein klassisches Ca^{2+} /CaM-Bindungsmotiv des Typen 1-8-14 B (1.3.2). Die Kriterien für ein 1-5-10 Bindungsmotiv treffen aber ebenfalls zu. In Abb. 1.7 sind die beiden Bindungssequenzen dargestellt. Die konservierten hydrophoben Aminosäurereste sind grau hinterlegt.



man drei hydrophobe Reste (Valin 511, Phenylalanin 517 und Methionin 521) und eine positive Aminosäure (Lysin 514). Die Positionen sind in Abb. 1.8 A gekennzeichnet. Es ergibt sich für die NOS-I-CaM-Bindungsstelle ein stärkerer amphipathischer Charakter als für die der NOS-II, wobei letzter stärker hydrophob ist. Dies kann in einem SCHIFFER-EDMUNDSON-Diagramm graphisch dargestellt werden (Abb. 1.8 B). Für die NOS-I-CaM-Bindungsstelle ergibt sich hier eine klare Trennung zwischen geladenen und hydrophoben Aminosäuren. In der CaM-Bindungsstelle der NOS-II ist die Trennung weniger deutlich und damit der amphipathische Charakter weniger ausgeprägt. Der amphipathische Charakter der Helices ist in Abb. 1.8 B durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet.

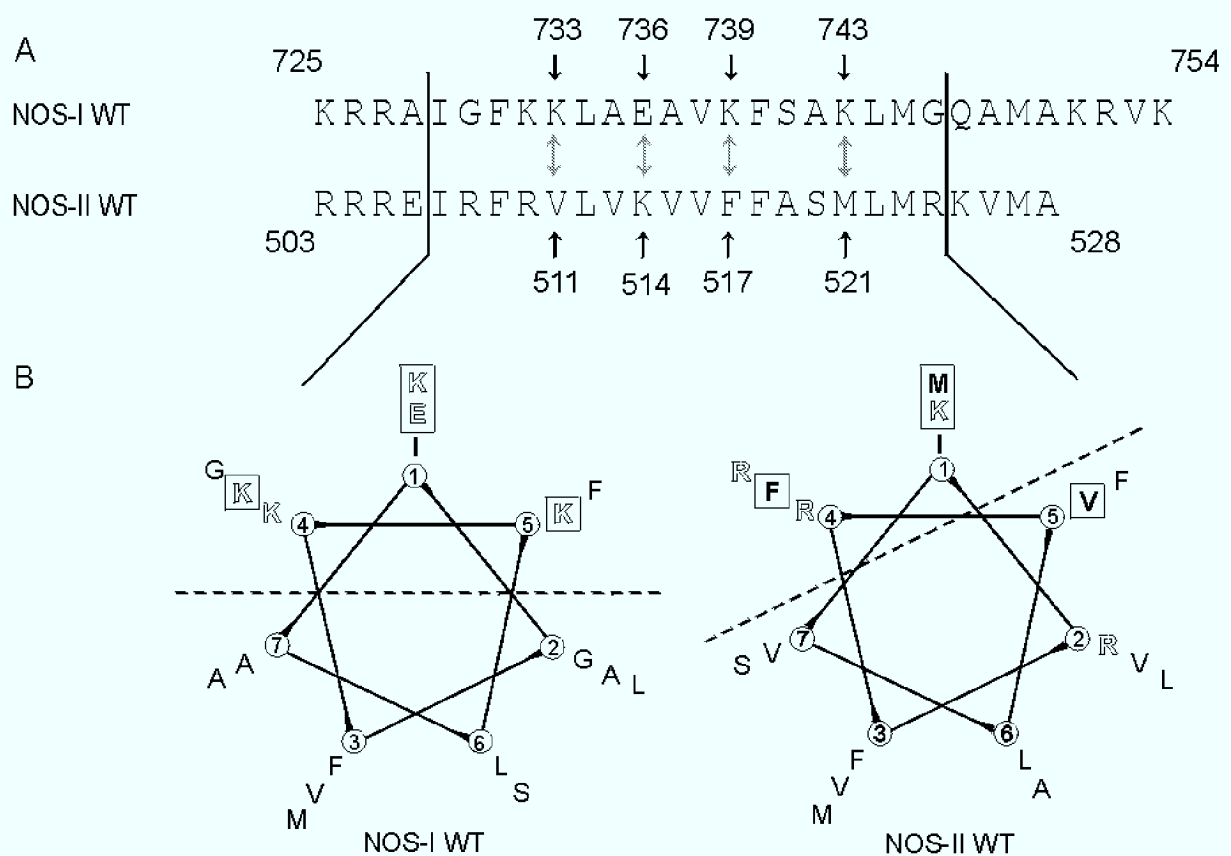


Abb. 1.8: **A** Darstellung der nicht konservativen Aminosäureaustausche in den CaM-Bindungssequenzen der NOS-I und NOS-II. Es sind die CaM-Bindungssequenzen der NOS-I aus der Ratte und der NOS-II aus Mausmakrophagen dargestellt. Die schwarzen Pfeile markieren die jeweilige Position in der Aminosäuresequenz. Die grauen Pfeile weisen auf den Austausch hin. **B** α -helikale Projektion der in A gekennzeichneten Region aus den CaM-Bindungsstellen im SCHIFFER-EDMUNDSON-Diagramm (SCHIFFER und EDMUNDSON, 1967). Geladene Aminosäuren sind durch offene Buchstaben dargestellt. Die nicht konservativen Aminosäureaustausche sind umrandet. Der amphipathische Charakter der Peptide ist durch die gestrichelte Linie hervorgehoben.

Obwohl in beiden NOS-Isoformen ein klassisches Ca^{2+} /CaM-Bindungsmotiv gefunden wurde, werden sie doch unterschiedlich durch Ca^{2+} reguliert. Die NOS-I bindet ausschließlich an Ca^{2+} /CaM und ist auch nur in Anwesenheit von Ca^{2+} aktiv. Dagegen bindet die NOS-II auch in Abwesenheit von Ca^{2+} an CaM. Ob diese Isoform auch in völliger Abwesenheit von Ca^{2+} aktiv ist, ist umstritten. Es konnte aber gezeigt werden, daß die NOS-II bei sehr niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen unterhalb von 30 nM aktiviert wird (CHO et al., 1992) und daß das Enzym durch EGTA nur zu 30 % inhibiert wird (STEVEN-TRUSS und MARLETTA, 1995).

Wodurch kommt die unterschiedliche Regulation der beiden Isoformen zustande? Besonders die nahezu irreversible, Ca^{2+} -unabhängige CaM-Bindung der NOS-II ist insofern verwunderlich, da sich die Bindungsstellen von NOS-I und NOS-II im wesentlichen nur durch die vier nicht konservativen Aminosäureaustausche unterscheiden. Es könnte daher sein, daß andere Domänen in der NOS-II an der Ca^{2+} -unabhängigen, extrem hochaffinen Bindung von CaM beteiligt sind. So konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, daß zur Ca^{2+} -unabhängigen Aktivierung der NOS-II noch zusätzliche Bereiche innerhalb der C-terminalen Domäne des Enzyms nötig sind (RUAN et al., 1996; VENEMA et al., 1996). Außerdem scheint das Fehlen einer inhibitorischen Domäne in der NOS-II die Ca^{2+} -Unabhängigkeit der CaM-Bindung zu begünstigen (1.4.3). Aktivitätsstudien lassen jedoch keine Rückschlüsse auf die CaM-Bindung zu. Daher wurden Versuche mit Peptiden der NOS-I- und NOS-II-Bindungsstellen unternommen.

ANAGLI et al. (1995) konnten durch Experimente mit dansyliertem CaM für Peptide der NOS-II-CaM-Bindungsstelle eine subnanomolare Affinität zu CaM nur in Anwesenheit von Ca^{2+} messen. In Abwesenheit von Ca^{2+} wurden Affinitäten von 45 bzw. 85 nM bestimmt. Dagegen zeigten ZOCHÉ et al. (1996) mit Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR)-Studien eine Ca^{2+} -unabhängige und nahezu irreversible CaM-Bindung für ein solches Peptid. Für ein Peptid der NOS-I-Bindungsstelle wurde mit der gleichen Methode völlige Ca^{2+} -Abhängigkeit und Reversibilität der CaM-Bindung gezeigt.

Nach den von ZOCHÉ et al. (1996) ermittelten Ergebnissen scheint der Unterschied in der CaM-Bindung beider NOS-Isoformen durch die Aminosäuresequenz der Bindungsregion determiniert zu sein. Hier stellt sich nun die Frage, in welchen Aminosäuren sich dieses unterschiedliche Verhalten manifestiert. Dabei kommen zunächst vier Positionen in Betracht: die vier nicht konservativen Aminosäureaustausche an den Positionen 3, 6, 9 und 13 des CaM-Bindungsmotives. MONTIGIANI et al. (1996) konnten für die CaM-Bindungsstelle der skMLCK zeigen, daß der Austausch einzelner Aminosäuren gegen Alanin zu einer Steigerung

der CaM-Affinität führte. Es stellt sich daher die Frage, ob die hohe Affinität der NOS-II zu CaM in den vier nicht konservativen Aminosäureaustauschen begründet liegt.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Um zu überprüfen, ob diese vier kritischen Aminosäurereste die CaM-Bindung beeinflussen, wurden 10 Peptide synthetisiert, die Mutationen an den oben genannten Positionen trugen (Abb. 3.1). Dabei wurden die Aminosäuren der NOS-II-Bindungsstelle einzeln und in Gruppen gegen die Aminosäuren der NOS-I-Bindungsstelle ausgetauscht. Ebenso erfolgte ein Austausch der Aminosäurereste aus der NOS-I gegen die aus der NOS-II.

Diese synthetischen Peptide sollen daraufhin untersucht werden:

- ob sie CaM binden und wenn ja
- ob die Bindung Ca^{2+} -abhängig erfolgt,
- wie reversibel die Bindung ist,
- wie ihre Affinität zu CaM ist.

Die CaM-Bindung der Peptide sollte qualitativ in Gelshiftexperimenten überprüft und das Bindungsverhalten der Peptide anschließend in Bindungsstudien analysiert werden. Zur Untersuchung der Bindungskinetik sollte die Peptid-CaM-Bindung in Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Studien analysiert werden. Die Thermodynamik der Bindung sollte mit der Methode der isothermen Titrationskalorimetrie untersucht werden. Mit beiden Methoden können die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Bindung und die Affinität der Peptide zu CaM bestimmt werden.

Die aus den Peptidstudien gewonnenen Ergebnisse sollten durch heterologe Expression beider Isoformen und entsprechender Mutanten überprüft werden. Insbesondere sollte die Enzymaktivität der NOS-Mutanten gemessen und die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Aktivitäten getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Materialien

Chemikalien

Acrylamidlösung (30 %)	Roth
Amidoschwarz 10B	Merck
APS	Merck
BCA Protein-Assay Reagent Kit	Pierce
Bovine Serum Albumin (BSA Standard)	Bio Rad
Bradford Reagenz	Bio Rad
CaM-Antikörper, polyklonal <i>CaM I (FL-149)</i>	Santa Cruz Biotechnology
ECL-System	Amersham
Kaninchen-IgG-Antikörper	Amersham
L-NAME (L- ω -Nitro-L-Arginin Methyl Ester)	Sigma
L-NNA (L- ω -Nitro-L-Arginin)	Sigma
L-NIL (L-N ⁶ -(1-Iminoethyl) Lysin)	Alexis
Lactat-Dehydrogenase aus Kaninchen-Muskel (1100 U/mg bei 37 °C mit Pyruvat als Substrat)	Boehringer
Magermilchpulver (Glücksklee)	Nestlé
Molekulargewichtstandards (HMW/LMW)	Pharmacia
NADPH	Biomol
Nitrat Reduktase (<i>Aspergillus species</i>) (10 U/ml) (1U reduziert 1 μ mol Nitrat/min bei 25°C und pH 7,5)	Boehringer
NOS-I-Antikörper, polyklonal (α NOS-Ip) <i>NOS1(K-20)</i>	Santa Cruz Biotechnology
NOS-I rekombinant (Ratte, neuronale NOS)	Calbiochem
NOS-II-Antikörper, polyklonal (α NOS-IIp) <i>NOS2(H-174)</i>	Santa Cruz Biotechnology
NOS-II gereinigt (Mausmakrophagen, induzierbare NOS)	Alexis
RNase Mix	Ambion
Rapid Gel XL (4,6% (w/v) Acrylamid)	Amersham
S-ETU (S-Ethylisothioharnstoff)	Sigma
TCEP	Pierce
Total nitric oxide assay	R&D Systems
Tritium markiertes L-Arginin	Amersham

Die Chemikalien für die Zellkultur stammten von GIBCO BLR. Die Restriktionsendonucleasen und die dazugehörigen Puffer wurden von Boehringer Mannheim oder NEB geliefert. Die restlichen Chemikalien stammten von Sigma. Es wurde für alle Ansätze bidestilliertes Wasser (H₂O bid.) verwendet.

Geräte und Materialien

Äkta FPLC System	Amersham Pharmacia Biotech
Benchmark Microplate Reader	BioRad
BIAcore SPR-System 1000	BIAcore
DNA-Synthesegerät: Synthesizer 391	Applied Biosystems
Fastblotkammer B33	Biometra
Kodak Image Station 440CF	Kodak Digital Science
LICor DNA Sequencer Long ReadIR 4200	MWG Biotech
Membranfilter 0,22 µm	Millipore
Minigelkammer	Biometra
Immobilon P Membran	Millipore
Speed Vac plus SC110A	Savant
Geltrockner 583	BioRad
PCR-Maschine: TRIO Thermoblock	Biometria
Sonifer B-12	Branson Sonic Power Company
Spektralphotometer U-1100	Hitachi
Spektralphotometer Ultrospec 3000	Pharmacia
Superdex Peptid HR10/30 Säule	Amersham Pharmacia Biotech
Thermomixer 5436	Eppendorf
VP-ITC Microcalorimeter	MicroCal Incorporated
Microcon MWCO 10K	Millipore

Zentrifugen:

Beckmann L7-65 Ultrazentrifuge
 Beckmann TL-100 Ultrazentrifuge
 Eppendorf 5415 C Tischzentrifuge
 Sigma 2K15

2.2 Peptide

Bei den verwendeten synthetischen Peptiden handelte es sich entweder um die Wildtyp-CaM-Bindungsstelle der NOS-I aus der Ratte (ZHANG und VOGEL, 1994) und der NOS-II aus Mausemakrophagen (ANAGLI et al., 1995) oder um Punktmutanten beider Bindungsstellen. Zusätzlich wurde ein Peptid der humanen hepatischen NOS-II-CaM-Bindungsstelle (hhNOS-II WT) synthetisiert (in Anlehnung an MATSUBARA et al., 1997). Von allen Peptiden außer dem letztgenannten gab es zusätzlich eine modifizierte Version mit N-terminalem Cystein. MmNOS-II WT und hhNOS-II WT wurden auch in einer N-terminal biotinylierten Variante hergestellt. Die Peptide wurden freundlicherweise von Dr. M. Beyermann (FMP, Berlin) zur Verfügung gestellt. Eine genaue Beschreibung der Peptidsynthese findet sich bei ZOCHÉ et al. (1996). In Tab. 2.1 sind die wichtigsten Merkmale der Peptide zusammengefaßt:

Tab. 2.1: Kurzbeschreibung der verwendeten Peptide.

Peptid	MG (Da)	Nettoladung	Beschreibung
NOS-I WT	3448,31	+ 9	AS 725-754 der CaM-Bindungsstelle der NOS-I*; Wildtyp
NOS-I VKF	3454,4	+ 9	AS 725-754 der CaM-Bindungsstelle der NOS-I; Mutationen: K733V, E736K, K739F
NOS-I VFM	3441,31	+ 5	AS 725-754 der CaM-Bindungsstelle der NOS-I; Mutationen: K733V, K739F, K743M
NOS-I VKFM	3457,4	+ 6	AS 725-754 der CaM-Bindungsstelle der NOS-I; Mutationen: K733V, E736K, K739F, K743M
NOS-I E736K	3464,4	+ 11	AS 725-754 der CaM-Bindungsstelle der NOS-I; Einzelmutation: E736K
mmNOS-II WT	3342,3	+ 7	AS 503-528 der CaM-Bindungsstelle der Mausemakrophagen NOS-II*; Wildtyp
hhNOS-II WT	3271,5	+ 6	AS 509 – 534 der CaM-Bindungsstelle der humanen hepatischen NOS-II***; Wildtyp
NOS-II 3K	3322,25	+ 11	AS 503-528 der CaM-Bindungsstelle der mmNOS-II; Mutationen: V511K, F517K, M521K
NOS-II E3K	3350,2	+ 8	AS 503-528 der CaM-Bindungsstelle der mmNOS-II; Mutationen: V511K, K514E, F517K, M521K
NOS-II V511K	3354,29	+ 9	AS 503-528 der CaM-Bindungsstelle der mmNOS-II; Einzelmutation V511K
NOS-II K514E	3343,2	+ 5	AS 503-528 der CaM-Bindungsstelle der mmNOS-II; Einzelmutation K514E
NOS-II F517K	3306,25	+ 9	AS 503-528 der CaM-Bindungsstelle der mmNOS-II; Einzelmutation F517K
NOS-II M521K	3322,22	+ 9	AS 503-528 der CaM-Bindungsstelle der mmNOS-II; Einzelmutation M521K

Nachweis der CaM-Bindung: *ZHANG und VOGEL, 1994; **ANAGLI et al., 1995; ***MATSUBARA et al., 1997. Die NOS-II-Mutanten entsprechen der mmNOS-II-Sequenz.

2.2.1 Herstellung der Peptidlösungen

Die Peptide lagen als Lyophilisate vor. Die eingewogene Peptidmenge wurde in H₂O bid. gelöst und vor der Konzentrationsbestimmung für mindestens 1 h geschüttelt (ca. 10.000 Upm). Es wurden 1-6 mM Stocklösungen hergestellt und diese bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Peptidlösungen bei $\lambda = 205$ nm

Peptidbindungen zeigen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 205 nm. Dadurch ist eine Konzentrationsbestimmung von Peptidlösungen im Spektralphotometer nach folgender Formel möglich (STOSCHECK, 1990):

$$c(\text{mg} / \text{ml}) = \frac{A_{205}}{31 \cdot b}$$

c = Konzentration des Peptides; A_{205} = gemessene Absorption bei 205 nm; b = Lichtweg in der Küvette (cm).

Die Proben wurden in 1000-facher Verdünnung im Spektralphotometer bei $\lambda = 205$ nm in Quarzküvetten gemessen.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Peptiden mit N-terminalem Cystein

Mit Hilfe des Ellman-Reagenzes (5,5'-dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure), DTNB) lassen sich freie Sulfhydrylgruppen in Proteinen quantifizieren (CHAN, 1968). Das Reagenz reagiert mit freien Thiolgruppen stöchiometrisch zu 5-thio-2-Nitrobenzoesäure (NTB), die ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 412 nm hat (Abb. 2.1). Da die N-terminal modifizierten Peptide jeweils nur ein Cystein tragen, kann direkt von der Menge an freien Sulfhydrylgruppen auf die Peptidkonzentration geschlossen werden.

Es wurden jeweils 250 μ l einer 10-fach in Natriumphosphatpuffer verdünnten Peptidlösung eingesetzt und mit 50 μ l Ellman-Reagenz (4 mg/ml 5,5'-dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure) in Natriumphosphatpuffer gelöst) und 2,5 ml Natriumphosphatpuffer versetzt. Der Ansatz wurde für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde je 1 ml Reaktionsansatz in Plastikkuvetten bei einer Wellenlänge von 412 nm im Spektralphotometer vermessen. Mit einer 1,5 mM Cystein-Stocklösung wurde eine Kalibriergerade erstellt. Bei älteren Peptidlösungen wurde vor der Reaktion noch eine Reduktion der Cysteingruppen mit TCEP-HCl durchgeführt (2.2.4).

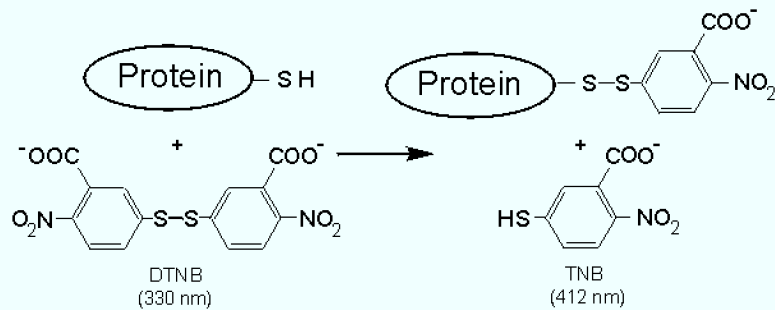


Abb. 2.1: Reaktion des Ellman-Reagenz (DTNB) mit freien Cysteingruppen. Das Produkt TNB ist spektralphotometrisch bei $\lambda = 412 \text{ nm}$ nachweisbar.

Natriumphosphatpuffer:

Lösung A = 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; Lösung B = 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

Für einen 0,1 M Phosphatpuffer pH 8,0 wurden 5,3 ml Lösung A mit 94,7 ml Lösung B gemischt und auf 200 ml mit H_2O bid. aufgefüllt.

2.2.4 Reduktion von Peptiden mit N-terminalem Cysteinrest

Nicht frisch hergestellte Peptidlösungen wurden vor der Verwendung reduziert. Dies erfolgte mit Tris(2-carboxyethyl)phosphin-Hydrochlorid (TCEP-HCl der Firma Pierce) nach folgendem Reaktionsschema (Abb.2.2):

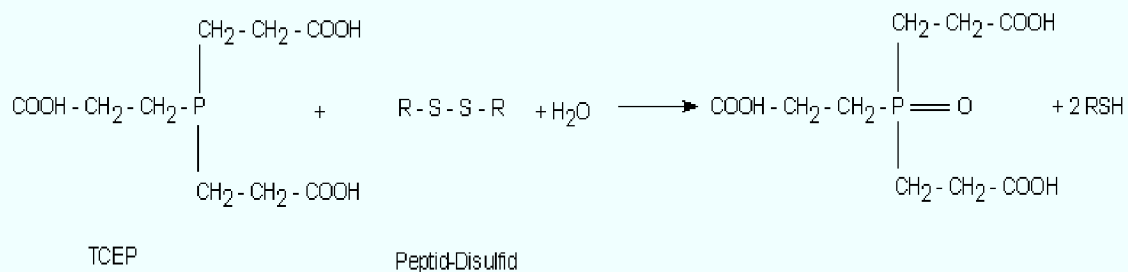


Abb. 2.2: Reaktionsschema der TCEP-Reduktion von Disulfidbrücken.

TCEP-HCL wurde in H_2O bid. in einer Konzentration von 3,8 mM gelöst. Die Lösung wurde im 3-fachen molaren Überschuß zu 5-20 μl der Peptidlösung gegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung im Vakuumrotationsverdampfer lyophilisiert. Die Lyophilisate wurden bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Mit H_2O bid. wurde anschließend wieder eine Peptidlösung der Ausgangskonzentration hergestellt.

2.2.5 Herstellung von CaM-Lösungen

CaM wurde als Lyophilisat von Sigma bezogen. Das Lyophilisat wurde in H₂O bid. resuspendiert (ca. 2 mg/ml). Je nach Präparation erwies sich das CaM als mehr oder weniger gut löslich. In allen Fällen wurde eine Konzentrationsbestimmung der Lösung nach BRADFORD durchgeführt (2.2.6). Bei schlecht löslichem CaM wurde die Konzentration zusätzlich über den BCA-Assay bestimmt (2.2.7).

2.2.6 Konzentrationsbestimmung nach BRADFORD

Die Konzentrationsbestimmung von CaM-Lösungen erfolgte nach der Methode von BRADFORD (1976). Der Meßbereich der Methode erstreckt sich von ca. 2 bis 15 µg/ml Protein. Die Lösung wurde entsprechend verdünnt eingesetzt und mit H₂O bid. auf 800 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 200 µl BRADFORD-Reagenz wurden die Proben für 5 min bei RT inkubiert und anschließend im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Als Blindwert wurden 800 µl H₂O bid. mit 200 µl BRADFORD-Reagenz versetzt und gemessen. Eine interne Kalibrierungsgerade wurde für CaM hergestellt, wofür die CaM-Konzentration über den molaren Extinktionskoeffizienten von CaM bei $\lambda = 277 \text{ nm}$ ($\epsilon = 3006 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) genau eingestellt wurde.

2.2.7 Konzentrationsbestimmung mit dem BCA-Assay

Eine weitere Methode der Proteinbestimmung ist der BCA-Assay. Es wurde das „BCA Protein Assay Reagent Kit“ von Pierce verwendet. Dieses Kit enthält ein Reagenz mit Bicinchoninsäure und eines mit Kupfersulfat. Beide werden im Verhältnis 50:1 gemischt. Die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} (Biuret-Reaktion) führt zu einem Bicinchoninsäure-Kupfer-Komplex, den man spektralphotometrisch bei $\lambda = 562 \text{ nm}$ nachweisen kann (SMITH et al., 1985). Die Proben wurden auf eine Konzentration von ca. 20 bis 40 µM ($\cong$ 60 bis 140 µg/ml) verdünnt. 50 µl der verdünnten Proben wurden mit 1 ml der Reagenzmischung versetzt und für 30 min bei 60°C inkubiert. Die abgekühlten Proben wurden bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Eine Kalibriergerade ist mit steigenden BSA (Rinderserumalbumin)-Konzentrationen von 0 bis 12 µg/ml erstellt worden.

CaM-Peptid-Interaktionsstudien

2.3.1 Puffer

Folgende Puffer wurden für die Interaktionsstudien verwendet:

<u>Ca²⁺-Puffer</u>	<u>EGTA-Puffer</u>
10 mM HEPES pH 7,4	10 mM HEPES pH 7,4
150 mM NaCl	150 mM NaCl
10 mM MgCl ₂	2 mM MgCl ₂
3 mM CaCl ₂	10 mM EGTA
2 mM EGTA	0,005 % Tween 20
0,005 % Tween 20	

Sie wurden vor der Verwendung durch einen 0,22 µm Filter entgast und bei 4°C gelagert.

2.3.2 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die isotherme Titrationskalorimetrie kann zur Charakterisierung von Analyt-Ligand-Wechselwirkungen genutzt werden (DOYLE, 1997). Bindet der Analyt an den Liganden, so wird entweder Wärme frei gesetzt oder Wärme absorbiert, je nach dem ob es sich um eine exotherme oder eine endotherme Reaktion handelt. Das isotherme Titrationskalorimeter (ITC) besitzt eine Reaktionszelle (oder Meßzelle) und eine Referenzzelle, die auf gleicher Temperatur gehalten werden. Ändert sich in der Meßzelle die Temperatur, so ändert das ITC die zugeführte Energiemenge bis die Temperaturdifferenz wieder ausgeglichen ist. Die zugeführte Energiemenge wird in µcal/sec aufgezeichnet. Der Ligand wird in der Meßzelle in wäßriger Lösung vorgelegt und die Referenzzelle enthält ebenfalls eine wäßrige Lösung. Der Analyt wird mit Hilfe einer rotierenden Mikroinjektionsspritze wiederholt in die Meßzelle injiziert. Die Mischungswärme kann mittels Pufferinjektionen ohne Analyten bzw. ohne Liganden bestimmt und gegebenenfalls von den Meßwerten abgezogen werden. Ein ITC-Gerät wurde mir freundlicherweise von Prof. Schomburg (Institut für Biochemie, Universität zu Köln) und längerfristig von Prof. Bott (IBT-1, Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt. Das Volumen der Zellen betrug 1,3985 ml und die Zellen waren auf 25°C temperiert. Als Referenzflüssigkeit diente H₂O bid. Der Ligand wurde in einer Konzentration von 8 µM in Ca²⁺- oder EGTA-Puffer (2.3.1) vorgelegt. Der Analyt lag in einer Konzentration von 200 µM in der Spritze vor, die ein Füllvolumen von 250 µl hatte. Es wurde in Schritten von 0,5 bzw. 1 nmol mit einem zeitlichen Abstand von jeweils 240 bzw. 400 sec titriert. Meist

handelte es sich bei dem Liganden um CaM und bei dem Analyten um das jeweilige Peptid. Messungen in der anderen Konfiguration wurden nur vereinzelt durchgeführt.

Datenanalyse

Die Injektionen führten zu Pulsen von Wärmeänderungen über die Zeit ($\mu\text{cal/sec}$). Die Zeitintervalle zwischen den einzelnen Injektionen wurde von 240 auf 400 sec verlängert, da das Signal in dem kürzeren Zeitrahmen die Basislinie nicht wieder erreichte. Die Datenanalyse erfolgte mit dem Programm Microcal Origin Version 5.0. Das Programm berechnet die Bindungsenthalpie pro Injektion (in kcal/mol). Trägt man diese gegen das molare Verhältnis Analyt/Ligand auf, so erhält man eine S-förmige Kurve, die zum Ende der Titration eine Sättigung erreicht (Abb. 2.3 B).

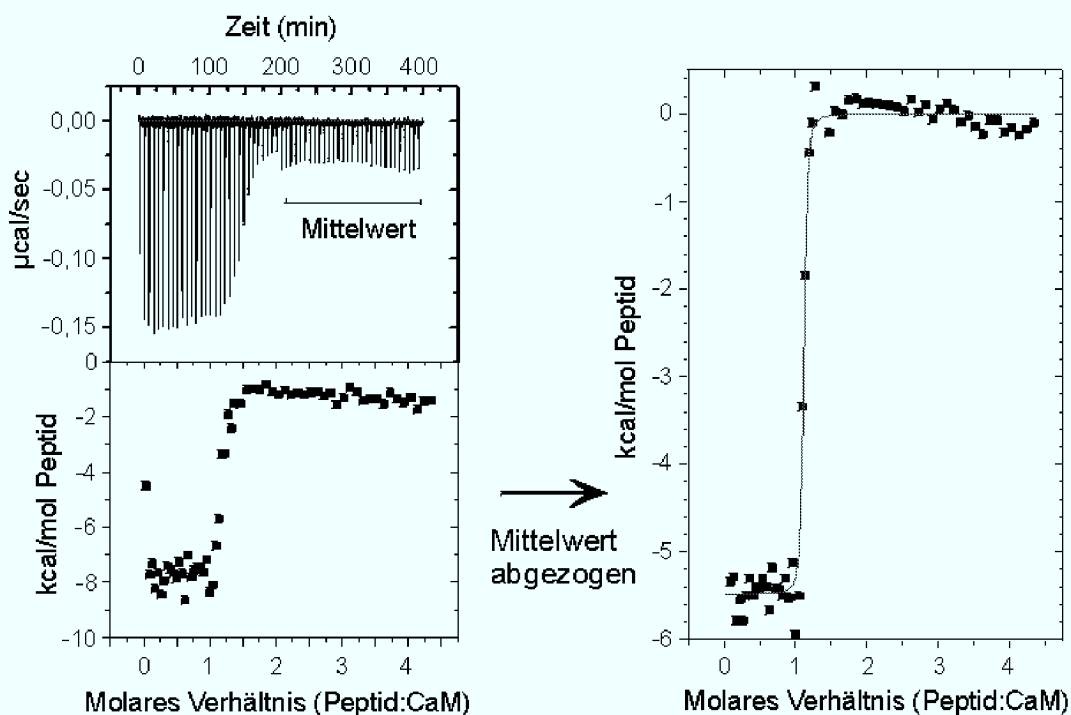


Abb. 2.3: Beispiel für die Auswertung der ITC-Messungen. Die Messung wurde mit dem Peptid NOS-I VKFM in Ca^{2+} -Puffer durchgeführt. Links oben sind die Rohdaten gezeigt. Aus den letzten 27 Injektionen wurde ein Mittelwert berechnet und dieser von den Rohdaten abgezogen. Die auf ± 0 kcal/mol Peptid normierten Daten mit der dazugehörigen Kurvenanpassung sind rechts dargestellt. Die erste Injektion wurde nicht in die Auswertung einbezogen.

Zur Auswertung der Messungen werden Daten benötigt, die in der Sättigung auf ± 0 $\mu\text{cal/sec}$ bzw. ± 0 kcal/mol Peptid auslaufen. Daher wurde mit Hilfe der Kontrollmessungen überprüft, ob die Mischungswärme ungefähr der Signalgröße in der Sättigung entsprach. Dann wurden die Signale in der Sättigung gemittelt und der gemittelte Wert von den gesamten Meßdaten

abgezogen. Damit wurde die Messung auf $\pm 0 \mu\text{cal/sec}$ normiert, ohne daß Schwankungen in den Kontrollmessungen die Daten verändert hätten. Ein Beispiel dafür ist in Abb. 2.4 für das Peptid NOS-I VKFM in Ca^{2+} -Puffer gezeigt. Die erste Injektion fällt in jeder Messung kleiner aus als die folgenden Injektionen (mündliche Mitteilung AG Prof. Bott und eigene Beobachtung). Sie wurde daher nicht in die Auswertung einbezogen.

Eine Kurve wurde mit der Auswertungsroutine für eine Bindungsstelle nach Gleichung (2) an die Meßdaten angepaßt (Microcal Origin Manual; WISEMAN et al., 1989; FISHER und SINGH, 1995). Hierzu wurden manuell oder automatisch Annahmen für die Werte ΔH (Bindungsenthalpie), K_A (Bindungskonstante) und n (Anzahl der Bindungsstellen) gemacht und diese nach dem Marquardt Algorithmus angepaßt, bis sich keine signifikante Verbesserung mehr ergab.

Die Volumenänderung pro Injektion ging über folgende Gleichung mit in die Berechnung der Ligandenkonzentration ein:

$$X_t = X_t^0 \left(1 - \frac{\Delta V}{2V_0} \right) \quad (1)$$

(mit X_t = Gesamtkonzentration an Ligand; X_t^0 = hypothetische Gesamtkonzentration an Ligand; ΔV = Volumenänderung durch Injektion von Analyt und V_0 = Volumen der Reaktionszelle)

Die Kurve wurde nach folgender Gleichung angepaßt:

$$Q = \frac{nM_t \Delta H V_0}{2} \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} \right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t}} \right] \quad (2)$$

(mit Q = Wärmemenge; M_t = Gesamtkonzentration an Makromolekülen in der Reaktionszelle; ΔH = Bindungsenthalpie; n = Anzahl der Bindungsstellen und K = Bindungskonstante)

Über den Zusammenhang $\Delta G = \Delta H - T \Delta S = - R T \ln K_A$ lassen sich weitere thermodynamische Parameter ermitteln.

2.3.3 Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie

Die Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie dient der zeitlich aufgelösten Detektion von Bindungsvorgängen. Sie macht sich das optische Phänomen der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (surface plasmon resonance, SPR) zunutze. Das Meßprinzip und Anwendungsmöglichkeiten werden z.B. bei JÖNSSON et al. (1991) oder SZABO et al. (1995) besprochen. Eine ausführliche Beschreibung der Methode und der Auswertungsverfahren findet sich bei TWELKER (1998).

Die Messungen erfolgten mit einem SPR-Gerät von BIAcore, das von dem Programm BIAcore Control Version 1.2 gesteuert wurde. Das Gerät setzt sich aus einer automatisierten Injektionseinheit, einem Pumpen- und Flußsystem, einer optischen Detektionseinheit und einem austauschbaren Sensorchip zusammen. Die Sensorchips tragen eine Matrix oberhalb der Goldschicht, die eine kovalenten Kopplung (Immobilisierung) von Liganden ermöglicht. Der Analyt wird in freier Lösung über diese Oberfläche gespült. Die Ligand-Analyt-Bindung bewirkt eine Änderung des Resonanzsignals. Dieses wird in der willkürlichen Einheit RU (response units) angegeben, wobei 1000 RU einer Winkeländerung von $0,1^\circ$ und einer Änderung der Protein-Oberflächen-Konzentration von 1 ng/mm^2 entsprechen. Die Resonanzeinheiten werden gegen die Zeit aufgetragen und in Form eines Sensorgramms dargestellt.

2.3.3.1 Immobilisierung der Liganden

Es wurden die Sensorchips CM5 und SA5 von BIAcore verwendet.

Der SA5-Sensorchip diente der Immobilisierung von biotinylierten Liganden über eine Biotin-Streptavidin-Bindung. Er trägt eine Dextranschicht, auf der Streptavidin gekoppelt ist und bedarf keiner Aktivierung.

Der CM5-Sensorchip trägt eine 100 nm dicke, carboxymethylierte Dextranschicht als Matrix (LÖFÅS und JOHNSSON, 1990). Daran können Peptide oder Proteine kovalent z.B. über eine Thiol- oder Aminkopplung gebunden werden. Bei der Thiolkopplung (LÖFÅS et al., 1995) wurde die Dextranschicht zunächst mit einer Mischung aus 50 mM NHS und 200 mM EDC aktiviert. Mit 80 mM PDEA in 100 mM Natriumboratpuffer (pH 8,5) wurde sie derivatisiert. Um eine sehr geringe Immobilisierungsdichte zu erreichen, wurden die Kontaktzeiten von NHS/EDC und PDEA von 7 auf 3 min verkürzt. Die Immobilisierung des Peptides erfolgte in einem 50 mM Natriumformiatpuffer (pH 4,0) bis zu einer Immobilisierungsdichte von 40 bis 3000 RU. Die überzähligen aktiven und modifizierten Carboxylgruppen der Matrix wurden durch Injektion von 50 mM L-Cystein und 1 M NaCl deaktiviert.

2.3.3.2 Messung der Wechselwirkung zwischen Ligand und Analyt

Ein Sensorgramm gliedert sich in Assoziations-, Dissoziations- und Regenerationsphase. Während der Assoziationsphase wurde der Analyt verdünnt in Laufpuffer über die Matrix gespült. Während der Dissoziationsphase wurde die Flußzelle nur mit Laufpuffer und zur Regeneration mit 10-20 μl 10 mM EGTA gespült. Die Messungen wurden mit CaM als Analyten in den Konzentrationen von 10 nM bis 10 μM durchgeführt. Die Messungen erfolgten jeweils mit doppelten Ansätzen. Die Flußrate betrug soweit nicht anders gekennzeichnet 5 $\mu\text{l/min}$.

Datenanalyse

Zur Auswertung der Daten wurde das Programm BIAevaluation Version 3.0 und 3.1 von BIAcore verwendet. Die Datenanalyse erfolgte nach verschiedenen Methoden. Die Auswertungen mittels Scatchard-Plot und EC_{50} -Plot sind ausführlich bei TWELKER (1998) und unter 3.3.3 besprochen. Außerdem erfolgte eine prozentuale Auswertung der einzelnen Phasen des Sensorgramms und eine Kurvenanpassung zur Bestimmung der apparenten Raten- und Bindungskonstanten. Eine Beschreibung dieser Auswertungsmethoden findet sich unter 3.3.3.

2.4 Größenausschlußchromatographie

Die Chromatographie sollte Aufschluß darüber geben, ob die Peptide mmNOS-II WT und hhNOS-II WT Aggregate bildeten. Bei der Größenausschlußchromatographie (SEC) werden die Proben über eine Gelmatrix der Größe nach aufgetrennt. Es wurde ein Äkta-FPLC-System verwendet. Die Säule (Superdex Peptide von Amersham Pharmacia Biotech) besaß einen molekularen Trennbereich von 100-7000 Da. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgezeichnet und als Chromatogramm gegen das Retentionsvolumen aufgetragen. Die Datenanalyse erfolgte mit UNICORN Version 3.10.11 (Amersham Pharmacia Biotech). Als Laufpuffer diente entweder Ca^{2+} - oder EGTA-Puffer (2.3.1). Die Flußrate betrug 0,25 ml/min bei einem Drucklimit von 1,3 mPa. Das Ausschlußvolumen wurde mit 2 mg/ml Dextran Blau bestimmt. Eine Kalibrierung erfolgte mit Cytochrom c und Aprotinin. Es wurden 400 µg Peptidlösung in einem Volumen von 200 µl aufgetragen. Das Eluat wurde in Fraktionen von 0,75 ml aufgefangen und diese anschließend weiter analysiert. Der Proteingehalt wurde mittels BRADFORD-Proteinbestimmung (2.2.6) bestimmt und die Absorption A_{595} gegen das Retentionsvolumen aufgetragen. So konnte festgestellt werden, welche Peaks im Absorptionsprofil Peptide enthielten und wieviel von dem aufgetragenen Peptid eluierte. Zusätzlich wurde eine Cysteingruppenbestimmung (2.2.3) durchgeführt. Für einzelne oder mehrere Peaks im Chromatogramm, die den höchsten Proteingehalt hatten, wurde das Retentionsvolumen bestimmt.

Es wurden die Peptide mmNOS-II WT, hhNOS-II WT, NOS-II 3K und E3K und zum Vergleich NOS-I WT verwendet. Für diese Peptide erfolgte eine Größenausschlußchromatographie mit anschließender Protein- und Cysteingruppenbestimmung in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} .

2.5 Amplifizierung und Präparation von Plasmid-DNA

2.5.1 Vektoren und *E. coli*-Stämme

Die humane NOS-I-cDNA (NAKANE et al., 1993) wurde über die EcoRI Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle (MCS) des Vektors in den Vektor pcDNA-I (Invitrogen) inseriert. Zur Amplifizierung wurde der *E. coli*-Stamm MC1061/P3 [F^- hsdR2 (r_K^- , m_K^+) araD139 Δ (araABC-leu)7697 galU glaK Δ (lac)X74 rpsL str^r thi-1 mcrB Kan^r, Amp^r (amber), Tet^r (amber)] verwendet. Der Vektor pcDNA-I trägt ein amber-Suppressorgen und ermöglicht so eine Ampicillin- und Tetracyclinelektion. Der Vektor pcDNA-I mit der inserierten NOS-I-cDNA wird hier mit pcNOS-I WT bezeichnet. Mutierte NOS-I-DNA wurde in den Vektor pcDNA-Iamp (Invitrogen) inseriert. Die humane hepatische NOS-II-cDNA (GELLER et al., 1993) wurde über die Schnittstellen Hind III (5') und Not I (3') in den Vektor pcDNA-Iamp kloniert. Hier wurde zur DNA-Amplifizierung der *E. coli*-K12 Stamm XL1-Blue (recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F' proAB, lacI^qZAM15, Tn10(tet^r)]) verwendet. Die Selektion erfolgte über Ampicillin. Der Vektor pcDNA-Iamp mit der inserierten NOS-II-cDNA wird hier mit pcNOS-II WT bezeichnet.

2.5.2 Herstellung kompetenter Zellen

Die kompetenten Zellen wurden nach einer modifizierten Methode nach MANDEL und HIGA (1970) hergestellt. Eine frisch angeimpfte *E. coli*-Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,4 bei 37°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und nach Zentrifugation (3.000 x g, 5 min, 4°C) in der Hälfte des Kulturvolumens an eiskalter CaCl₂-Lösung (100 mM) aufgenommen. Die Zellen wurden 20 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut abzentrifugiert, in 1/10 Volumen eiskalter 100 mM CaCl₂ / 25 % Glycerin Lösung resuspendiert und für 4 h auf Eis inkubiert. Aliquots der Zellen wurden bei -80°C gelagert.

2.5.3 Retransformation

Zur Retransformation der Plasmide wurde ca. 1 ng DNA eingesetzt. Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit der DNA-Lösung versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie auf Ampicillin-LB-Agarplatten (2.7.9) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.5.4 Anzucht von *E. coli*-Zellen

Die *E. coli*-Zellen wurden in LB-Medium (10 g Baktrotrypton, 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt pro Liter) bei 37°C für mindestens 8 h vermehrt. 5 ml Kulturen wurden im Rotationsinkubator, große Kulturen im Warmluftschüttler inkubiert. Zur Selektion auf das Plasmid wurde dem Medium zuvor 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt.

2.5.5 Alkalische Mini-Präparation

Die Mini-Präparation von Plasmid-DNA erfolgte aus einem Kulturvolumen von 1,5 ml durch alkalische Lyse nach der Methode von BIRNBOIM und DOLY (1979). Die pelletierten Bakterienzellen wurden in 50 µl Lösung I resuspendiert, mit 60 µl Lösung II lysiert und die Zelltrümmer nach Zugabe von 75 µl Lösung III gefällt. Nach der Zentrifugation (17.600 x g, 5 min, 4°C) erfolgte mit dem Überstand eine Phenol/Chloroform- und eine Chloroform-extraktion. Hierzu wurde der Überstand mit dem gleichen Volumen einer 1:1 Mischung aus Phenol und Chloroform versetzt. Nach gründlichem Mischen wurde bis zur Phasentrennung zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert, um die Phenolreste zu entfernen. Es wurde wieder bis zur Phasentrennung zentrifugiert. Die Nucleinsäuren wurden mit 550 µl EtOH aus der wäßrigen Phase gefällt und anschließend mit 70 % EtOH gewaschen. Nach dem Trocknen bei 37°C im Heizblock wurde das DNA-Pellet in 20 µl TE/RNase resuspendiert.

<u>Lösung I</u>	<u>Lösung II</u>	<u>Lösung III</u>	<u>TE/RNase</u>
50 mM Glucose	0,2 M NaOH	3 M KAc,	10 mM Tris/HCl pH 7,4
25 mM Tris/HCl pH 8,0	1 % SDS	pH 4,8	1 mM EDTA pH 8,0
10 mM EDTA			4 µl/ml RNase Mix

2.5.6 Lithiumchlorid-Präparation

Zur Präparation größerer DNA-Mengen aus 250 ml Kulturvolumen wurde die LiCl-Präparation angewandt. Die Bakterienzellen wurden pelletiert (5.000 x g, 10 min, 4 C), in Lösung I (20 ml) resuspendiert und mit 24 ml Lösung II lysiert. Mit 30 ml Lösung III wurden die Zelltrümmer gefällt. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation (5.000 x g, 4 C) wurde der Überstand mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt und die so gefällten Nucleinsäuren bei 5.000 x g (10 min, 4 C) pelletiert. Das Pellet wurde in 1,45 ml H₂O bid. resuspendiert und die Suspension mit 2,5 ml eiskaltem LiCl (4 M) und 50 µl 1 M Tris/HCl pH 7,5 versetzt. Bei 5.000 x g (5 min, 4°C) wurde die so gefällte RNA pelletiert. Die Plasmid-DNA wurde mit

eiskaltem EtOH (10 ml) aus dem Überstand gefällt und das DNA-Pellet nach der Zentrifugation (5.000 x g, 10 min, 4°C) in TE/RNase (10 µl/ml RNase Mix) aufgenommen, um die restliche RNA für 15 min bei 37°C zu verdauen.

Es wurde zweimal eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt und anschließend einmal mit Chloroform extrahiert (2.8.3). Im Falle von MC1061-Zellen wurde die Lösung mit 1 mg/ml EtBr und 2 M NH₄Ac versetzt und die Phenol/Chloroform-Extraktion solange durchgeführt, bis die wässrige Phase wieder farblos war. Mit 50 µl 3 M NaAc (pH 4,8) und 1,5 ml EtOH (eiskalt) wurde die Plasmid-DNA während einer fünfzehnminütigen Zentrifugation (17.000 x g, 4°C) gefällt und pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70 % EtOH gewaschen, wobei im Falle von MC1061-Zellen der erste Waschschrift für 30-60 min auf Eis erfolgte. Die DNA wurde anschließend in 100 µl TE aufgenommen.

2.5.7 DNA-Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese können Nucleinsäuren der Größe nach aufgetrennt, quantifiziert oder gereinigt werden. Es wurden 0,75 %-Agarosegele verwendet, die eine Auftrennung im Bereich von 500-10.000 Bp erlauben. Die Agarose wurde mit 1 µg/ml EtBr versetzt. Die Proben wurden mit Farbmaler (5 % (w/v) Glycerin, 0,02 % (w/v) Xylencyanol in 1-fachem TAE) versehen und bei 120 V aufgetrennt.

Als Laufpuffer diente 1-faches TAE (40 mM Tris/Eisessigsäure pH 7,5, 1 mM EDTA). Als Größen- und Mengenstandard wurde λ-DNA, die mit EcoRI/HindIII geschnitten war verwendet. Die DNA wurde im UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht. Anhand des Standards konnte die Menge an superhelicaler DNA abgeschätzt werden (Tab. 2.5). Zur ganz genauen Bestimmung der DNA-Menge wurde die DNA vor der Agarosegelelektrophorese linearisiert. Der gleiche Standard diente auch zur Abschätzung der Größe von DNA-Fragmenten. Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurden die entsprechenden Banden auf dem UV-Tisch aus dem Gel ausgeschnitten. Zum Schutz vor UV-Schäden wurde dabei eine Glasplatte untergelegt.

Tab. 2.2: Zusammensetzung des λ -DNA Größen- und Mengenstandards (500 ng / 7,5 μ l).

Fragment-länge (Bp)	DNA-Menge (ng)	Fragment-länge (Bp)	DNA-Menge (ng)
21.226	212,0	1.584	15,8
5.184	51,8	1.375	13,8
4.973	49,7	947	9,5
4.268	42,7	831	8,3
3.530	35,3	564	5,6
2.027	20,3	125	1,3
1.904	19,0		

2.5.8 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Reinigung von DNA aus Agarosegelen erfolgte durch Zentrifugation nach HEERY et al. (1990). Die Gelstücke wurden bei ca. 5.000 x g für 15 min über silanisierte Glaswolle zentrifugiert bis das Gelstück fast trocken war.

2.6. DNA-Sequenzierung

2.6.1 Reinigung der DNA für die Sequenzierung

Die Reinigung von DNA für die Sequenzierung erfolgte abgewandelt für kleine Volumina nach der LiCl-Methode. Eine 5 ml Kultur wurde mit 17.000 x g bei 4°C pelletiert und anschließend in 150 μ l Lösung I resuspendiert und mit 180 μ l Lösung II und 225 μ l Lösung III versetzt (Lösungen siehe 2.5.5). Die Proteine wurden für 5 min bei 17.000 x g gefällt und der Überstand mit 1,5 ml EtOH durchmischt. Nach einer Zentrifugation (17.000 x g, 3 min, 4°C) wurde das Pellet in 120 μ l 30 mM TrisHCl, pH 7,5-8,0 resuspendiert und mit 200 μ l 4 M LiCl versetzt. Die RNA wurde bei 17.000 x g und 4°C für 5 min gefällt. Aus dem Überstand wurde die DNA mit 1 ml eiskaltem EtOH durch Zentrifugation (17.000 x g, 5 min, 4°C) gefällt, anschließend mit 70 % EtOH gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet, in 100 μ l TE/RNase (4 μ l Ambion RNase cocktail/ml TE) resuspendiert und für 5-10 min bei 37°C inkubiert. Nach einer Phenol/Chloroform- und einer Chloroform-Extraktion wurde die DNA in 300 μ l EtOH + 10 μ l 3 M NaAc gefällt (17.000 x g, 10 min, 4°C). Anschließend wurde das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen und in 20 μ l TE resuspendiert.

2.6.2 Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Primern

Die DNA wurde nach der Methode des Didesoxy-Kettenabbruchs sequenziert (SANGER et al., 1977). Die gereinigte DNA wurde in einer Konzentration von ca. 65 ng/kBp eingesetzt. Von den fluoreszenzmarkierten Primern (2.6.3) wurden pro Ansatz 0,5 pmol verwendet. Die Sequenzierung erfolgte mittels PCR (2.7.3) und wurde mit dem „Thermo Sequenase Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden nach Herstellerangaben in einem Volumen von 3 µl angesetzt. Folgende PCR-Zyklen wurden durchlaufen:

120 sec	94°C		30 Zyklen
40 sec	94°C		
40 sec	50°C		
60 sec	70°C		

Abkühlen auf 4°C.

Die Reaktion wurde mit 3 µl Stoppuffer (Amersham Pharmacia Biotech) abgestoppt und die DNA anschließend für 2 min bei 70°C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte in einem LICor DNA Sequencer. Es wurden 4,6 %-Gele (11,2 % (w/v) Rapid Gel XL, 1 % (v/v) DMSO, 7 M Harnstoff in TBE-Laufpuffer) mit einer Trennstrecke von 66 cm verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 45°C und 45 W über 8-12 h mit TBE-Laufpuffer (13,4 mM Tris, 4,5 mM Borsäure, 0,25 mM EDTA) durchgeführt. Die fluoreszenzmarkierten Fragmente wurden automatisch detektiert. Aufzeichnung und Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programmpaket BaseImageIR (LICor).

2.6.3 Fluoreszenzmarkierte Primer für die Sequenzierung

Allgemeine Primer

Die folgenden Primer wurden zur Sequenzierung aller DNAs im jeweiligen Vektor verwendet. Sie entsprechen den Sequenzen direkt vor bzw. direkt nach der MCS (multiple Klonierungsstelle) des Vektors.

Tab. 2.3: Fluoreszenzmarkierte Primer zur Sequenzierung, die am Vektor ansetzen.

Primernummer	Vektor	Ansatzpunkt
9001	pBluescript	T3-Promotor
9002	pBluescript & pcDNA-Iamp	T7-Promotor
9006	pcDNA-Iamp	Sp6-Promotor

Primer für die Sequenzierung der humanen NOS-I-cDNA

Die Primer wurden anhand der humanen NOS-I-Sequenz (GenBank accession number: L02881) ausgewählt.

Tab. 2.4: Fluoreszenzmarkierte Primer für die NOS-I-Sequenzierung.

Primernummer	Sequenzabschnitt	Sequenz 5'→3'
9058	1424-1443 Bp	AAG TCA CAC AAA CCT CTG CC
9059	2122-2142 Bp	CTG GAA CTC CCA GCT CAT CCG
9060	2813-2833 Bp	GAA TAC CAG CCT GAT CCC TGG
9061	3536-3556 Bp	GAT GAT GTC AAC ATT GAA AAG
9062	4243-4263 Bp	AGA CAT GTA CCC TGA TGA AGT

Primer für die Sequenzierung der humanen hepatischen NOS-II-cDNA

Die Primer wurden anhand der humanen hepatischen NOS-II-Sequenz (GenBank accession number: L09210) ausgewählt.

Tab. 2.5: Fluoreszenzmarkierte Primer für die NOS-II-Sequenzierung.

Primernummer	Sequenzabschnitt	Sequenz 5'→3'
9050	702-720 Bp	GTC GAA GCG GTA ACA AAG G
9051	1418-1436 Bp	CAA GCT GGC CTC GCT CTG G
9052	2125-2144 Bp	ACA TTG ATC AGA AGC TGT CC
9053	2791-2810 Bp	TGT GCC AGC CCT CAG AGT AC

2.7 DNA-Mutagenese

2.7.1 Restriktionsverdau

Die doppelsträngige DNA wurde mit 1-2 U/μg DNA der gewünschten Restriktionsendonuclease nach Herstellerangaben inkubiert.

2.7.2 Auffüllen von überhängenden, einzelsträngigen DNA-Enden

Viele Restriktionsendonucleasen erzeugen überhängende, einzelsträngige DNA-Enden. Je nach Anwendung müssen sie zu glatten, doppelsträngigen Enden aufgefüllt oder abgebaut werden. Das Klenow-Fragment der *E. coli*-DNA-Polymerase I hat 5'→3' Polymeraseaktivität

und 3'→5' Exonucleaseaktivität. Es wurden 2 U/μg DNA der Klenow-DNA-Polymerase und 100 μM dNTPs in 1-fachem Puffer nach Herstellerangaben eingesetzt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei 68°C für 10 min inaktiviert und die DNA über ein Agarosegel gereinigt (2.5.8).

2.7.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR (MULLIS et al., 1986) dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten. Die zu amplifizierende DNA (Matrize) wird durch Hitze denaturiert und mit speziell hergestellten Oligonucleotiden (Primern) hybridisiert. Diese Oligonucleotide können dazu verwendet werden, die Matrize originalgetreu zu amplifizieren, oder sie tragen Veränderungen, die in die DNA eingebaut werden sollen (mutagene PCR, Mutageneseprimer siehe 2.7.10 und 2.7.11). Die Primer werden durch eine hitzestabile Polymerase verlängert. Es erfolgen mehrere Zyklen von Denaturierung, Hybridisierung und Verlängerung.

2.7.4. Herstellung und Reinigung von Oligonucleotiden

Die Oligonucleotide wurden gezielt für die jeweilige PCR ausgewählt und mit einem DNA-Synthesegerät hergestellt. Die Oligonucleotide wurden anschließend über Nacht in 32 % Ammoniaklösung bei 55°C vom Säulenmaterial abgespalten, entschützt und der Ammoniak wurde im Rotationsverdampfer abgedampft. Das Pellet wurde in H₂O bid. resuspendiert. Anschließend erfolgte eine EtOH-Präzipitation mit dem 2,5-fachen Volumen an EtOH und dem 0,1-fachen Volumen an 3 M NaAc. Nach zwanzigminütiger Zentrifugation (17.000 x g, 4°C) wurde das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 100 μl TE aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm im Spektralphotometer in 100- bis 200-fach verdünnter Lösung. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer Oligonucleotidkonzentration von 33 μg/ml. Die Oligonucleotide zur Mutagenese sind einzeln unter 2.7.10 und 2.7.11 aufgeführt.

2.7.5 Bedingungen der PCR

Die PCR wurde in einem „Trio-Thermoblock“ durchgeführt. Es wurde 100-200 ng DNA-Matrize eingesetzt. Die Primer wurden in einer Konzentration von 20 ng/Base eingesetzt. Dem PCR Ansatz (100 μl Endvolumen) wurden 200 nM dNTPs, 2,5 U Taq-Polymerase und Polymerasepuffer des Herstellers in 1-facher Endkonzentration zugesetzt.

Die PCR startete jeweils mit einer zweiminütigen Denaturierungsphase bei 94°C. Die anschließenden Zyklen unterschieden sich von Primer zu Primer. Die Denaturierung erfolgte immer bei 94°C für 35 sec. Die Hybridisierungstemperatur entsprach der niedrigsten

Schmelztemperatur T_m eines der beiden Primer. Diese kann über folgenden Zusammenhang ermittelt werden:

$$T_m = (\text{Anzahl der G / C Nucleotide}) \times 4^\circ\text{C} + (\text{Anzahl der A / T Nucleotide}) \times 2^\circ\text{C} - 4^\circ\text{C}$$

Die Hybridisierung erfolgte für 35 sec. Zur Verlängerung der Primer durch die Polymerase wurde der PCR-Ansatz bei 72°C für 1 min pro 1 kbp DNA inkubiert. Die PCR-Fragmente wurden anschließend über ein Agarosegel aufgereinigt (2.5.8).

2.7.6 Phosphorylierung von DNA-5'-Enden

PCR-Fragmente weisen keine endständige 5'-Phosphatgruppe auf und müssen vor einer Ligation daher phosphoryliert werden. Dazu wurde die DNA mit 5-10 U der T4-Polynucleotidkinase, 5 mM MgCl_2 und optional 0,1 mM ATP in 1-fachem Kinasepuffer nach Herstellerangaben für 30 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde für 10-15 min bei 68°C inaktiviert.

2.7.7 Dephosphorylierung von geschnittenen Vektoren

Die glatt geschnittene Vektor-DNA wurde mit der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert, um eine Religation zu vermeiden. 0,5-1 µg geschnittene Vektor-DNA und 40 mU alkalische Phosphatase wurden in einem Endvolumen von 50 µl und 1-fach konzentriertem Phosphatasepuffer des Herstellers für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 10 µl 10 mM EGTA wurde die Reaktion abgestoppt und das Enzym bei 68°C für 10 min inaktiviert. Die DNA wurde anschließend mit Phenol/Chloroform extrahiert und über ein Agarosegel gereinigt (2.5.8).

2.7.8 Ligation

Für eine Ligation von DNA-Fragmenten mit einem Vektor wurde der Vektor aufgeschnitten und gegebenenfalls dephosphoryliert (2.7.7). Das Fragment wurde im 3- bis 5-fachen molaren Überschuß in 1-fachem Ligasepuffer mit dem Vektor gemischt und mit 0,5 U T4-DNA-Ligase versetzt. Der Ligationsansatz wurde für ca. 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der Ligation von glatten Enden wurde der Ansatz über Nacht bei 16°C mit ca. 3 U T4-DNA-Ligase inkubiert.

2.7.9 Transformation von Ligationsprodukten

Die Hälfte des Ligationsansatzes (meist 7,5 µl) wurde mit 10 µl 10-fachem CM (100 mM CaCl_2 , 400 mM MgCl_2) versetzt und mit H_2O bid. auf 100 µl aufgefüllt. Der eisgekühlte Ansatz wurde mit 100 µl kompetenten Zellen (2.5.2) vorsichtig gemischt und für 20 min auf

Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (1 min bei 42°C) wurde der Ansatz wieder für mindestens 10 min auf Eis gekühlt, mit 400 µl LB-Medium (2.5.4) versetzt und auf 37°C im Thermoblock erwärmt. Anschließend wurden unterschiedliche Mengen auf Ampicillin-LB-Agarplatten (1,5 % LB-Agar, 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.7.10 Mutagenesestrategie für die NOS-I-cDNA

Tab 2.6: Oligonucleotide zur NOS-I-Mutagenese.

Nr.	Verwendungszweck	Sequenz (5' → 3')
2555	Mutagenesevektor	⁶⁶³ AG TAA GCT TCT AGA GGT ACC ACC ATG GAG GAT CAC ATG TTC ⁷⁰³
2556	Mutagenesevektor	¹⁹⁷⁹ ATA CCT GCA GCT TGG ACC ¹⁹⁶²
2557	Mutagenesebox	¹⁹⁵⁰ GCA GGA TCC AGT GGT CCA AG ¹⁹⁶⁹
2558	Mutagenesebox	³⁴³⁷ TCA GGA TCC TCT CCC CTC CC ³⁴¹⁸
2559	Mutation K737V	²⁸⁸⁶ TC GGC TTC AAG GTC CTA GCA GAA GCT G ²⁹¹²
2654	Mutation VFM	²⁸⁹² TC AAG GTC CTA GCA GAA GCT GTC CTG TTC TCG GCC ATG CTG ATG ²⁹³⁵
2655	Mutation VKFM	²⁸⁹² TC AAG GTC CTA GCA AAA GCT GTC CTG TTC TCG GCC ATG CTG ATG ²⁹³⁵
2667	Mutation VKF	²⁸⁹² TC AAG GTC CTA GCA AAA GCT GTC CTG TTC TCG GCC ²⁹²⁶

Veränderte Basen sind fett dargestellt. Beginn und Ende der Primer im Bezug auf die Originalsequenz (GenBank accession number: L02881) sind hochgestellt.

Mutationen

Folgende Mutationen wurden eingeführt:

- (2555) GG ACC CCT CGG AAG CTA GTT → AG TAA GCT TCT AGA GGT ACC : Die Schnittstellen HindIII, XbaI, KpnI werden direkt vor dem Startkodon ATG eingefügt.
- Basenaustausch AAG → GTC : Aminosäureaustausch K → V
- Basenaustausch GAA → AAA : Aminosäureaustausch E → K
- Basenaustausch AAG → CTG : Aminosäureaustausch K → L
- Basenaustausch AAG → ATG : Aminosäureaustausch K → M

Mutagenesestrategie

Die erste PCR(1) erfolgte auf Bluescript NOS-I (bNOS-I) als Matrize mit den Primern 2555 und 2556. Das PCR-Produkt entspricht dem 5'-Ende der NOS-I-cDNA von Position 663 Bp bis 1972 Bp. Der Vektor pcDNA-Iamp wurde mit HindIII und BamHI verdaut. Das PCR(1)-Produkt und der geschnittene Vektor wurden zu pcANOSI5' ligiert. Die DNA bNOS-I wurde mit EcoRI und BamHI verdaut und das 2411 Bp große Fragment eluiert. Dieses Fragment enthält das 3'-Ende der NOS-I-cDNA von Position 3429 Bp bis 5840 Bp. Der Vektor pcANOSI5' wurde ebenfalls mit EcoRI und BamHI verdaut und mit dem 2411 Bp großen Fragment zum Mutagenesevektor pcANOSI5'3' ligiert. Die zweite PCR(2) erfolgte auf bNOS-I als Matrize mit dem Primer 2558 und dem jeweiligen Mutageneseprimer (kleine Mutagenesebox). Mit einem BamHI-Verdau wurde ein Fragment zwischen den Positionen 1953 Bp und 3429 Bp aus bNOS-I ausgeschnitten. Das Fragment wurde mit HindIII (Position 3000 Bp) verdaut und das 1047 Bp große Fragment wurde eluiert. Die dritte PCR(3), eine rekombinante PCR, erfolgte auf dem PCR(2)-Produkt und dem 1047 Bp Fragment mit den Primern 2557 und 2558 (große Mutagenesebox). Anschließend wurde das PCR(3)-Produkt mit NheI geschnitten und das ungeschnittene Fragment eluiert. Durch die Mutagenese war die NheI-Schnittstelle zerstört worden. Die große Mutagenesebox und der Mutagenesevektor pcANOSI5'3' wurden mit BamHI verdaut und zur fertigen Mutante ligiert.

2.7.11 Mutagenesestrategie für die NOS-II-cDNA**Tab 2.7:** Oligonucleotide zur NOS-II-Mutagenese.

Nr.	Verwendungszweck	Sequenz (5' → 3')
2668	Mutagenesebox	¹⁵³¹ CCT TCA TGA AGT ACA TGC ¹⁵⁴⁸
2669	Mutagenesebox	¹⁸³⁵ AAA GAG GAT GGT GAC TCT ¹⁸¹⁸
2670	Mutagenesebox	²⁴²⁴ GAG ATT TGA GCC TCA TGG ²⁴⁰⁷
2671	Mutation E3K	¹⁷⁴⁶ CCA TTG AAA AAG CTT GTC GAA GCT GTG AAG TTT GCC TGT AAG CTG ATG CGC ¹⁷⁹⁶
2672	Mutation 3K	¹⁷⁴⁶ CCA TTG AAA AAG CTT GTC AAA GCT GTG AAG TTT GCC TGT AAG CTG ATG CGC ¹⁷⁹⁶

Veränderte Basen sind fett dargestellt. Beginn und Ende der Primer im Bezug auf die Originalsequenz (GenBank accession number: L09210) sind hochgestellt.

Mutationen

Folgende Mutationen wurden eingeführt:

- Basenaustausch GTC → AAG : Aminosäureaustausch V → K
- Basenaustausch GTC TTG → AAG CTT : neue HindIII- Schnittstelle entsteht (stille Mutation)
- Basenaustausch AAA → GAA : Aminosäureaustausch K → E
- Basenaustausch CTC → AAG : Aminosäureaustausch L → K
- Basenaustausch ATG → AAG : Aminosäureaustausch M → K

Mutagenesestrategie

Die NsiI-Schnittstelle wurde aus pcDNA-Iamp durch Restriktion, Abbau der überhängenden Enden und Religation entfernt. Dadurch entstand der Vektor pcDNA-Iamp NsiI⁻. Die DNA pcNOS-II WT und der Vektor pcDNA-Iamp NsiI⁻ wurden mit HindIII und NotI verdaut. Das eluierte NOS-II-Insert und der geschnittene Vektor wurden zum Mutagenesevektor pcNOS-II NsiI⁻ ligiert. Die erste PCR(1) erfolgte mit den Primern 2668 und 2669 auf der DNA pcNOS-II WT als Matrize. Es entstand ein 304 Bp langes Fragment, das die Wildtyp-CaM-Bindungsstelle beinhaltete. Die zweite PCR(2) erfolgte mit dem jeweiligen Mutageneseprimer und Primer 2670 auf pcNOS-II WT. Das PCR(2)-Produkt hatte eine Länge von 678 Bp und umfaßte die mutierte CaM-Bindungsstelle, sowie den 3'-gelegenen Abschnitt der Mutagenesebox. Die dritte PCR(3) erfolgte überlappend auf den Produkten aus PCR(1) und PCR(2) mit den Primern 2668 und 2670. Daraus ergab sich die große Mutagenesebox. Diese und der Mutagenesevektor pcNOS-II NsiI⁻ wurden mit AgeI und NsiI verdaut und anschließend zur fertigen Mutante ligiert.

2.8 Expression der Enzyme

2.8.1 Transiente Transfektion von HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen entstammen einer humanen, embryonalen Nierenzelllinie. Sie werden in M10-Medium bei 37°C, 5 % CO₂ und ca. 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die transiente Transfektion der Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode der Calciumphosphat-Präzipitation (CHEN und OKAYAMA, 1987). Es wurden sowohl 5 cm Schalen mit einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen wie auch 9 cm Schalen mit einer Zelldichte von 9×10^5 Zellen verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit Calciumphosphat in einer Endkonzentration von 125 mM gemischt und BBS-Puffer in einfacher Endkonzentration zugefügt. Welche DNA-

Konzentration für eine erfolgreiche Transfektion eingesetzt werden muß, hängt von der Qualität der DNA ab und wurde jeweils ausgetestet. Die Ansätze wurden 15-20 min bei RT inkubiert und anschließend gleichmäßig auf den Zellen verteilt. Es folgte eine Inkubation für 20-22 h bei 37°C und 3 % CO₂. Anschließend wurde das Präzipitat mit PBS und PBS/EDTA (je 2 ml bei 5 cm Schalen) entfernt und frisches Medium zupipettiert. Für den Nachweis der NOS in fixierten Zellen (2.8.3) wurden die Zellen auf Multiwell-Platten umgesetzt. Hierzu wurden sie, nachdem das Präzipitat entfernt war, mit 300 µl Trypsin/EDTA vom Schalenboden gelöst und in 4,7 ml M10-Medium resuspendiert. Dreihundert Mikroliter der Zellsuspension wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Glasplättchen in den Multiwell-Platten pipettiert, die 100 µl Medium pro Well enthielten. Die Inkubation der Schalen und Multiwell-Platten erfolgte für weitere 24 h bei 37°C und 5 % CO₂. Um die Expression zu steigern, wurde den Zellen 3 mM Natriumbutyrat zugesetzt. Der Zeitpunkt der Natriumbutyrat-Zugabe von 22 h vor der Zellfixierung bzw. Zellernte erwies sich als optimal. Für die Wells wurde das Butyrat in einem Endvolumen von 100 µl M10 vorverdünnt.

M10-Medium: Minimal essential Medium mit 10 % fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 1 % nichtessentielle AS, 1 % Antibiotika / Antimykotika

Trypsin/EDTA: 0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA

PBS (pH 7,4): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1,5 mM KH₂PO₄

BBS-Puffer (pH 6,95): 25 mM BES, 140 mM NaCl, 0,75 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O

PBS/EDTA: 0,5 g EDTA in 1 l PBS (pH 7,3)

2.8.2 Zellfixierung mit Paraformaldehyd

Die HEK-293-Zellen wurden auf den Glasplättchen mit Paraformaldehyd (PA) fixiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend ließ man 4 % PA (81 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 19 mM NaH₂PO₄ x H₂O, 4 % (w/v) Paraformaldehyd, pH 7,4) für ca. 7 min einwirken. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und in PBS + 0,05 % (v/v) Natriumazid gelagert.

2.8.3 Nachweis der NO-Synthase in fixierten Zellen

2.8.3.1 Immuncytochemie

Proteine können immuncytochemisch in PA-fixierten Zellen nachgewiesen werden. Um die NO-Synthasen nachzuweisen, wurden die NOS-Antikörper α NOS-Ip und α NOS-IIp verwendet. Es handelt sich um polyklonale Antikörper aus Kaninchen, die isoformspezifisch an NOS-I bzw. NOS-II binden.

Die PA-fixierten Zellen wurden mit 0,3 ml Präinkubationsmedium (10 % NGS, 0,5 % Triton X-100, 1 % BSA in PBS) für 15 min bei RT vorinkubiert und anschließend für eine Stunde mit in NGS^+ (3-5 % NGS, 0,5 % Triton X-100, 0,05 % Natriumazid) verdünntem Erstantikörper (α -NOS-Ip 10-fach verdünnt, α -NOS-IIp 50-fach verdünnt) inkubiert. Der Zweitantikörper (Kaninchen-IgG-Antikörper mit gekoppelter Meerrettichperoxidase) wurde in 100-facher Verdünnung in NGS^- (wie NGS^+ aber ohne Natriumazid) eingesetzt und 40 min auf den Zellen belassen. Nach den Antikörperinkubationen erfolgten jeweils zwei Waschschritte mit PBS. Die Detektion der NOS erfolgte mittels einer Diaminobenzidin (DAB)-Färbereaktion. Das DAB wird durch den von der Meerrettichperoxidase aus H_2O_2 freigesetzten Sauerstoff oxidiert und fällt als bräunlicher, unlöslicher Niederschlag aus. Die DAB-Färbelösung (0,05 % DAB, 0,01 % H_2O_2 , in PBS) wurde 3-7 min auf den Zellen belassen. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines Überschusses an PBS abgestoppt. Anschließend wurde reichlich mit PBS gewaschen.

2.8.3.2 NADPH-Diaphorase-Aktivität

Die NADPH-Diaphorase-Aktivität der NOS wandelt NADPH-abhängig ein lösliches, gelbes Tetrazoliumsalz in ein unlösliches, blaues Formazan um (HOPE et al., 1991). Um das Natriumazid vollständig zu entfernen, wurden die PA-fixierten Zellen viermal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie bei 37°C im Dunkeln mit der Färbelösung für 15 bis 45 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Waschen mit PBS abgestoppt.

Färbelösung: 100 mM Tris pH 8,0, 0,1 mM Nitrobluetetrazolium (NBT), 1 mM NADPH, 1 mM CoCl_2 , 0,2 % Triton X-100.

2.8.3.3 Colokalisation von NOS und NADPH-Diaphorase-Aktivität

Zunächst wurde auf den PA-fixierten Zellen die NADPH-Diaphorase-Färbung (2.8.3.2) durchgeführt. Die Inkubationszeit wurde auf 5 min reduziert. Hierauf erfolgte der immun-cytochemische Nachweis der NOS auf den selben Zellen (2.8.3.1), wobei die Färbedauer auf 10 min erhöht wurde.

2.8.4 Zellernte und Lyse

Die Zellen wurden mit einem Gummischaber vom Schalenboden abgekratzt und mitsamt Medium in ein Greiner-Röhrchen überführt. Anschließend wurden sie bei 5.000 x g und 4°C für ca. 5 min pelletiert und das Pellet mit PBS gewaschen. Zum Aufschluß der Zellen wurden die Pellets in Lysepuffer resuspendiert, die Suspension in Beckmann-Reaktionsgefäße für die Ultrazentrifuge überführt und anschließend sonifiziert (100 W, 2-3 x 10 sec). Durch Ultrazentrifugation (Beckmann TL-100 Ultrazentrifuge, Rotor TA45, 45.000 x g, 15 min, 4°C) wurden die festen Zellbestandteile pelletiert und anschließend der Überstand (cytosolische Fraktion) abgenommen.

Lysepuffer: 20 mM HEPES pH 7,5, 320 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Trypsin-Inhibitor, 2 µg/ml Aprotinin bei RT mit HCl auf pH 7,2 titriert.

2.8.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach BRADFORD

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Zelllysate erfolgte nach der Methode von BRADFORD (1976; 2.2.6). Die Kalibrierungsgerade wurde in diesem Fall mit BSA erstellt.

2.8.6 Nachweis der NOS in den Zelllysaten

2.8.6.1 Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteingemischen. Erfolgt sie unter denaturierenden Bedingungen, so werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Hierzu werden Gele und Elektrodenpuffer mit SDS versetzt. Die Gelelektrophorese mit SDS-Gelen erfolgte nach einer modifizierten Methode von LAEMMLI (1970). Es wurden kontinuierliche SDS-Gele mit einer einheitlichen Acrylamidkonzentration und Gradientengele eingesetzt. Zum Gießen der Gradientengele wurde eine Mischkammer und eine Peristaltikpumpe verwendet.

Die Proben wurden in 1-facher Endkonzentration in Probenpuffer (50 mM Tris/HCl pH 6,8, 12,5 % (v/v) Glycerin, 0,01 % β -Mercapto-EtOH, 0,0025 % (v/v) Bromphenolblau, 1,6 % (w/v) SDS) aufgenommen. Anschließend erfolgte eine ca. fünfminütige Denaturierung bei 95°C und eine kurze Zentrifugation (14000 Upm, 2 min). Es wurden 1-20 μ g Protein aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde in vertikalen Flachgelkammern (83 x 83 x 1 mm) durchgeführt. Die Proteine wurden bei 15-25 mA pro Gel in Elektrodenpuffer (25 mM Tris/HCl pH 8,0, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) aufgetrennt.

Als Molmassenmarker wurden Molekulargewichtsstandards für den mittleren (LMW) und höheren (HMW) Molekulargewichtsbereich von Pharmacia verwendet.

LMW

14,4 kDa α -Lactalbumin
 20,1 kDa Trypsin-Inhibitor
 30 kDa Carboanhydrase
 43 kDa Ovalbumin
 67 kDa Albumin
 94 kDa Phosphorylase-b

HMW

53 kDa Glutamat-Dehydrogenase
 76 kDa Transferrin
 116 kDa β -Galactosidase
 170 kDa α_2 -Macroglobulin
 212 kDa Myosin

Acrylamidlösung: 30 % (w/v) Acrylamid, 0,75 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid

Tab. 2.8: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.

	Trenngel			Sammelgel	
	Acrylamidkonzentration	7,5 %	15 %		5,4 %
SDS - Gele	1,5 M Tris /HCl pH 8,8	1,5 ml	1,5 ml	0,5 M Tris/HCl pH 6,8	0,5 ml
	Acrylamidlösung 30 % (w/v)	1,5 ml	3 ml	Acrylamidlösung 30 % (w/v)	0,34 ml
	TEMED	3 μ l	3 μ l	TEMED	2 μ l
	APS 10 % (w/v)	40 μ l	40 μ l	APS 10 % (w/v)	40 μ l
	SDS 10 % (w/v)	60 μ l	60 μ l	SDS 10 % (w/v)	20 μ l
	H ₂ O bid.	2,9 ml	1,4 ml	H ₂ O bid.	1,1 ml
Gradientengele 4-6 %	Acrylamidkonzentration	4 %	6 %		3,5 %
	1,5 M Tris /HCl pH 8,8	750 μ l	750 μ l	0,5 M Tris/HCl pH 6,8	500 μ l
	Acrylamidlösung 30 % (w/v)	396 μ l	594 μ l	Acrylamidlösung 30 % (w/v)	231 μ l
	TEMED	2 μ l	2 μ l	TEMED	2 μ l
	APS 10 % (w/v)	15 μ l	15 μ l	APS 10 % (w/v)	40 μ l
	SDS 10 % (w/v)	30 μ l	30 μ l	SDS 10 % (w/v)	20 μ l
	H ₂ O bid.	1,83 ml	1,61 ml	H ₂ O bid.	1,21 ml

2.8.6.2 Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen

Die Coomassie-Blau-Färbung wurde nach einer modifizierten Methode von MEYER und LAMBERTS (1965) durchgeführt. Das Gel wurde für ≥ 1 h in der Färbelösung (0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 30 % (v/v) EtOH, 10 % (v/v) Essigsäure) gefärbt und anschließend in Entfärbelösung (30 % (v/v) EtOH, 10 % (v/v) Essigsäure) geschüttelt, bis der Hintergrund nahezu farblos war. Nachdem es mit Wasser gewaschen worden war, wurde das Gel für mehrere Stunden in 1 % Glycerinlösung gelegt. Zur Dokumentation wurden die Gele auf Filterpapier bei 80°C im Gelrockner getrocknet oder mit dem Kodak-Imager aufgenommen und ausgewertet.

2.8.6.3 Transfer von Proteinen auf Membranen (Western blotting)

Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf positiv geladene Nylonmembranen (GERSHONI und PALADE, 1982) erfolgte mit dem MilliBlot Graphite Electroblotter System nach dem Semi-Dry Verfahren (KYHSE-ANDERSEN, 1984).

Puffer

Anodenpuffer I (pH 10,4)	0,3 M Tris 20 % Methanol
Anodenpuffer II (pH 10,4)	0,025 M Tris 20 % Methanol
Kathodenpuffer (pH 9,4)	0,025 M Tris 0,04 M Glycin 20 % Methanol

Das Gel wurde ca. 15 min in Kathodenpuffer bei RT äquilibriert. Die Blotmembran (Immobilon P) wurde 15 sec in Methanol aktiviert, 15 sec in H₂O bid. gewaschen und anschließend in Anoden-puffer II für 5 min äquilibriert. Es wurde Whatman 3MM Filterpapier verwendet. Der Blot wurde nach Herstellerangaben (Millipore) aufgebaut. Die Proteine wurden bei einer Stromstärke von 2,5 mA/cm² für 30 min transferiert. Das Gel wurde anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt (2.8.6.2).

2.8.6.4 Immunologischer Nachweis der NOS

Die Blotmembran wurde für 1-2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in Blockierlösung (1 % (w/v) Magermilchpulver in PBS/0,05 % Tween) inkubiert. Nach drei Waschschritten (je 5 min) mit PBS/0,05 % Tween folgte eine einstündige Inkubation in Erstantikörper. Der Antikörper wurde in PBS/0,05 % Tween nach Bedarf verdünnt: α NOS-Ip: 2000-fach bzw. α NOS-IIp: 1000-fach. Die Membran wurde erneut dreimal in PBS/0,05 % Tween gewaschen.

Als Zweitantikörper diente Kaninchen-IgG-Antikörper, an den eine Meerrettichperoxidase gekoppelt war. Er wurde 5000-fach in PBS/0,05 % Tween + 0,1 % (w/v) Milchpulver verdünnt und 1 h bei RT inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS erfolgte die Detektion mit dem ECL-System nach Herstellerangaben (ECL Western blotting protocols, 1993).

2.8.6.5 „Stripping“ von Blotmembranen

Mit „Stripping“ bezeichnet man die Entfernung von primärem und sekundärem Antikörper von der Blotmembran, um den Nachweis zu wiederholen oder aber einen anderen Nachweis anzuschließen. Die Blotmembran wurde dazu in 20 ml Stripping-Puffer (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 2 % SDS) mit 2 % frisch zugesetztem β -Mercaptoethanol gelegt und für 40-50 min bei 65°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Membran 4-5 mal in PBS für jeweils 10 min gewaschen. Für den nächsten Nachweis konnte die Membran nun erneut blockiert werden (2.8.6.4).

2.8.6.6 Amido-Schwarz-Färbung der Blotmembran

Nach der Detektion mit dem ECL-System wurden die Blotmembranen für 5 min in Amido-Schwarz-Färbelösung (0,1 % (w/v) Amido-Schwarz 10B, 25 % (v/v) EtOH, 5 % (v/v) Essigsäure) gelegt und anschließend in Entfärbelösung (90 % (v/v) Methanol, 2 % (v/v) Essigsäure, 8 % (v/v) H₂O bid.) geschüttelt, bis der Hintergrund weiß war. Die Membran wurde an der Luft getrocknet.

2.8.7 NOS-Quantifizierung

Zur genauen Aktivitätsbestimmung der Enzyme muß die NOS in den Zelllysaten quantifiziert werden. Hierzu wurden Gradientengele (2.8.6.1) verwendet (4-6 % Acrylamid für NOS-I und NOS-I-Mutanten), die im jeweiligen Molekulargewichtsbereich eine bessere Auflösung ermöglichen. Die Gele wurden mit Coomassie-Blau gefärbt (2.8.6.2) und anschließend auf dem Kodak Imager bei Raumlicht aufgenommen. Die Auswertung des Bildes erfolgte mit den Programmen Kodak 1D und SigmaPlot 4.01 (Jandel Scientific). Die NOS-I-Bande wurde über die Positivkontrolle (kommerziell erhältliche NOS-I von Sigma oder Calbiochem) identifiziert. Die Intensitäten der einzelnen Banden wurden analysiert, in SigmaPlot summiert und gleich 100 % gesetzt. Der prozentuale Anteil der NOS an der Gesamtproteinmenge ergab sich so aus dem prozentualen Anteil der einzelnen Bandenintensitäten im Verhältnis zur Gesamtintensität.

2.9 NOS-Aktivitätsstudien

2.9.1 Tritiumassay

Der Tritiumassay bietet die Möglichkeit, die NO-Produktion der NOS über das zweite Produkt, L-Citrullin, nachzuweisen. Hierzu wird die NOS mit radioaktiv markiertem L-Arginin inkubiert, das zu NO und L-Citrullin umgesetzt wird. Die Menge an gebildetem L-Citrullin läßt sich leicht nachweisen, während man das kurzlebige NO nur mittels aufwendiger Methoden messen kann.

Der Tritiumassay wurde nach KNOWLES und SALTER (1998) durchgeführt. Die Inkubation der NOS erfolgte in einem Volumen von 120 µl für 10 min bei 37°C. Es wurden 100 µl Inkubationspuffer eingesetzt. Die Gesamtproteinmenge betrug jeweils ca. 100 µg. Zum Abstoppen der Reaktion wurde der Reaktionsansatz in 1,5 ml aktiviertes Kationenaustauschermaterial (Dowex 50W) pipettiert. Das nicht umgesetzte L-Arginin band an das Austauschermaterial, das L-Citrullin blieb im Überstand. Der Ansatz wurde mit 5 ml H₂O bid. durchmischt und man ließ das Austauschermaterial wieder sedimentieren. Vom Überstand wurden 4 ml in 16 ml Szintillationsflüssigkeit pipettiert und im Szintillationszähler vermessen. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz, der anstelle von Zelllysat H₂O bid. enthielt.

Kaliumphosphatpuffer (500 mM): Lösung A = 500 mM KH₂PO₄; Lösung B = 500 mM K₂HPO₄; die Lösungen wurden in einem Verhältnis A:B = 1:3,274 gemischt, um einen pH-Wert von 7,2 zu erhalten.

Inkubationspuffer: 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2, 1,2 mM L-Citrullin, 1,2 mM MgCl₂, 240 µM CaCl₂, 120 µM NADPH, 24 µM L-Arginin (unmarkiert), 1 µM CaM, 1 µCi L-³H-Arginin. Für einige Versuche wurde das CaCl₂ durch EGTA ersetzt.

Dowex-Aktivierung

Das Dowex (Dowex 50W, 200-400 mesh, 8 %) muß zur Aktivierung von der H⁺- in die Na⁺-Form überführt werden. Zunächst wurde es in H₂O bid. aufgequollen und dann mit dem 10-fachen Volumen 1 M NaOH gewaschen. Anschließend wurde es so lange in H₂O bid. gewaschen, bis der pH-Wert unter 8 lag. Das Dowex wurde als 2-fach verdünnte Suspension bei 4°C aufbewahrt.

2.9.2 Griessassay

Der Griessassay bietet eine weitere Möglichkeit, die NOS-Aktivität zu messen. Die Produktion von Stickoxid kann unter anderem über seine stabilen Reaktionsprodukte Nitrit und Nitrat nachgewiesen werden. Das Nitrat wird durch die Nitratreduktase vollständig zu Nitrit reduziert. Die Umsetzung von Nitrit mit den Griess-Reagenzien Sulfanylamid und Naphthylethylen-Diamin ergibt ein Azo-Derivat, das bei einer Wellenlänge von 540 nm spektralphotometrisch gemessen werden kann (Abb. 2.4).

Die Inkubation des Zelllysates erfolgte leicht abgewandelt wie bei ABU-SOUD und STUEHR (1993) beschrieben für 1-2 h bei 37°C im Inkubationspuffer (IP). Es wurden zwei verschiedene Inkubationspuffer eingesetzt: ein Ca^{2+} -haltiger Puffer (Ca^{2+} -IP) und ein Puffer ohne Ca^{2+} (EGTA-IP). Die Reaktion wurde mit 1 mM NADPH gestartet. Das Inkubationsvolumen betrug 200 μl und es wurden Gesamtproteinmengen von 50-200 μg eingesetzt. Da NADPH die Griessfarbreaktion stört (SCHMIDT, 1995), wurde es mittels L-Lactat-Dehydrogenase (2,75 U) und Natriumpyruvat (7,5 mM) für 5 min bei 37°C oxidiert. Anschließend wurden die Proben durch einen Filter mit 10.000 MW Ausschluß filtriert (Microcon MWCO 10K von Millipore).

Griess-Reaktion (nach FELDMAN et al., 1993)

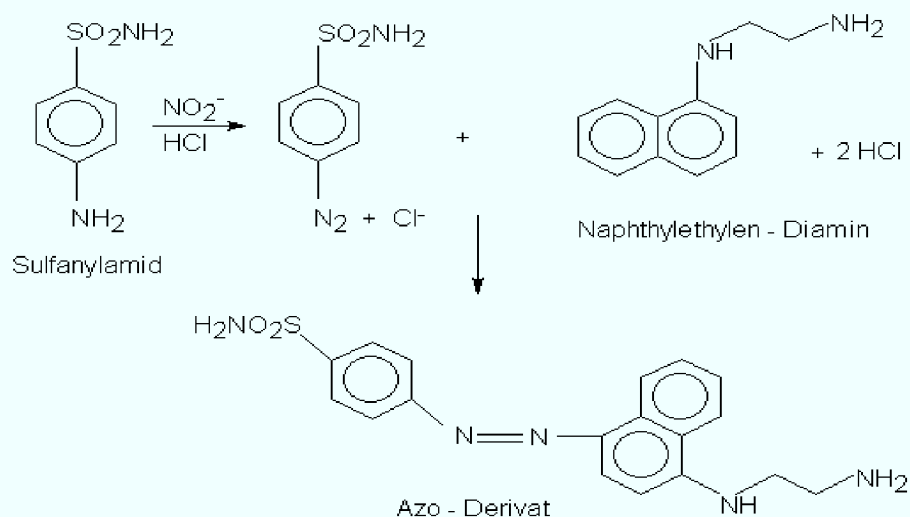


Abb. 2.4: Reaktionsmechanismus der Griess-Reaktion.

Für die Nitratreduktion und Griessreaktion wurde das Kit „Total NO“ von R&D Systems verwendet und die Reaktionen erfolgten nach Herstellerangaben. Es wurde eine Kalibriergerade mit Nitrat über den Bereich von 3,12 bis 100 µM erstellt. Die spektralphotometrische Messung bei 540 nm erfolgte mit einem Microplatereader von BioRad.

Tris+PI: 0,1 mM PMSF, 2 µg/ml Pepstatin, 2 µg/ml Leupeptin in 40 mM Tris/HCl pH 7,9

Ca²⁺-Inkubationspuffer: Tris+PI + 2 mM L-Arginin, 3 mM DTT, 0,83 mM CaCl₂, 10 µg/ml CaM, 600 µM EDTA, 4 µM Tetrahydrobiopterin, 4 µM FMN, 4 µM FAD

EGTA-Inkubationspuffer: Tris+PI + 2 mM L-Arginin, 3 mM DTT, 600 µM EDTA, 10 µg/ml CaM, 4 µM Tetrahydrobiopterin, 4 µM FMN, 4 µM FAD

2.10 Statistische Auswertung der Daten

Aus den Einzelergebnissen einer Meßreihe wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung vom Mittelwert (Std.) nach folgender Formel berechnet:

$$Std. = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n^2}}$$

Die Signifikanz der Abweichung zweier Mittelwerte voneinander wurde mit dem Student'schen t-Test überprüft. Es wurde ein zweiseitiger Test mit unterschiedlichen Varianzen (heteroskedastisch) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ verwendet.

Bei dem Chiquadrat-Test handelte es sich um eine Routine des Programms BIAevaluation 3.0. Die Chiquadrat-Verteilung wurde dem Freiheitsgrad entsprechend für $p \leq 0,05$ einer statistischen Tabelle entnommen. Der Freiheitsgrad errechnete sich aus der Anzahl der zu untersuchenden Parameter weniger eins.

Parameter für den *speraraten Fit* von k_a : k_a , R_{max} (maximale Analytbindung in RU), $Conc$ (Konzentration an Analyt), t_0 (Zeitpunkt der Injektion), k_d und RI (Puffersprung).

Parameter für den *speraraten Fit* von k_d : k_d , R_0 (Signal zu Beginn des Auswertungsbereiches), t_0 und Offset.

Parameter für den *simultanen Fit* mit Massentransfer: t_{On} & t_{Off} (Injektionsstart und -ende), RI , $Conc$, R_{max} , k_a , k_d , Req (Resonanzsignal nach Einstellung des Gleichgewichtes) und k_t (Massentransportkonstante).

3 Ergebnisse

Es sind drei Isoformen der NO-Synthase bekannt. Davon werden zwei Isoformen Ca^{2+} -abhängig über Ca^{2+} /Calmodulin (Ca^{2+} /CaM) reguliert (NOS-I und -III). Die dritte Isoform (NOS-II) zeigt eine Ca^{2+} -unabhängige Aktivität und bindet auch an Ca^{2+} -freies Calmodulin (ApoCaM). Alle drei Isoformen haben ein klassisches Ca^{2+} /CaM-Bindungsmotiv. Vergleicht man die putativen CaM-Bindungsstellen von NOS-I und NOS-II, so fallen vier nicht konservative Aminosäureaustausche auf. Ziel dieser Arbeit war es, anhand von Peptidstudien die Relevanz dieser Aminosäuren für die Affinität und Ca^{2+} -Abhängigkeit der CaM-Bindung zu untersuchen. Es wurden Peptidmutanten hergestellt (3.1), die eine, drei oder vier reziprok ausgetauschte Aminosäuren trugen. Mit diesen Peptiden wurden CaM-Bindungsstudien in Form von ITC- (3.2) und SPR-Messungen (3.3) durchgeführt. Die Experimente deuteten auf Aggregationsprobleme der NOS-II WT-Peptide hin. Daher wurden einige Peptide mittels Größenausschlußchromatographie (3.4) auf Aggregatbildung hin untersucht.

Parallel dazu sollten die Effekte dieser Punktmutationen in den CaM-Bindungsstellen im Enzym untersucht werden. Die dreifachen und vierfachen Mutationen wurden in die jeweiligen NOS WT-Enzyme eingeführt (3.6). Zusätzlich wurde eine Einfachmutante der NOS-I hergestellt. Die Mutanten wurden wie die Wildtypen heterolog exprimiert (3.7) und auf ihre NO-Synthaseaktivität hin untersucht (3.8).

Peptid-Calmodulin-Bindungsstudien

3.1 Peptide

Für das NOS-I WT-Peptid wurde der Bereich der NOS-I aus der Ratte (AS 725-754) ausgewählt (VORHERR et al., 1993). Für das etwas kürzere Peptid (AS 725-747 bzw. -750) konnte schon in anderen Arbeiten gezeigt werden, daß die Bindung an CaM dem Bindungsverhalten der NOS-I entsprach (ZHANG und VOGEL, 1994; ZOCHÉ et al., 1996). Zur Untersuchung der NOS-II-CaM-Bindung wurde zunächst ein Peptid der NOS-II aus Mausmakrophagen (mmNOS-II WT) synthetisiert, das dem Bereich (AS 503-528) des Enzyms entspricht. In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, daß dieser Bereich aus der CaM-Bindungsstelle der NOS-II für die CaM-Bindung in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} ausreicht (ZOCHÉ et al., 1996). Die vier kritischen Aminosäuren (1.4.4) wurden z.T. einzeln, in Dreier- oder Vierergruppen ausgetauscht. Hierbei erhielten die NOS-I-Peptide die korrespondierenden Aminosäuren der NOS-II-Sequenz und umgekehrt. In Abb. 3.1 sind die Wildtyppeptide und die Mutanten dargestellt. Die Mutanten wurden nach den jeweiligen

mutierten Aminosäuren im Einbuchstabencode benannt. Bei Einzelmutationen ist außerdem die Position und die ausgetauschte Aminosäure mit aufgeführt. Zusätzlich zum Wildtyppeptid aus Mausmakrophagen wurde noch ein Peptid synthetisiert, das der CaM-Bindungsstelle der humanen hepatischen NOS-II (AS 509-532) entspricht (hhNOS-II WT).

	optionale Modifizierung	733	736	739	743
	↓	↓	↓	↓	↓
NOS-I WT	(C) K R R A I G F K K L A E A V K F S A K L M G Q A M A K R V K				
NOS-I E736K	(C) K R R A I G F K K L A E A V K F S A K L M G Q A M A K R V K				
NOS-I VFM	(C) K R R A I G F K V L A E A V F S A M L M G Q A M A K R V K				
NOS-I VKF	(C) K R R A I G F K V L A K A V F S A K L M G Q A M A K R V K				
NOS-I VKFM	(C) K R R A I G F K V L A K A V F S A M L M G Q A M A K R V K				
		511	514	517	521
		↓	↓	↓	↓
mmNOS-II WT	(C) R R R E I R F R V L V K V V F F A S M L M R K V M A				
NOS-II V511K	(C) R R R E I R F R K L V K V V F F A S M L M R K V M A				
NOS-II K514E	(C) R R R E I R F R V L V E V V F F A S M L M R K V M A				
NOS-II F517K	(C) R R R E I R F R V L V K V V K F A S M L M R K V M A				
NOS-II M521K	(C) R R R E I R F R V L V K V V F F A S K L M R K V M A				
NOS-II 3K	(C) R R R E I R F R K L V K V V K F A S K L M R K V M A				
NOS-II E3K	(C) R R R E I R F R K L V E V V K F A S K L M R K V M A				
hhNOS-II WT	(Biotin) K R R E I P L K V L V K A V L F A C M L M R K T M A				
		↑	↑	↑	↑
		517	520	523	527

Abb. 3.1: Sequenzen der verwendeten Peptide. Die Mutationen sind grau hinterlegt. Die Nummern entsprechen der Aminosäureposition im jeweiligen Wildtypenzym. Die optionale Modifizierung mit Cystein oder Biotin diente der Peptidimmobilisierung in SPR-Studien. mmNOS-II WT steht für die NOS-II aus Mausmakrophagen, hhNOS-II WT für die humane hepatische NOS-II. Die NOS-II-Mutanten basieren alle auf der Sequenz der NOS-II aus Mausmarkrophagen.

Alle Peptide wurden zunächst qualitativ auf ihre CaM-Bindung hin untersucht. Dies geschah mittels Gelshiftexperimenten nach ERICKSON-VIITANEN und DEGRADO (1987) in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} . Eine ausführliche Beschreibung des Assays und der Ergebnisse für die Peptide NOS-I WT, NOS-I VFM, NOS-II 3K, NOS-II V511K, NOS-II F517K und NOS-II M521K findet sich bei TWELKER (1998). Hier konnte für alle sechs Peptide in Anwesenheit von Ca^{2+} eine Bindung an CaM gezeigt werden, während keines der Peptide in Abwesenheit von Ca^{2+} an CaM band. Die restlichen Peptide zeigten mit einer Ausnahme das gleiche Verhalten. Für beide NOS-II WT-Peptide konnte keine ApoCaM-Bindung gezeigt werden. Für das Peptid NOS-II K514E konnte weder in An- noch in Abwesenheit von Ca^{2+} eine

Bindung an CaM gezeigt werden. Die Gelshiftexperimente sind im Anhang (5.1) einzeln aufgeführt.

3.2. Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Die isotherme Titrationskalorimetrie (2.3.2) bietet die Möglichkeit, Interaktionen zwischen einem Liganden und einem Analyten zu untersuchen. Das Kalorimeter mißt die Bindungsenthalpie (ΔH), indem es eine Meßzelle, in der die Bindungsreaktion stattfindet, und eine Referenzzelle auf gleicher Temperatur hält. Bei einer exothermen Reaktion entstehen so negative und bei einer endothermen Reaktion positive Signale. Eine definierte Menge an Analyt wird wiederholt in die Meßzelle des Kalorimeters injiziert und die Wärmeänderung pro Injektion ermittelt. Aus der Änderung der eingesetzten Wärme und den Konzentrationen an Ligand und Analyt lassen sich die Bindungsenthalpie ΔH , die Bindungskonstante K_A und die Bindungsstöchiometrie N ermitteln. Über den Zusammenhang

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S = - R T \ln K_A$$

lassen sich die freie Bindungsenergie ΔG und die Bindungsentropie ΔS errechnen (R = Gaskonstante; T = Temperatur in Kelvin). Außerdem ergibt sich die Dissoziationskonstante K_D als reziproker Wert aus K_A .

Ein Vorteil der Methode ist, daß die Reaktion in freier Lösung im gewünschten Puffer ablaufen kann. Weder muß einer der Bindungspartner immobilisiert, noch markiert werden. Ein Nachteil ist, daß für ein detektierbares Signal, Analyt und Ligand in mikromolaren Konzentrationen benötigt werden. Deswegen können Bindungsaffinitäten im subnanomolaren Bereich nicht mehr detektiert werden, da in dem Fall die Konzentration an ungebundenem Liganden unterhalb der Detektionsgrenze des Gerätes liegt (DOYLE, 1997).

Um die Interaktionen zwischen den NOS-Peptiden und CaM zu untersuchen, wurde CaM in der Meßzelle vorgelegt und das jeweilige Peptid in Mengen von 0,5 bzw. 1 nmol injiziert. Die umgekehrte Konfiguration wurde nur in seltenen Fällen gewählt, da hierfür sehr große Mengen an CaM nötig waren. Es wurden Messungen in Ca^{2+} - wie auch in EGTA-Puffer durchgeführt.

3.2.1 Kontrollmessungen und Auswertung der Daten

Bei jeder Injektion in die Meßzelle entsteht ein exothermes oder endothermes Signal durch Mischungswärme. Läuft das Signal einer Messung auf eine Sättigung aus, so sollten die Signale in der Sättigung im Idealfall der Mischungswärme entsprechen. Durch Kontrollmessungen kann die Mischungswärme bestimmt werden. Die Kontrollmessungen

sind am Beispiel des Peptides NOS-I WT in Abb. 3.2 dargestellt. Für beide Puffer wurde jeweils eine Kontrolle mit Peptid (A und C) und eine Kontrolle mit CaM (B und D) durchgeführt. Hierbei zeigte sich gleichzeitig ein Problem der Messungen: In A sieht man, daß vor der nächsten Injektion die Basislinie nur sehr verzögert wieder erreicht wurde. Dieses „Verschleppen“ des Signals störte die Datenauswertung. Daher wurden in späteren Messungen die zeitlichen Abstände zwischen den Injektionen von 240 auf 400 sec vergrößert (C).

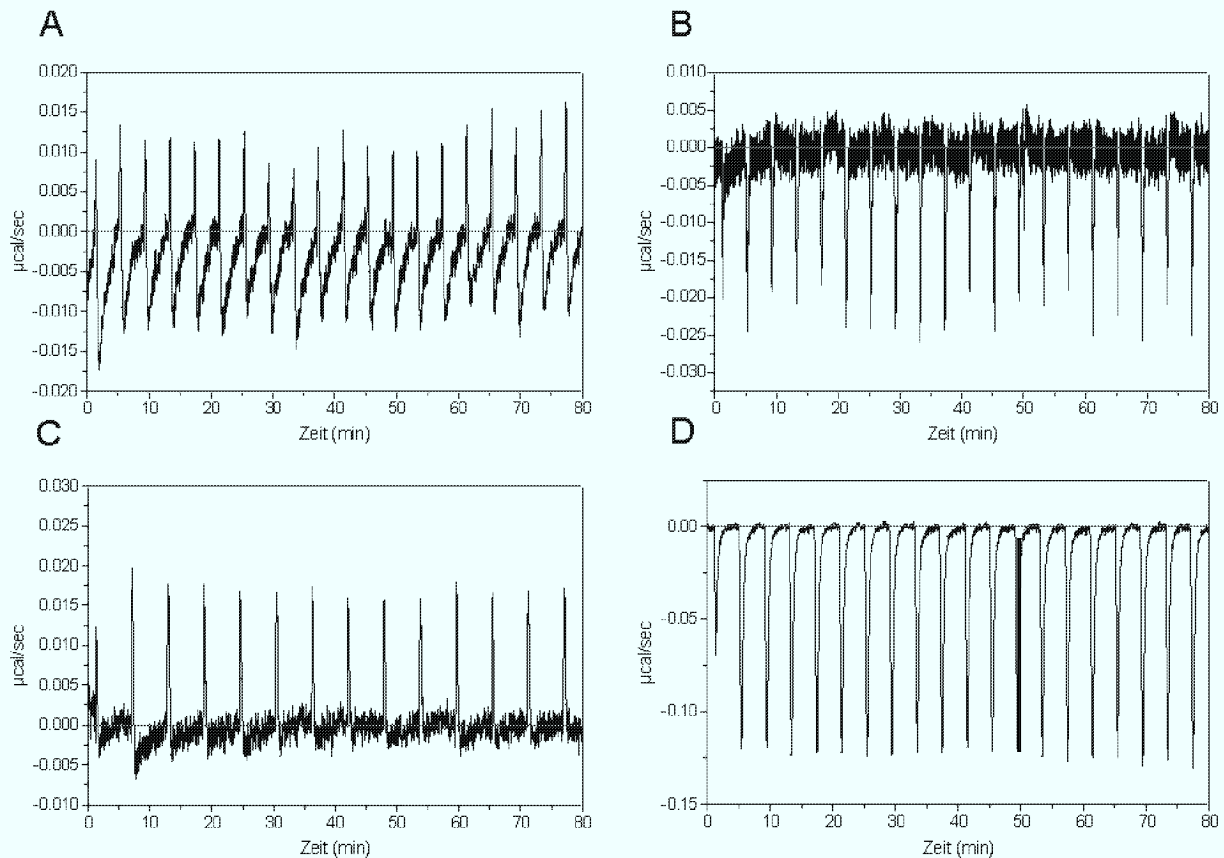


Abb. 3.2: ITC-Kontrollmessungen am Beispiel von NOS-I WT. Mit Ausnahme von Messung (C) fanden die Injektionen alle 240 sec statt. **A** Injektionen von 1 nmol NOS-I WT in Ca^{2+} -Puffer, **B** Injektionen von Ca^{2+} -Puffer in 8 μM Ca^{2+} /CaM, **C** Injektionen von 1 nmol NOS-I WT in EGTA-Puffer (verlängerter Abstand zwischen den Injektionen: 400 sec), **D** Injektionen von EGTA-Puffer in 8 μM ApoCaM.

Bei den durchgeführten Messungen lagen die exothermen Signale zwischen -0,1 und -0,4 $\mu\text{cal/sec}$, die endothermen Signale zwischen +0,1 und +0,6 $\mu\text{cal/sec}$. Es handelte sich dabei um relativ kleine Signale. Um größere Signale zu erhalten, hätten weitaus höhere Konzentrationen an Peptid und CaM im gleichen molaren Verhältnis eingesetzt werden müssen. Der Nachteil der kleinen Signale war, daß die Mischungswärme $\geq 10\%$ des Signals ausmachte. Zog man die Mischungswärme von den relativ kleinen Meßsignalen ab, so fielen kleine Schwankungen in den Kontrollsignalen stark ins Gewicht. Daher erfolgte die

Auswertung nach der unter 2.3.2 beschriebenen Methode. Ein Beispiel für eine ITC-Messung (A) mit Auswertung (B) ist in Abb. 3.3 dargestellt.

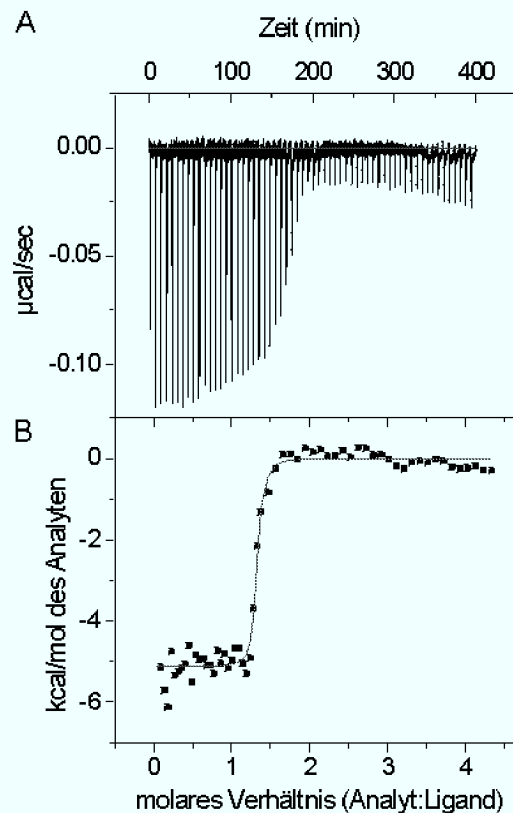


Abb. 3.3: Beispiel für eine ITC-Messung. Die Messung wurde mit dem Peptid NOS-I VKFM in Ca^{2+} -Puffer durchgeführt. **A** Rohdaten der Messung. **B** Datenauswertung mit Ergebnis der Kurvenanpassung. Die Daten wurden normiert. Die erste Injektion wurde nicht in die Auswertung einbezogen (2.3.2).

Für ITC-Messungen ist eine exakte Einstellung der Konzentration von Analyt und Ligand von großer Bedeutung, da die Auswertung der thermodynamischen Daten auf diesen Angaben basiert. Es stellte sich heraus, daß eine Konzentrationsbestimmung des Peptides über die Absorption bei 205 nm (2.2.2.) zu ungenau war. Daher wurde die Konzentrationsbestimmung über freie Cysteingruppen (2.2.3) vorgezogen. Ein weiteres Problem bestand in der unterschiedlich guten Löslichkeit verschiedener kommerziell erhältlicher CaM-Präparationen. Am deutlichsten zeigte sich eine ungenaue Einstellung der Konzentrationen im ermittelten Wert „N“ für die Bindungsstöchiometrie. Da bei dem Peptid NOS-I WT von einer 1:1-Bindung an Ca^{2+} /CaM ausgegangen werden kann (ZHANG und VOGEL, 1994), sollte der Wert für N nahe bei 1 liegen. In den ersten Messungen schwankte der Wert für N zwischen 2,2 und 0,62. Erst nachdem die Konzentrationsbestimmungen optimiert waren, wurde ein Wert von

$N = 0,91 \pm 0,16$ gemessen. Bei einigen Peptiden der NOS-I und NOS-II konnte keine Stöchiometrie $N \approx 1$ gemessen werden (Tab. 3.1, 3.3 und 3.5).

3.2.2 Bindung des NOS-I WT-Peptides und seiner Mutanten an $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$

Die Peptide NOS-I E736K und NOS-I VKF wurden in der N-terminal modifizierten und der nicht modifizierten Version für die Messungen eingesetzt. Für das Peptid NOS-I VKFM konnte nur mit der nicht modifizierten Version eine $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Bindung gemessen werden. Eventuell störte das endständige Cystein hier die zur $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Bindung notwendige Peptidkonformation.

Abbildung 3.4 zeigt vier repräsentative Messungen der NOS-I-Peptide im Vergleich. Es sind die Daten und die Ergebnisse der Kurvenanpassung dargestellt.

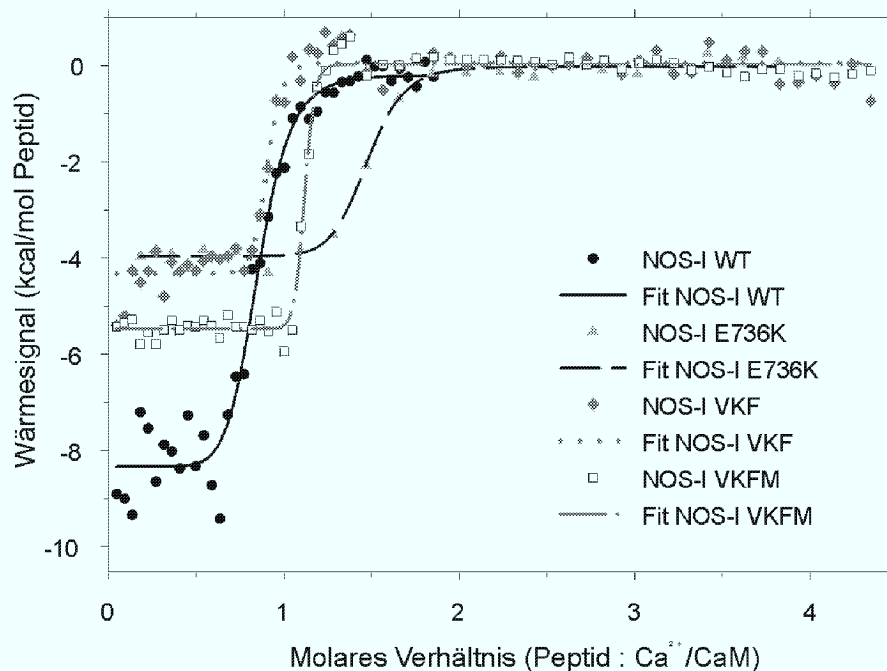


Abb. 3.4: Darstellung vier repräsentativer ITC-Messungen in Ca^{2+} -Puffer mit allen vier NOS-I-Peptiden. Es sind sowohl die Daten, als auch die Ergebnisse der Kurvenanpassung (Fit) dargestellt. Die Daten wurden normiert. Die erste Injektion wurde nicht in die Auswertung einbezogen (2.3.2). Die dazugehörige Auswertung findet sich in Tab. 3.1. Die Titrationen wurden bis zu einem molaren Verhältnis von 4,5:1 durchgeführt.

In Tabelle 3.1 sind alle Auswertungen der Messungen für NOS-I WT und die NOS-I-Mutanten aufgeführt.

Tab. 3.1: Ergebnisse der ITC-Messungen mit dem Peptid NOS-I WT und seinen Mutanten in Ca^{2+} -Puffer.

Peptid	K_A (M^{-1})	K_D (nM)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol/K)	ΔG (kJ/mol)	N	n
NOS-I WT ¹	$1,6\text{e}^7 \pm 4,6\text{e}^6$	$64,5 \pm 18,8$	$-30,4 \pm 9,2$	$36,2 \pm 30,4$	-41,1	$0,91 \pm 0,16$	7
NOS-I E736K ²	$1,8\text{e}^7 \pm 3,0\text{e}^6$	$54,9 \pm 9,2$	$-34,5 \pm 16,3$	$23,4 \pm 53,35$	-41,5	$1,08 \pm 0,34$	2
NOS-I VKF ²	$4,9\text{e}^7 \pm 2,8\text{e}^7$	$20,3 \pm 11,7$	$-29,3 \pm 7,9$	$51,0 \pm 31,3$	-44,4	$0,99 \pm 0,31$	2
NOS-I VKFM ³	$2,3\text{e}^8 \pm 1,7\text{e}^8$	$4,4 \pm 3,2$	$-21,5 \pm 5,4$	$90,9 \pm 25,7$	-48,6	$1,38 \pm 0,39$	3

n = Anzahl der Experimente. Die Daten wurden über die angegebene Anzahl an Experimenten gemittelt und die Standardabweichung des Mittelwertes berechnet. K_A = Assoziationskonstante, K_D = Dissoziationskonstante, ΔH = Bindungsenthalpie, ΔS = Bindungsentropie, ΔG = freie Bindungsenergie und N = Bindungsstöchiometrie. Die ΔS -Standardabweichungen für NOS-I WT und NOS-I E736K sind hoch, da hier Messungen mit positiver und negativer Bindungsentropie in die Auswertung eingegangen sind. ¹ Messungen mit N-terminal modifiziertem Peptid; ² Messungen mit modifiziertem und nicht modifiziertem Peptid; ³ Messungen mit nicht modifiziertem Peptid.

Es wurden zahlreiche Messungen mit dem NOS-I WT-Peptid in Anwesenheit von Ca^{2+} durchgeführt. Hierbei ergab sich in fünf von sieben Messungen ein positiver Wert für ΔS , in zwei Messungen dagegen ein negativer Wert. Für das Peptid NOS-I E736K wurde ebenfalls ein positiver und ein negativer Wert für ΔS ermittelt.

Es fällt auf, daß mit steigender Zahl an Mutationen die Affinität zu $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ zunahm. Gleichzeitig wurde ΔG stärker negativ. In allen Fällen war die Bindungsentropie positiv und die Bindungsenthalpie negativ. Es handelte sich immer um eine enthalpiegetriebene Reaktion. Die thermodynamischen Daten sind graphisch in Abbildung 3.5 zusammengefaßt.

Während die Punktmutation E736K nur eine Erhöhung der Affinität um den Faktor 1,2 bewirkte, führte der Austausch von 3 Aminosäuren (Mutante VKF) zu einer Erhöhung der $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ Affinität um das 2,7-fache. Der zusätzliche Austausch K743M (Mutante VKFM) verringerte die Dissoziationskonstante nochmals um das 4,7-fache. Damit hatte die Mutante NOS-I VKFM eine ca. 15-fach höhere Affinität zu $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ als der Wildtyp.

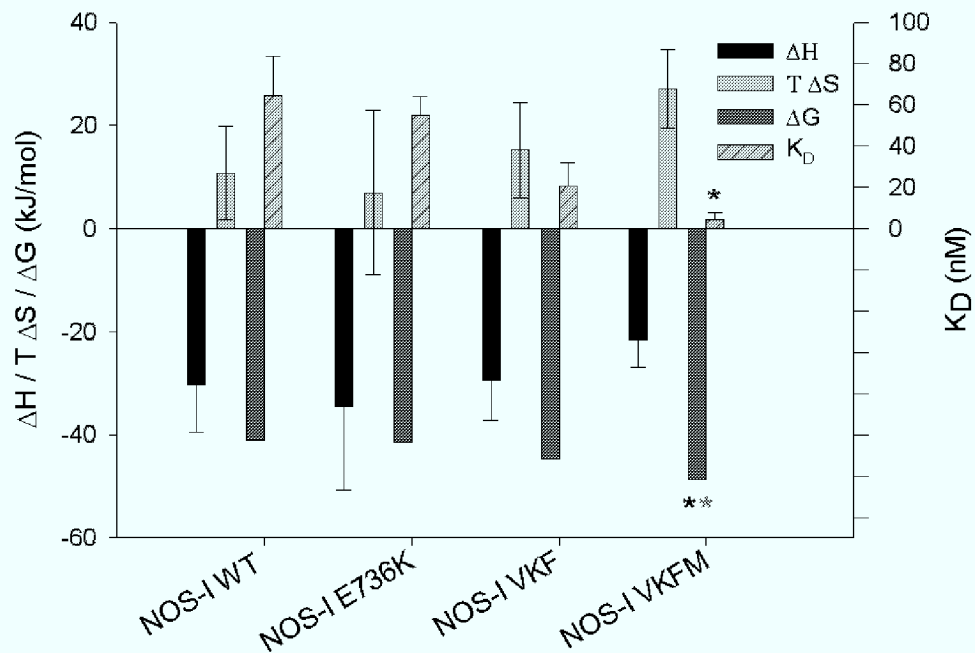


Abb. 3.5: Graphische Darstellung der thermodynamischen Daten der Bindung von NOS-I WT, NOS-I E736K, NOS-I VKF und NOS-I VKFM an $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Bindungsenthalpie (schwarzer Balken), Bindungsentropie multipliziert mit der Temperatur (298 K; hellgrauer Balken), freie Bindungsenergie (dunkelgrauer Balken) und Dissoziationskonstante (hellgrauer, gestreifter Balken). Der schwarze Stern kennzeichnet signifikante Abweichungen von den Messungen mit NOS-I WT ($p < 0,05$). Der graue Stern kennzeichnet signifikante Abweichungen von den Messungen mit NOS-I E736K ($p < 0,05$).

Tab. 3.2: Statistische Auswertung der ermittelten Dissoziationskonstanten aus den Messungen mit Ca^{2+} .

Mutation	Affinitätssteigerung	Irrtumswahrscheinlichkeit p	$0,05 \geq p$
NOS-I WT → NOS-I E736K	1,17-fach	0,499	nein
NOS-I WT → NOS-I VKF	3,2-fach	0,088	nein
NOS-I WT → NOS-I VKFM	14,75-fach	0,0001	ja
NOS-I E736K → NOS-I VKF	2,7-fach	0,152	nein
NOS-I E736K → NOS-I VKFM	12,5-fach	0,099	nein
NOS-I VKF → NOS-I VKFM	4,7-fach	0,396	nein

Die Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde mit einem heteroskedastischen Student'schen t-Test ermittelt. Als signifikant wurde eine Abweichung bezeichnet, wenn der Wert p unterhalb von 0,05 lag.

Mit dem Peptid NOS-I VFM konnte keine $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ - oder ApoCaM-Interaktion beobachtet werden. Obwohl das Peptid in den Gelshiftexperimenten eine CaM-Bindung in Anwesenheit

von Ca^{2+} gezeigt hatte (3.1), wurden in ITC-Messungen nur Signale gemessen, die keinerlei Sättigung aufwiesen. Die Verwendung von N-terminal nicht modifiziertem Peptid ergab ebenfalls keine CaM-Bindung.

3.2.3 Bindung der NOS-I-Peptidmutanten an ApoCaM

Betrachtet man die Vergrößerung in Abbildung 3.6, so fällt auf, daß die NOS-I WT-Messung in EGTA-Puffer nicht wie die anderen Messungen eine S-förmige Kurve ergab. Die Daten fielen linear ab und erreichten selbst bei einem molaren Verhältnis Peptid:ApoCaM von 4,5 kein stabiles Plateau. Obwohl es sich eindeutig um Signale außerhalb des Hintergrundes handelte, kann man wegen des linearen Verlaufs nicht von einer spezifischen Bindung von NOS-I WT an ApoCaM ausgehen. Auch eine weitere Titration bis zu einem molaren Verhältnis von 6:1 führte nicht zu einer Sättigung des Signals.

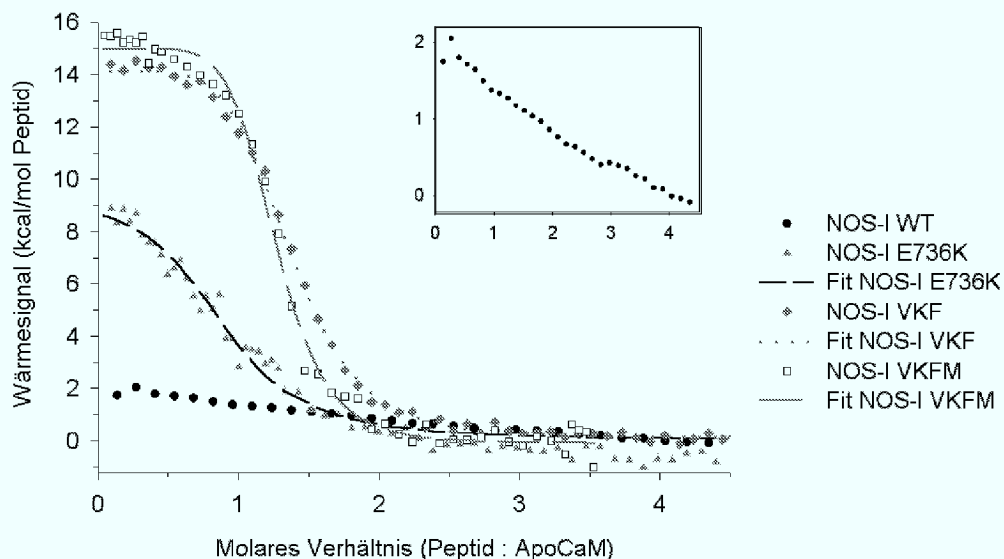


Abb. 3.6: Darstellung vier repräsentativer ITC-Messungen in EGTA-Puffer mit den vier NOS-I-Peptiden. Es sind sowohl die Meßdaten, als auch die Ergebnisse der Kurvenanpassung (Fit) dargestellt. Die Daten wurden normiert. Die erste Injektion wurde nicht in die Auswertung einbezogen (2.3.2). Die dazugehörige Auswertung findet sich in Tab. 3.3. Die Vergrößerung zeigt die Messung mit NOS-I WT-Peptid in EGTA-Puffer genauer.

Die Auswertung aller NOS-I-Messungen in EGTA-Puffer ist in Tabelle 3.3 aufgelistet.

Tab. 3.3: Ergebnisse der ITC-Messungen mit dem Peptid NOS-I WT und seinen Mutanten in EGTA-Puffer.

Peptid	K_A (M^{-1})	K_D (nM)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol/K)	ΔG (kJ/mol)	N	n
NOS-I WT ¹	<i>Linear abfallende, endotherme Signale ohne Sättigung</i>						2
NOS-I E736K ²	$7,3e^5 \pm 3,4e^5$	1363 ± 643	$29,8 \pm 10$	$213,2 \pm 37,2$	-33,7	$1,3 \pm 0,34$	4
NOS-I VKF ¹	$2,8e^6 \pm 2,3e^5$	$356 \pm 29,5$	$57,7 \pm 4,9$	$317,1 \pm 17,1$	-36,8	$1,7 \pm 0,33$	2
NOS-I VKFM ²	$5,5e^6 \pm 1,6e^6$	$182 \pm 50,9$	$55,4 \pm 13,6$	$315,1 \pm 45,2$	-38,5	$1,7 \pm 0,4$	3

n = Anzahl der Experimente. Die Daten wurden über die angegebene Anzahl an Experimenten gemittelt und die Standardabweichung des Mittelwertes berechnet. K_A = Assoziationskonstante, K_D = Dissoziationskonstante, ΔH = Bindungsenthalpie, ΔS = Bindungsentropie, ΔG = freie Bindungsenergie und N = Bindungsstöchiometrie.

¹ Messungen mit N-terminal modifiziertem Peptid; ² Messungen mit modifiziertem und nicht modifiziertem Peptid. Die Daten der NOS-I WT-Messungen entsprachen nicht dem mathematischen Modell der Kurvenanpassung (2.3.2).

Schon eine Punktmutation in der NOS-I-CaM-Bindungssequenz reichte aus, um ein Peptid zu erzeugen, das an ApoCaM binden konnte. Die Mutation E736K führte zu einer Dissoziationskonstante für die Bindung an ApoCaM von 1,36 μM . Es handelte sich um eine endotherme Bindungsreaktion mit einem positiven Wert für ΔH . Da eine Reaktion nur dann spontan abläuft, wenn die freie Bindungsenergie ΔG einen negativen Wert annimmt, mußte ΔS einen hohen, positiven Wert annehmen. Es handelte sich um eine entropiegetriebene Reaktion.

Die Dreifachmutante NOS-I VKF zeigte eine noch stärkere Affinität zu ApoCaM. Die zusätzlichen Mutationen K733V und K739F führten zu einer 3,8-fach niedrigeren Dissoziationskonstante. Auch hier handelte es sich um eine entropiegetriebene Reaktion mit einem 1,5-fach höheren Wert für ΔS im Vergleich zu der Punktmutante E736K.

Führte man die vierte Mutation K743M ein, so ergab sich eine Dissoziationskonstante von 182 nM, die im Vergleich mit den beiden anderen Peptiden signifikant niedriger war (Tab. 3.4). Das Peptid NOS-I VKFM hatte damit eine 7,5-fach höhere Affinität zu ApoCaM als die Punktmutante. Der entropische Anteil der Bindung entsprach ungefähr dem des Peptides NOS-I VKF.

In Abb. 3.7 sind die thermodynamischen Daten zusammengefaßt. Die statistische Auswertung der Dissoziationskonstanten findet sich in Tab. 3.4.

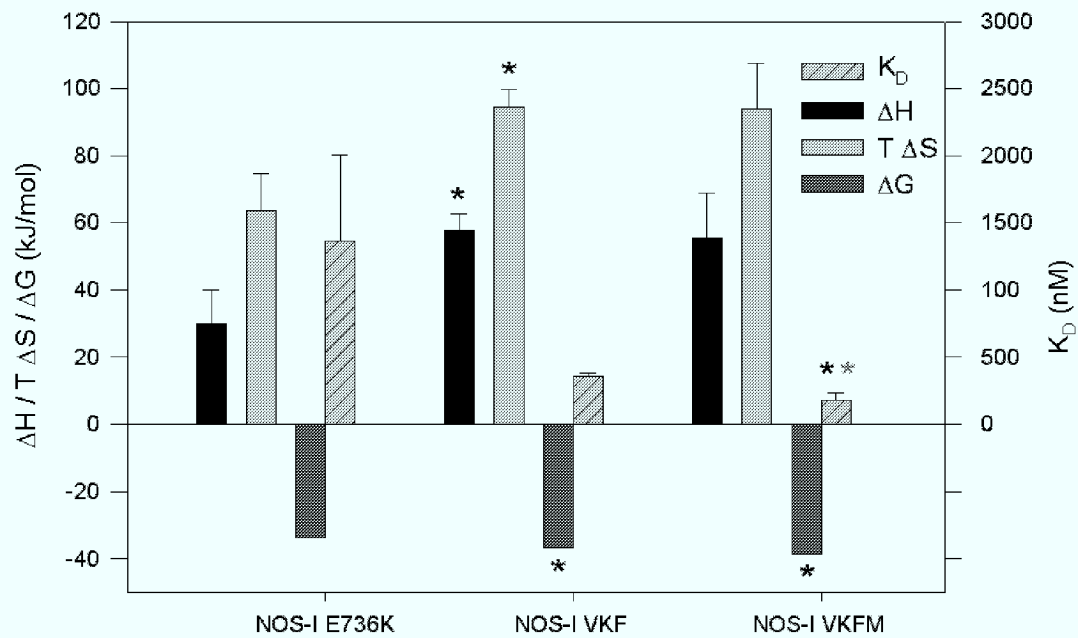


Abb. 3.7: Graphische Darstellung der thermodynamischen Daten der Bindung NOS-I WT, NOS-I E736K, NOS-I VKF und NOS-I VKFM an ApoCaM. Bindungsenthalpie (schwarzer Balken), Bindungsentropie multipliziert mit der Temperatur (298 K; hellgrauer Balken), freie Bindungsenergie (dunkelgrauer Balken) und Dissoziationskonstante (hellgrauer, gestreifter Balken). Der schwarze Stern kennzeichnet signifikante Abweichungen von den Messungen mit NOS-I E736K ($p < 0,05$). Der graue Stern kennzeichnet signifikante Abweichungen von den Messungen mit NOS-I VKF ($p < 0,05$).

Tab. 3.4: Statistische Auswertung der ermittelten Dissoziationskonstanten aus den Messungen mit NOS-I-Mutanten ohne Ca^{2+} .

Mutation	Affinitätssteigerung	Irrtumswahrscheinlichkeit p	$0,05 \geq p$
NOS-I E736K → NOS-I VKF	3,8 - fach	0,0725	nein
NOS-I E736K → NOS-I VKFM	7,58 - fach	0,0494	ja
NOS-I VKF → NOS-I VKFM	1,95 - fach	0,0355	ja

Die Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde mit einem heteroskedastischen Student'schen t-Test ermittelt. Als signifikant wurde eine Abweichung bezeichnet, wenn der Wert p unterhalb von 0,05 lag.

3.2.4 Bindung der NOS-II-Peptidmutanten an ApoCaM

NOS-II WT-Peptide

Es wurden zahlreiche Versuche mit dem Peptid mmNOS-II WT durchgeführt, um eine Bindung des Peptides an CaM im ITC nachzuweisen. Das Peptid wurde als N-terminal modifizierte und als nicht modifizierte Variante eingesetzt. Es wurden Messungen in Ca^{2+} - und in EGTA-Puffer durchgeführt. Die Konfiguration des Experiments in Ca^{2+} -Puffer wurde geändert, so daß das Peptid in der Meßzelle vorlag und CaM injiziert wurde. Es wurde zusätzlich eine längere Variante des Peptides eingesetzt (AS 503-532). In keiner Messung konnte eine Bindung des Peptides an Ca^{2+} /CaM oder ApoCaM beobachtet werden. Es wurden stets exotherme Signale beobachtet, die keine Sättigung erreichten. Die Signale lagen je nach Experiment entweder im Bereich des Hintergrundrauschens, oder es handelte sich um deutliche, stets gleich große Signale. Anschließend wurde das Peptid hhNOS-II WT getestet. Hiermit wurden Versuche in Ca^{2+} -Puffer bei 25°C und 35°C bis zu einem molaren Verhältnis von 6:1 durchgeführt. Versuche in EGTA-Puffer fanden bei 25°C statt. Es wurde stets die nicht biotinylierte Version des Peptides verwendet. Auch mit diesem Peptid konnte keine Ca^{2+} /CaM- oder ApoCaM-Bindung beobachtet werden. Es handelte sich um exotherme Signale, die die Signale der Kontrollinjektionen (Peptid in Puffer) nicht überstiegen.

Mutanten der mmNOS-II-Sequenz

Mit allen sechs Peptidmutanten der NOS-II wurden Messungen in Ca^{2+} -Puffer durchgeführt. Von den Punktmutanten wurde nur die N-terminal modifizierte Version eingesetzt, von der Dreifach- und Vierfachmutante sowohl die modifizierte, als auch die nicht modifizierte Version. In keinem Fall konnte eine Bindung an Ca^{2+} /CaM beobachtet werden. Es wurden stark schwankende, exotherme oder endotherme Signale beobachtet, die z.T. im Hintergrundrauschen lagen.

Die Punktmutante NOS-II K514E ergab in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} keine Bindung an CaM. Diese Mutante hatte auch schon in Gelshiftexperimenten keine CaM-Bindung gezeigt (3.1).

In Abwesenheit von Ca^{2+} dagegen zeigten alle anderen NOS-II-Peptidmutanten eine Bindung an ApoCaM. Repräsentative Messungen sind in Abb. 3.8 dargestellt.

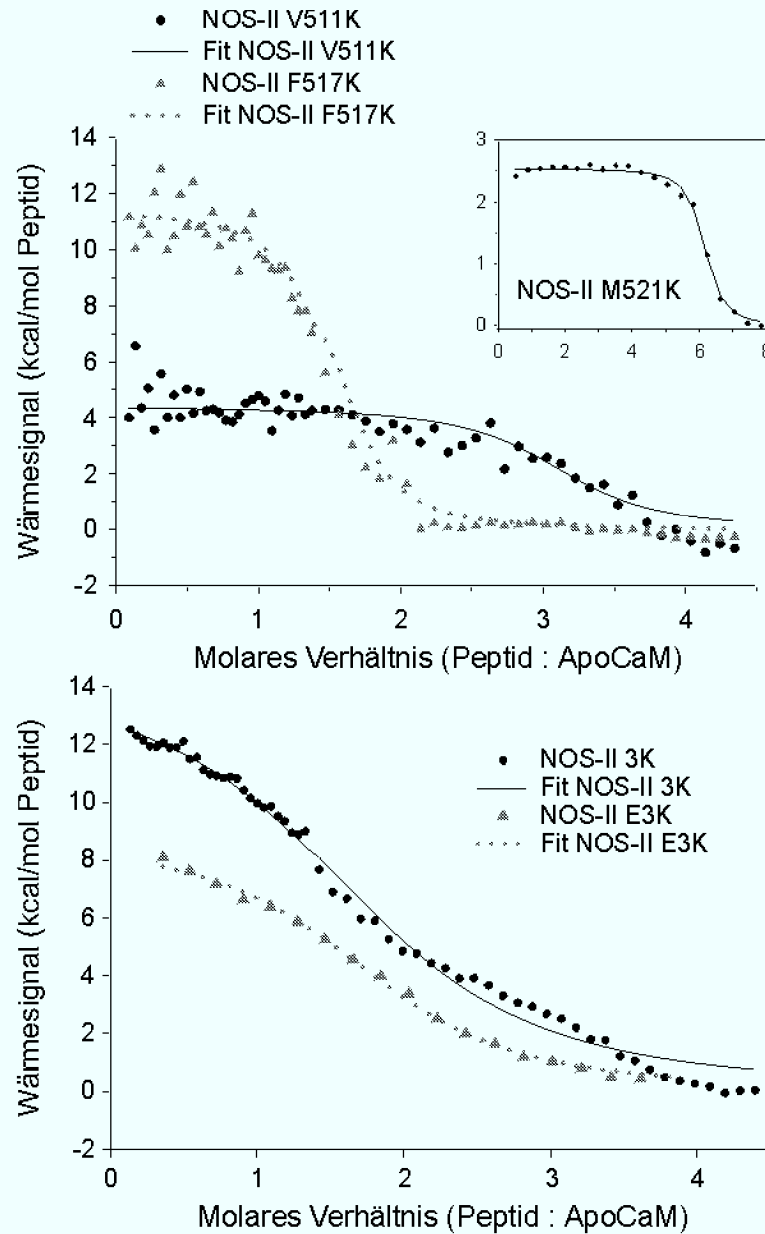


Abb. 3.8: Repräsentative ITC-Bindungsstudien mit NOS-II-Peptidmutanten in EGTA-Puffer. Es sind sowohl die Meßdaten, wie auch die Ergebnisse der Kurvenanpassung (Fit) dargestellt. Oben: Messungen mit den Punktmutanten NOS-II V511K, F517K und M521K. Unten: Messungen mit den Mutanten NOS-II 3K und E3K: Die Messung mit dem Peptid NOS-II M521K ist gesondert dargestellt, da die Titration bis zu einem molaren Verhältnis von 8:1 durchgeführt wurde. Die Daten wurden normiert. Die erste Injektion ging nicht in die Auswertung ein (2.3.2). Die dazugehörige Auswertung findet sich in Tab. 3.5.

Die Auswertung aller NOS-II-ApoCaM-Messungen ist in Tabelle 3.5 aufgeführt.

Da die Messungen mit den NOS-II WT-Peptiden keine titrierbaren Bindungssignale ergaben, kann keine Aussage darüber getroffen werden, in welchem Verhältnis die thermodynamischen Daten der Mutanten zum Wildtyp stehen. Für die NOS-II-Bindungsstelle wurden aber in einer

SPR- und Fluoreszenzbindungsstudie subnanomolare Affinitäten für die Bindung an Ca^{2+} /CaM und subnanomolare bis nanomolare Affinitäten für die Bindung an ApoCaM ermittelt (ZOCHE et al., 1996; ANAGLI et al., 1995).

Tab. 3.5: Ergebnisse der ITC-Messungen mit den NOS-II-Punktmutanten V511K, F517K und M521K und den Mutanten NOS-II 3K und E3K in EGTA-Puffer.

Peptid	K_A (M^{-1})	K_D (nM)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol/K)	ΔG (kJ/mol)	N	n
NOS-II V511K	$1,3\text{e}^6 \pm 2,0\text{e}^5$	804 ± 124	$25,9 \pm 0,65$	$203,5 \pm 3,4$	-34,8	$2,9 \pm 0,09$	2
NOS-II F517K	$4,4\text{e}^6 \pm 6,4\text{e}^5$	$232 \pm 33,7$	$31,2 \pm 16,6$	$231,6 \pm 56,9$	-37,9	$2,9 \pm 1,4$	2
NOS-II M521K	$1,9\text{e}^7 \pm 9,0\text{e}^6$	$66,8 \pm 31,2$	$11,9 \pm 1,3$	$178,3 \pm 8,6$	-41,3	$8,7 \pm 2,7$	2
NOS-II 3K	$6,0\text{e}^5 \pm 1,1\text{e}^5$	1660 ± 295	$33,3 \pm 19,0$	$222,5 \pm 62,5$	-33,0	$3,45 \pm 1,2$	3
NOS-II E3K	$8,3\text{e}^5 \pm 7,0\text{e}^4$	1199 ± 101	$27,0 \pm 9,6$	$203,9 \pm 31,4$	-33,7	$1,9 \pm 0,09$	2

n = Anzahl der Experimente. Die Daten wurden gegebenenfalls über beide Experimente gemittelt und die Standardabweichung des Mittelwertes berechnet. K_A = Assoziationskonstante, K_D = Dissoziationskonstante, ΔH = Bindungsenthalpie, ΔS = Bindungsentropie, ΔG = freie Bindungsenergie und N = Bindungsstöchiometrie. Alle Messungen wurden mit Peptiden durchgeführt, die N-terminal mit einem Cystein versehen waren.

Es wurden deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Mutanten beobachtet. Das Peptid NOS-II M521K wies in der ITC-Bindungsstudie eine ApoCaM-Affinität im nanomolaren Bereich auf. Die Dissoziationskonstante lag bei 67 ± 31 nM. Einen 3,5-fach höheren K_D -Wert wies die Peptidmutante NOS-II F517K auf ($K_D=232$ nM). Die Mutation V511K führte zu einer Dissoziationskonstante von 804 nM, die damit um mindestens zwei Größenordnungen höher lag, als der angenommene K_D -Wert des Wildtyps. Somit hatte diese Punktmutation den größten Einfluß auf die ApoCaM-Affinität. Drei Mutationen in der NOS-II-Sequenz (Peptid NOS-II 3K) führten zu einer noch geringeren Affinität zu ApoCaM. Die Dissoziationskonstante lag bei $1,66 \pm 0,3$ μM . Mit der Mutante NOS-II E3K wurde eine Dissoziationskonstante von $1,12 \pm 0,1$ μM ermittelt. Dieser Wert unterschied sich nicht signifikant von der Dissoziationskonstante der Mutante NOS-II 3K. Die statistische Auswertung der Daten findet sich in Tab. 3.6.

Tab. 3.6: Statistische Auswertung der ermittelten Dissoziationskonstanten aus den Messungen mit NOS-II-Mutanten ohne Ca^{2+} .

Mutation	Affinitätssteigerung	Irrtumswahrscheinlichkeit p	$0,05 \geq p$
NOS-II V511K → NOS-II F517K	3,5-fach	0,1162	nein
NOS-II V511K → NOS-II M521K	12,0-fach	0,0900	nein
NOS-II F517K → NOS-II M521K	3,5-fach	0,0697	nein
NOS-II 3K → NOS-II V511K	2,1-fach	0,0402	ja
NOS-II 3K → NOS-II F517K	7,2-fach	0,0186	ja
NOS-II 3K → NOS-II M521K	24,9-fach	0,0152	ja
NOS-II E3K → NOS-II V511K	1,5-fach	0,1387	nein
NOS-II E3K → NOS-II F517K	5,2-fach	0,0455	ja
NOS-II E3K → NOS-II M521K	18,0-fach	0,0397	ja
NOS-II 3K → NOS-II E3K	1,4-fach	0,1494	nein

Die Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde mit einem heteroskedastischen Student'schen t-Test ermittelt. Als signifikant wurde eine Abweichung bezeichnet, wenn der Wert p unterhalb von 0,05 lag.

Bei den Messungen mit den NOS-II-Mutanten fällt vor allem die große Streuung der Werte für N auf. Besonders bei dem Peptid NOS-II M521K mußte die Titration bis zu einem molaren Verhältnis von bis zu 12:1 fortgesetzt werden, um eine Sättigung der Signale zu erreichen. Aber auch bei den Peptiden NOS-I V511K und NOS-II 3K war der Umschlagpunkt der angepaßten Kurven zu höheren Peptid:CaM Verhältnissen verschoben (Abb. 3.8). Man sieht, daß der relativ lineare Verlauf der NOS-II 3K-Daten eine schlechte Kurvenanpassung ergab. Die NOS-II M521K-Messung dagegen zeigte einen eindeutig S-förmigen Verlauf mit einem relativ steilen Abfall der Kurve. Der Umschlagpunkt der angepaßten Kurve war trotzdem stark zu hohen Peptid:CaM Verhältnissen hin verschoben. Die Rohdaten einer der Messungen wiesen einen Übergang von endothermen zu exothermen Signalen auf. Der Umschlagpunkt von endotherm zu exotherm stimmte mit dem Umschlagpunkt der S-Kurve überein. Von den Rohdaten wurde die Kontrollmessung abgezogen und die Daten wurden auf ± 0 kcal/mol normiert. In einer weiteren Messung traten dagegen nur endotherme Signale auf. Alle Messungen mit den NOS-II-Peptiden zeigten, daß die Bindung an ApoCaM endotherm und entropisch getrieben war. Die freie Bindungsenergie lag im Rahmen von -33 bis -41 kJ/mol.

Die Messungen mit den Peptiden NOS-II 3K und NOS-II E3K unterschieden sich in keinem Parameter signifikant (mit $p < 0,05$). Die thermodynamischen Daten sind in Abb. 3.9 zusammengefaßt.

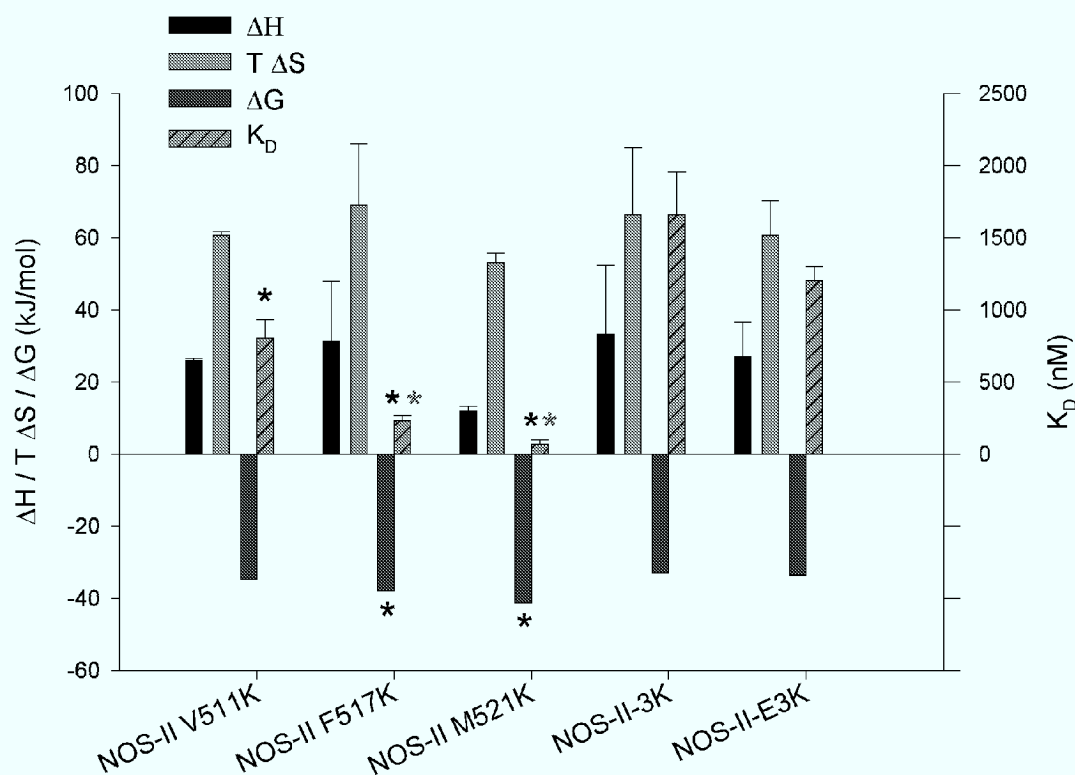


Abb. 3.9: Graphische Darstellung der thermodynamischen Daten der Bindung von NOS-II V511K, F517K, M521K, 3K und E3K an ApoCaM. Bindungsenthalpie (schwarzer Balken), Bindungsentropie multipliziert mit der Temperatur (298 K; hellgrauer Balken), freie Bindungsenergie (dunkelgrauer Balken) und Dissoziationskonstante (hellgrauer, gestreifter Balken). Der schwarze Stern kennzeichnet signifikante Abweichungen von den Messungen mit NOS-II 3K ($p < 0,05$). Der graue Stern kennzeichnet signifikante Abweichungen von den Messungen mit NOS-II E3K ($p < 0,05$).

3.2.5 Zusammenfassung der ITC-Daten

Affinität der Peptide zu Calmodulin

Faßt man die ITC-Messungen in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} zusammen, so läßt sich folgendes feststellen:

NOS-I-CaM-Bindungsstelle:

- Die Mutation der Position 736 von einem Glutamat zu einem Lysin in der NOS-I-CaM-Bindungssequenz hatte nur geringfügige Auswirkungen auf die Ca^{2+} /CaM-Affinität. Allerdings reichte diese Mutation aus, um aus einer reinen Ca^{2+} /CaM-Bindungsstelle der NOS-I eine ApoCaM-Bindungsstelle mit mikromolarer Affinität für ApoCaM zu machen ($K_{\text{D ApoCaM}} = 1,36 \mu\text{M}$).
- Die Einführung von zusätzlichen Mutationen (K733V und K739F) verstärkte die Affinität sowohl zu Ca^{2+} /CaM wie auch zu ApoCaM. Für ApoCaM wurde eine nanomolare Affinität erreicht ($K_{\text{D ApoCaM}} = 356 \text{ nM}$).
- Die Einführung der vierten Mutation (K743M) führte zu einer noch weiter erhöhten Affinität für Ca^{2+} /CaM und für ApoCaM ($K_{\text{D ApoCaM}} = 182 \text{ nM}$).
- Das Peptid NOS-I VFM band weder an Ca^{2+} /CaM noch an ApoCaM.

NOS-II-CaM-Bindungsstelle:

- Die Punktmutationen in der NOS-II-CaM-Bindungsstelle führten in folgender Reihenfolge zu einer Verminderung der ApoCaM-Affinität: Methionin 521 → Lysin, Phenylalanin 517 → Lysin und Valin 511 → Lysin.
- Die Einführung aller drei Mutationen in die NOS-II-CaM-Bindungsstelle führte zu einer mikromolaren Affinität zu ApoCaM ($K_{\text{D ApoCaM}} = 1,66 \mu\text{M}$).
- Die Mutation aller vier kritischen Aminosäuren führte ebenfalls zu einer mikromolaren Affinität zu ApoCaM ($K_{\text{D ApoCaM}} = 1,2 \mu\text{M}$).
- Die Punktmutation Lysin 514 → Glutamat schien eine CaM-Bindung zu verhindern.

Die Daten zu den Affinitäten sind in Tabelle 3.7 zusammengefaßt.

Tab. 3.7: Zusammenfassung der Dissoziationskonstanten aller Messungen.

Peptid	K_D Ca ²⁺ /CaM (nM)	K_D ApoCaM (nM)	Tendenz
NOS-I WT	65	/	Affinität zu Ca ²⁺ /CaM und ApoCaM nimmt mit den Mutationen zu
NOS-I E736K	55	1363	
NOS-I VKF	20	356	
NOS-I VKFM	4	182	
NOS-II WT	(subnanomolar) ¹	(subnanomolar) ¹	Affinität zu ApoCaM nimmt mit den Mutationen ab
NOS-II M521K	/	67	
NOS-II F517K	/	232	
NOS-II V511K	/	804	
NOS-II E3K	/	1199	
NOS-II 3K	/	1660	

Die Mutanten sind nach auf- oder absteigender Affinität sortiert. Die Messungen der NOS-II-Peptide in Anwesenheit von Ca²⁺ ergaben keinerlei CaM-Bindung. Für das NOS-II WT-Peptid konnte auch keine ApoCaM-Bindung nachgewiesen werden. ¹Die Angaben für das NOS-II WT-Peptid stammen aus Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Studien mit dem Peptid mmNOS-II WT (ZOCHE et al., 1996).

Thermodynamik der Peptid-CaM-Bindungen

Zunächst kann bei den Peptid-CaM-Bindungen nach exothermen und endothermen Signalen unterschieden werden. Während alle Bindungen in Anwesenheit von Ca²⁺ zu exothermen Signalen führten, wiesen alle ApoCaM-Bindungen endotherme Signale auf. Die durchschnittliche freie Bindungsenergie der Ca²⁺/CaM-Bindung lag bei $-43,9 \pm 3,4$ kJ/mol, die der ApoCaM-Bindung bei $-36,2 \pm 2,9$ kJ/mol. Sie unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$ / Student'scher -t-Test).

Endotherme Reaktionen besitzen einen positiven Wert für ΔH und sind damit enthalpisch unvorteilhaft. Damit die freie Bindungsenergie negativ wird, muß gelten: $T \Delta S > \Delta H$. Dies war für alle Peptid-ApoCaM-Bindungen der Fall. Die Reaktionen waren damit entropisch vorteilhaft, was die positive Bindungsenthalpie aufwog. Für exotherme Reaktionen nimmt ΔH einen negativen Wert an. Bei allen Bindungen an Ca²⁺/CaM nahm ΔS einen positiven Wert an und die Bindungsenthalpie war negativ.

Damit handelte es sich bei der Ca²⁺/CaM-Bindung um eine enthalpiegetriebene und bei der ApoCaM-Bindung um eine entropiegetriebene Reaktion. Die Daten hierzu sind zusammenfassend in Abb. 3.10 dargestellt.

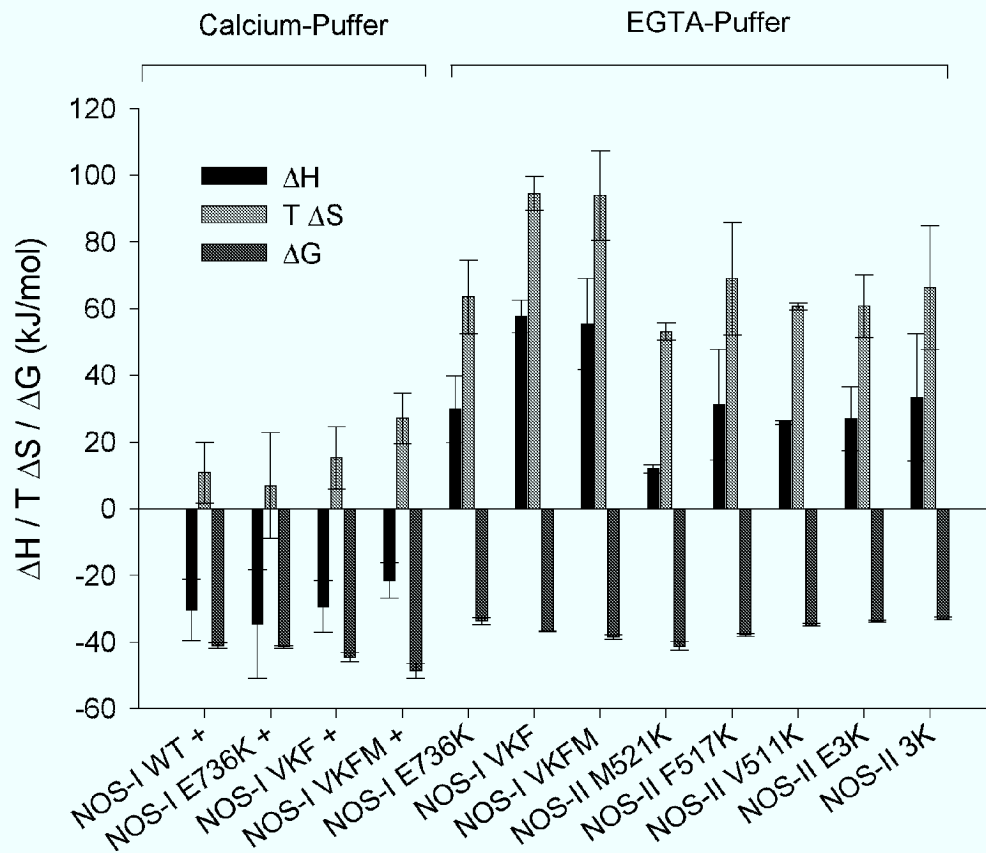


Abb. 3.10: Zusammenfassung der thermodynamischen Daten. Die ersten vier Datensätze entsprechen Messungen in Anwesenheit von Ca^{2+} . Sie sind mit einem + gekennzeichnet. Die restlichen Messungen wurden in EGTA-Puffer durchgeführt. Dargestellt sind die Bindungsenthalpie (ΔH , schwarze Balken), die Bindungsentropie (hier als $T \Delta S$ dargestellt, hellgraue Balken) und die freie Bindungsenergie (ΔG , dunkelgraue Balken).

Mittels ITC-Messungen konnte keine Aussage über die Affinität des NOS-II WT-Peptides zu CaM bzw. der NOS-II-Peptidmutanten zu Ca^{2+} /CaM getroffen werden. Durch die Gelshiftexperimente (3.1) war aber eine qualitative Bindung des Wildtyps und der Mutanten an Ca^{2+} /CaM nachgewiesen worden. Daher sollte mit Hilfe einer weiteren Methode die Affinität der NOS-II-Peptide und ihrer Mutanten zu Ca^{2+} /CaM untersucht werden. Hierfür wurde die Methode der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie (3.3) gewählt. Da diese Methode auch Aufschluß über die Ratenkonstanten einer Bindung geben kann, wurden auch das NOS-I WT-Peptid und dessen Mutanten mit dieser Methode auf ihre CaM-Bindung hin untersucht.

3.3 Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR)-Spektroskopie

Die Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie (2.3.3) ermöglicht die zeitaufgelöste Aufzeichnung von Bindungsvorgängen. Die Beobachtung von Analyt-Ligand-Bindung in Echtzeit läßt nicht nur eine Bestimmung der Bindungskonstanten, sondern auch der Ratenkonstanten (k_a und k_d) einer Bindung zu. Hierbei liegt der Detektionsbereich für k_a bei 10^3 bis $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und für k_d bei 10^{-6} bis 10^{-1} s^{-1} (MYSZKA, 1997). Die Daten werden in Resonanzeinheiten (RU) aufgezeichnet, wobei 1000 RU einer Änderung der Oberflächenproteinkonzentration von 1 ng/mm^2 entsprechen. Die Methode ist bei TWELKER (1998) ausführlich beschrieben.

3.3.1 Problematik der Meßmethode

Ein Vorteil der Methode besteht darin, daß nur nanomolare Konzentrationen an Ligand und nano- bis mikromolare Konzentrationen an Analyt in kleinen Volumina benötigt werden. Ein Nachteil besteht darin, daß der Ligand kovalent an die Sensoroberfläche gekoppelt werden muß. Durch diese Immobilisierung des Liganden kann seine Konformation gestört werden, was die Bindungskonstanten verfälschen kann und im schlimmsten Fall die Bindung zwischen Ligand und Analyt verhindert. Durch Modifikation (z.B. Anhängen eines Biotinrestes) des Liganden kann die Immobilisierung zielgerichtet immer in der gleichen Position erfolgen. Es entsteht eine homogene Oberfläche. Eine Immobilisierung über Aminogruppen führt dagegen oft zu heterogenen Oberflächen, da Peptide und Proteine in den meisten Fällen mehrere Aminogruppen besitzen (KARLSSON et al., 1994). Alle NOS-Peptide wurden für die SPR-Messungen mit einem zusätzlichen Cystein am N-Terminus synthetisiert. Einzige Ausnahme bildete das Peptid hhNOS-II WT, das schon ein Cystein in seiner Sequenz trägt. Dieses Peptid wurde N-terminal biotinyliert. So war in allen Fällen eine zielgerichtete Immobilisierung gewährleistet.

Ein weiteres Problem stellt die gezielte Einstellung von Immobilisierungsdichten (ID) auf der Sensoroberfläche dar. Die CM5-Chips sind mit einer 100 nm dicken Dextranschicht beschichtet. Eine hohe Immobilisierungsdichte erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß auch innerhalb der Dextranschicht Ligand immobilisiert wird. Innerhalb der Dextranschicht ist aber ein ungehindertes An- und Abdiffundieren von Analyt nicht möglich, was zu Massentransportproblemen führen kann (SCHUCK, 1997). Es kann eine heterogene Oberfläche entstehen, die Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität aufweist. Diese werden abhängig von der Ligandenkonzentration unterschiedlich schnell belegt, was zur Überlagerung verschiedener Ratenkonstanten führt. Bei hohen Immobilisierungsdichten kann

es zusätzlich zu sterischer Hinderung der Bindung kommen. Ein Zusammenhang zwischen der Immobilisierungsdichte und dem gemessenen Resonanzsignal konnte sowohl von FISCHER et al. (2001), als auch in der vorliegenden Arbeit (3.3.2.1) hergestellt werden. Außerdem ist eine relativ einheitliche Immobilisierungsdichte zwischen verschiedenen Messungen wünschenswert, um Daten miteinander vergleichen zu können. Man kann die Immobilisierungsdichte durch verschiedene Parameter beeinflussen: Die Dauer der Aktivierung und Derivatisierung der Oberfläche kann verändert werden (nicht bei SA5-Chips möglich). Dadurch wird die Anzahl der zur Verfügung stehenden Bindungsplätze beeinflusst. Die Konzentration und Kontaktzeit des Liganden kann variiert werden. Und schließlich kann noch der pH-Wert des Puffers, in dem der Ligand gelöst ist, verändert werden, was eine Auswirkung auf die Präkonzentrierung des Liganden hat.

Ein weiterer Faktor, der für die Qualität der Messungen von Bedeutung ist, ist die Flußrate, mit der der Analyt über die Sensoroberfläche gespült wird. Eine niedrige Flußrate kann die Rückbindung von Analyt an den Liganden begünstigen und Massentransportprobleme verstärken. Eine hohe Flußrate führt häufig zu Signalstörungen durch Unregelmäßigkeiten im Pufferfluß (eigene Beobachtung), die besonders die Auswertung der Dissoziationsphase beeinträchtigen können. Eine Variation der Flußraten ist daher sinnvoll, um solche Probleme aufzudecken.

Ändert sich die Pufferzusammensetzung (z.B. Injektion des in Puffer gelösten Analyten), so ändert sich damit der Brechungsindex oberhalb der Sensoroberfläche. Dies wird von dem Gerät als Signal detektiert. Diese Puffersignale („Puffersprung“) können bei der Injektion von Analyt bis zu 30 RU ausmachen (TWELKER, 1998). Bei der Injektion von Substanzen mit anderer Zusammensetzung (z.B. bei der Immobilisierung oder dem Regenerationspuls) kommt es zu sehr großen Signaländerungen, die mehrere 1000 RU betragen können (Abb. 3.11).

3.3.2 Kontrollmessungen

Man kann zwei verschiedene Arten von Kontrollmessungen unterscheiden: die eine findet in der gleichen Flußzelle wie die Messung statt, die andere findet in einer Kontrollflußzelle statt. Im ersten Fall findet vor jeder Messung ein Kontrolllauf statt, bei dem nur Puffer injiziert wird (Pufferlauf). Damit erzeugt man einen Puffersprung, der anschließend von der Messung abgezogen werden kann. Im zweiten Fall wird eine Flußzelle verwendet, die zwar aktiviert und derivatisiert wurde, auf der aber kein Ligand immobilisiert wurde (Mock-Flußzelle). Über diese Kontrolloberfläche wird eine komplette Meßreihe mit Analyt durchgeführt. So kann

überprüft werden, ob der Analyt unspezifisch an die Sensoroberfläche bindet und damit Bindungssignale auslöst, die nichts mit der Ligand-Analyt-Bindung zu tun haben.

3.3.3 Auswertung der Daten

Ein Sensorgramm gliedert sich in drei Phasen: die Assoziationsphase, in der Analyt über die Sensoroberfläche gespült wird, die Dissoziationsphase, in der nur Puffer durch die Flußzelle strömt und die Regenerationsphase, in der der Analyt vollständig entfernt werden soll. Ein solches Sensorgramm ist in Abb. 3.11 dargestellt.

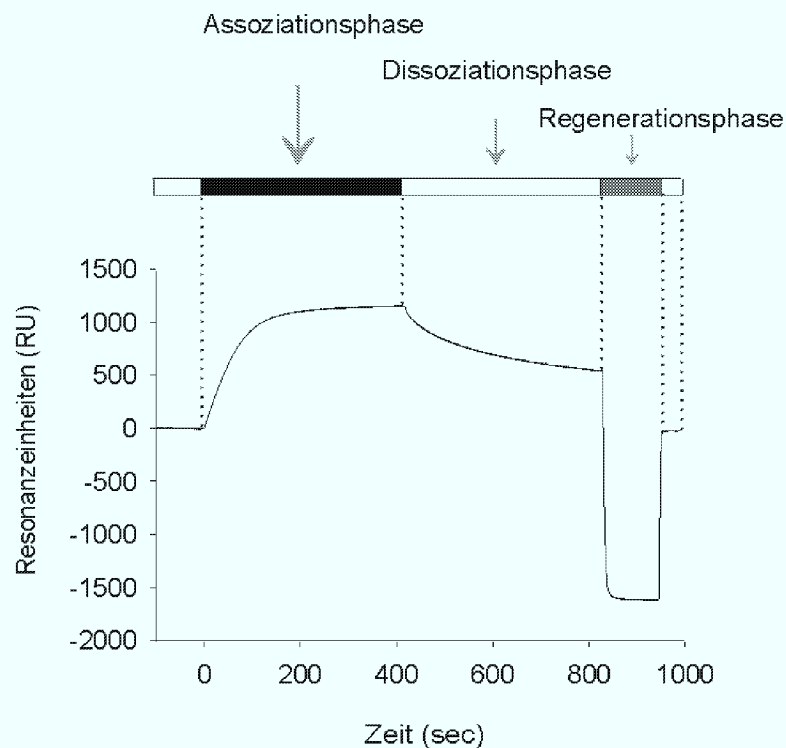


Abb. 3.11: Beispiel eines Sensorgramms. Die Messung wurde mit 50 nM CaM in Ca^{2+} -Puffer auf einer NOS-I WT-Oberfläche ($\text{ID} = 401 \text{ fmol/mm}^2$) durchgeführt. Der offene Balken symbolisiert den Pufferstrom, der schwarze Balken die Assoziationsphase mit 50 nM CaM, der graue Balken die Regenerationsphase mit 10 mM EGTA. Die Flußrate betrug $5 \mu\text{l/min}$.

1) Kurvenanpassung an die Assoziations- und Dissoziationsphase

Eine SPR-Messung setzt sich aus einer Reihe von Sensorgrammen zusammen, die nacheinander mit unterschiedlichen Analytkonzentrationen auf der gleichen Oberfläche gemessen werden (Abb. 3.12 A und B). Im Idealfall sollten die ermittelten Bindungskonstanten und Ratenkonstanten für alle Konzentrationen gleich sein. Für die Auswertung solcher Daten wird ein plausibles Bindungsmodell (z.B. Langmuirsche Adsorptionsisotherme) angenommen und die Daten durch Kurvenanpassung mit dem Programm BIAevaluation 3.0 ausgewertet. Dabei werden die Ratenkonstanten gleichzeitig

aus der gesamten Kurvenschar ermittelt. Eine solche Auswertung wird als *globaler Fit* bezeichnet. Eine simulierte Sensorgrammschar, bei der die Interaktionen nach einem einfachen Langmuirschen Bindungsmodell mit der Stöchiometrie 1:1 stattfindet, ist in Abbildung 3.12 B dargestellt. Bei einer solchen Messung, die nicht durch Massentransporteffekte oder andere systematische Fehler beeinträchtigt ist und der eine 1:1 Bindungsstöchiometrie zugrunde liegt, sollte sowohl die Assoziations-, wie auch die Dissoziationsphase einen monoexponentiellen Verlauf zeigen. Die Auftragung des natürlichen Logarithmus (dR/dt) gegen die Zeit ergibt in dem Fall für beide Phasen eine abfallende Gerade (Abb. 3.12 D).

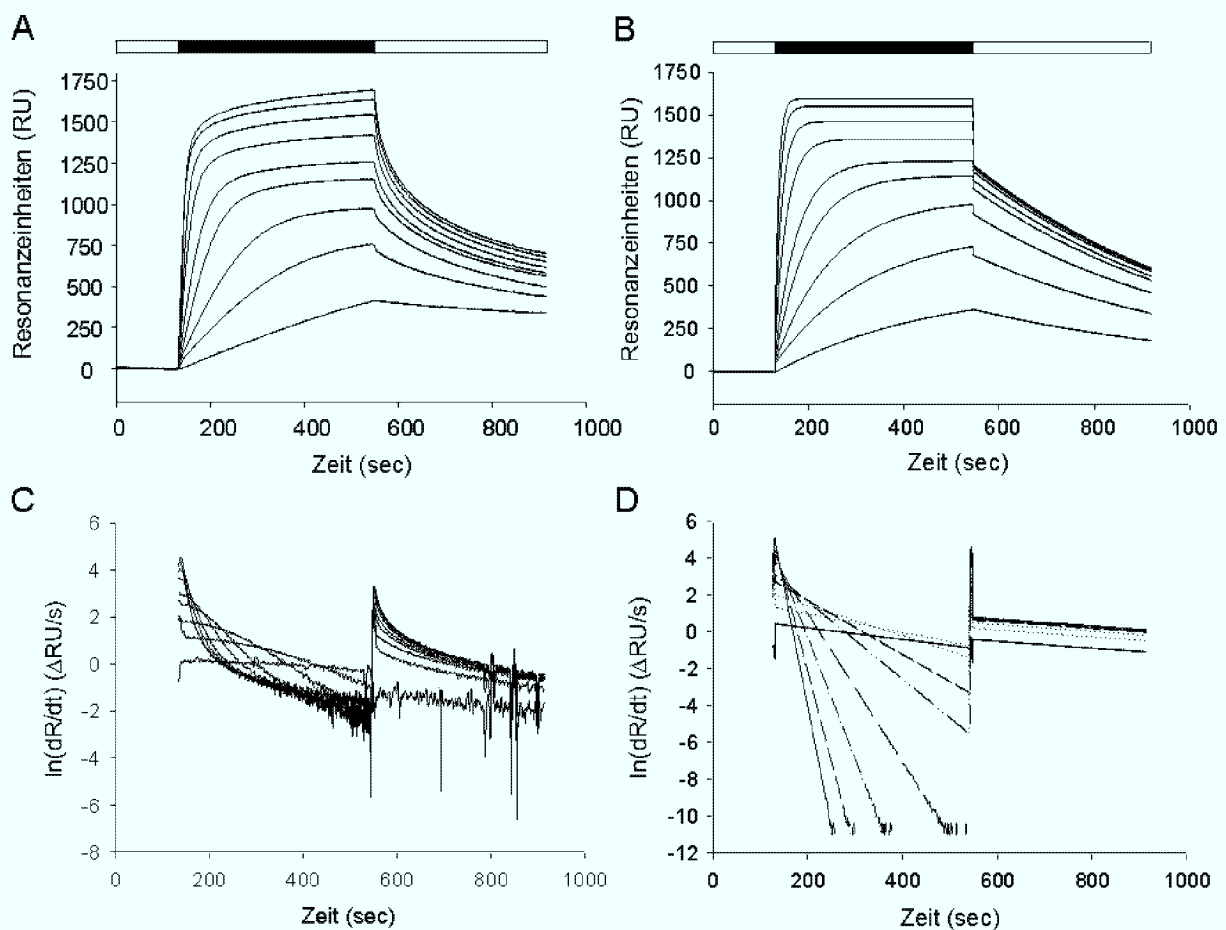


Abb. 3.12: Sensorgrammschar einer Originalmessung (A) und einer simulierten Messung (B). Die Originalmessung wurde auf einer NOS-I WT-Oberfläche mit einer ID von 401 fmol/mm^2 bei einer Flußrate von $5 \mu\text{l/min}$ in Ca^{2+} -Puffer durchgeführt. Die CaM-Konzentrationen waren in beiden Fällen (von unten nach oben): 10, 25, 50, 100, 150, 300, 500, 750 und 1000 nM . Der offene Balken symbolisiert den Pufferfluß, der schwarze Balken die CaM-Injektion. Der Regenerationspuls wurde der Übersichtlichkeit halber abgeschnitten. Darstellung des natürlichen Logarithmus (dR/dt) gegen die Zeit der Originalmessung (C) und der simulierten Messung (D). Bei einem monoexponentiellen Kurvenverlauf ist die logarithmische Darstellung linear (D). Die Ableitung der Originaldaten ist dagegen nur in kurzen Teilbereichen linear (C).

In Abb. 3.12 A sind Originaldaten dargestellt, die mit CaM auf einer NOS-I WT-Oberfläche gemessen wurden. Vergleicht man die beiden Sensorgrammscharen (A und B) miteinander, so erkennt man sofort, daß die Originaldaten in der Assoziations- und Dissoziationsphase keinen monoexponentiellen Verlauf aufwiesen. Dies kann durch die Auftragung des natürlichen Logarithmus (dR/dt) gegen die Zeit überprüft werden. Hier ergab sich nur für kurze Teilbereiche der einzelnen Phasen ein gerader Verlauf (Abb. 3.12 C).

Das Programm BIAevaluation bietet neben dem *globalen Fit* noch zwei weitere Möglichkeiten zur Bestimmung der Ratenkonstanten. Zum einen können aus jeder Kurve einzeln die Ratenkonstanten bestimmt werden (*simultaner Fit*) oder aber k_d wird aus jeder einzelnen Messung bestimmt und anschließend eingesetzt, um k_a zu berechnen (*separater Fit*). Die Qualität eines Fits wurde mit Hilfe der kleinsten Fehlerquadrate (χ^2) überprüft. Bei 3 Freiheitsgraden für den Fit der Dissoziationsphase, 5 Freiheitsgraden für den Fit der Assoziationsphase (2.10) und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p=0,05$ darf χ^2 folgende Werte nicht überschreiten: χ^2 Assoziation = 11,07 und χ^2 Dissoziation = 7,81. Dies konnte für keine Messung mit dem *globalen Fit* erreicht werden. Nur die Auswertung durch *separaten Fit* der linearen Anfangsbereiche von Assoziations- und Dissoziationsphase brachte in einigen Sensorgrammen zufriedenstellende Ergebnisse. Aber auch hier änderten sich die aus den einzelnen Messungen ermittelten Ratenkonstanten mit der CaM-Konzentration. Ein Beispiel dafür ist in Tab. 3.8 anhand der in Abbildung 3.12 A gezeigten Messung aufgeführt.

Tab. 3.8: Auswertung der Sensorgramme aus Abbildung 3.12 A mittels *separatem Fit*.

	<i>separater Fit</i> der Dissoziationsphase		<i>separater Fit</i> der Assoziationsphase			
CaM (nM)	k_d (s ⁻¹)	χ^2	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (M)	χ^2
10	6,14e ⁻⁴	1,39*	2,74e ⁴	5e ⁻⁴	1,81e ⁻⁸	20,7
25	2,12e ⁻³	3,3*	2,13e ³	4,83e ⁻³	2,27e ⁻⁶	3,12*
50	2,5e ⁻³	28,6	1,75e ³	5,23e ⁻³	2,95e ⁻⁶	1,46*
100	4,03e ⁻³	13,6	9,32e ³	7,37e ⁻³	7,91e ⁻⁷	1,27*
150	4,19e ⁻³	12	5,26e ⁴	8,9e ⁻³	1,69e ⁻⁷	3,84*
300	3,75e ⁻³	34,9	1,04e ⁵	1,16e ⁻²	1,11e ⁻⁷	16,2
500	5,2e ⁻³	26,2	1,23e ⁵	1,33e ⁻²	1,08e ⁻⁷	39
750	5,59e ⁻³	10,6	1,2e ⁵	1,44e ⁻²	1,27e ⁻⁷	3,11*
1000	6,51e ⁻³	10,3	1,07e ⁵	1,5e ⁻²	1,4e ⁻⁷	25,3

Zunächst wurde k_d aus der Dissoziationsphase ermittelt und dieser Wert dann zur Anpassung der Assoziationsphase eingesetzt. χ^2 gibt das kleinste Fehlerquadrat an und ist ein Maß für die Qualität der Kurvenanpassung. Es wurden nur die linearen Bereiche aus der Auftragung des natürlichen Logarithmus (dR/dt) gegen die Zeit zur Kurvenanpassung herangezogen. * = signifikant mit $p < 0,05$.

Aufgrund der Änderung der Ratenkonstanten mit Anstieg der CaM-Konzentration ließ sich die Auswertung nach dem einfachen Langmuirschen Bindungsmodell mit 1:1-Stöchiometrie für die Daten nicht anwenden. Die Änderung der Ratenkonstanten deutete auf eine heterogene Oberfläche hin. Wie unter 3.3.1 beschrieben, können niedrig affine Bindungsstellen vorliegen, die erst bei hohen CaM-Konzentrationen belegt werden. Die Bindung an verschiedene Bindungsstellen kann sich im Sensorgramm überlagern und zu Änderungen in den Bindungs- und Ratenkonstanten führen. Daher wurden für die Bestimmung der Ratenkonstanten mittels Kurvenanpassung die Messungen mit niedrigen CaM-Konzentrationen ausgewählt, da bei diesen Konzentrationen wahrscheinlich nur die höheraffinen Bindungsstellen belegt werden. Diese Daten wurden nach dem Modell einer 1:1-Bindung mit Massentransport im *simultanen Fit* ausgewertet. Hierbei geht in die Berechnung der Konzentration an freiem Analyt [A] die Massentransportkonstante k_t (RU/M*s) nach folgender Formel ein:

$$dA/dt = k_t [A] - (k_a A B - k_d AB)$$

(mit A = Analyt; k_t = Massentransportkonstante; B = Ligand; AB = Analyt-Ligand-Komplex)

2) Auswertung der Sensorgramme über das Gleichgewichtssignal: Scatchard- und EC_{50} -Plot

Die Bindungskonstanten K_A und K_D lassen sich über das thermodynamische Gleichgewicht zwischen dem Peptid-CaM-Komplex und dem freien CaM in der mobilen Phase ermitteln. Das Resonanzsignal, bei dem sich dieses Gleichgewicht eingestellt hat, wird als R_{eq} bezeichnet. Am Ende der Assoziationsphase wird aus jedem Sensorgramm die erreichte Maximalamplitude (R_{eq}) abgelesen. Die Auftragung R_{eq}/c gegen R_{eq} (Scatchard-Plot) sollte im Falle einer 1:1-Bindung eine Gerade mit negativer Steigung ergeben (Abb. 3.13 B). Der Betrag der Steigung entspricht der Assoziationskonstante K_A , der reziproke Wert entspricht der Dissoziationskonstante K_D . Lassen sich die Daten in dieser Form nicht als Gerade anpassen, dann besteht die Möglichkeit das Gleichgewichtssignal direkt gegen die CaM-Konzentration aufzutragen (Abb. 3.13 A). Aus der entstehenden Kurve kann die CaM-Konzentration abgelesen werden, bei der das Gleichgewichtssignal halbmaximal ist (EC_{50} -Wert). Dieser Wert kann als Maß für die relative Affinität der Peptid-CaM-Bindung genommen werden (WEITZ et al., 1998).

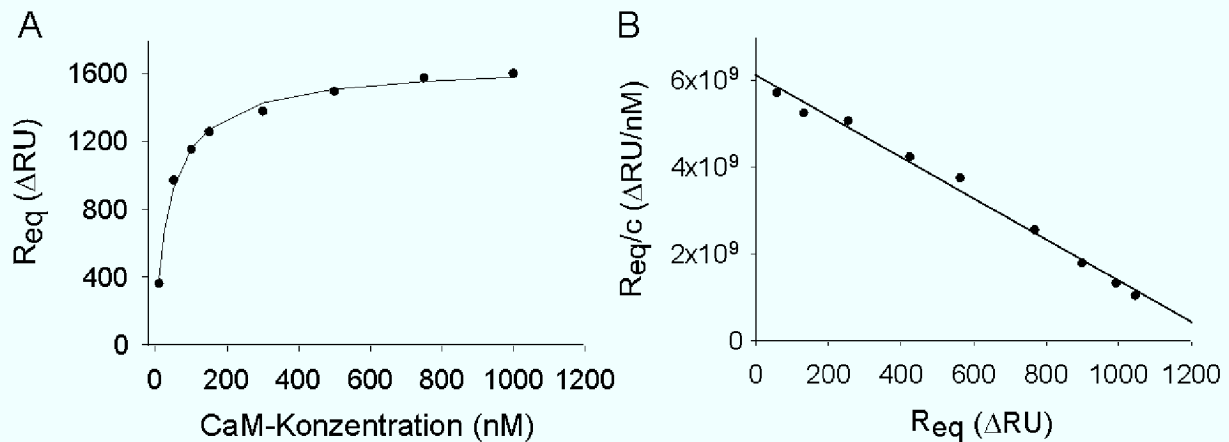


Abb. 3.13: Auswertung von Sensorgrammen über das Gleichgewichtssignal R_{eq} . Messung mit 10-1000 nM CaM über eine NOS-I WT-Oberfläche (401 fmol/mm²) in Ca²⁺-Puffer bei 5 μl/min. **A** EC₅₀-Plot: Auftragung von R_{eq} gegen die CaM-Konzentration (EC₅₀ = 39,7 nM), **B** Scatchard-Plot: Auftragung von $R_{eq} / [CaM]$ gegen R_{eq} . Die Steigung der Gerade ergibt $-K_A$, der reziproke Wert K_D (K_D = 32 nM).

3) Auswertung des relativen Resonanzsignals nach der Dissoziationsphase und Regenerationsphase

In der Dissoziationsphase wird nur Puffer ohne Analyt durch die Flußzelle gespült. Man erwartet daher eine stetige Dissoziation der Analyt-Ligand-Bindung. Der Regenerationspuls soll anschließend die noch verbliebenen Bindungen lösen. In einigen Messungen (z.B. mit hhNOS-II WT) konnte in der Dissoziationsphase ein ausgeprägtes Plateau beobachtet werden. Außerdem wurde durch den Regenerationspuls mit EGTA nicht sämtliches CaM von der Peptidoberfläche entfernt. Sensorgramme mit diesen Charakteristika wurden wie folgt ausgewertet: an drei Punkten im Sensorgramm (am Ende der Assoziationsphase, nach der eingestellten Dissoziationsphase und nach der Regenerationsphase) wurde das Resonanzsignal abgelesen (Abb. 3.14). Da die Messungen mit unterschiedlichen Peptiden unterschiedliche Amplituden erreichten, wurde das Resonanzsignal am Ende der Assoziationsphase (ΔRU_a) gleich 100 % gesetzt und die Resonanzsignale nach der eingestellten Dissoziationsphase (ΔRU_d) und der Regenerationsphase (ΔRU_r) dazu ins Verhältnis gesetzt. So konnte für jedes Peptid ermittelt werden, wieviel Prozent des Resonanzsignals noch nach der eingestellten Dissoziations- und wieviel nach der Regenerationsphase vorlagen.

ΔRU_d spiegelt die Ausbildung eines Plateaus in der Dissoziationsphase wider. Durch eine sehr langsame Dissoziation kann sich eine Dissoziationsphase mit Plateaucharakter ergeben. Gleichzeitig kann ein solches Plateau aber auch ein Hinweis auf Rückbindung, Käfigeffekte, irreversible Bindung an die Oberfläche oder Präzipitation des Analyten sein und damit

methodische Probleme widerspiegeln. ΔRU_r ist ein Maß dafür, wieviel Prozent des Resonanzsignals nach der Komplexierung von Ca^{2+} bestehen bleiben. Bleibt das Signal oberhalb des Ausgangswertes (dargestellt als graue Linie in Abb. 3.14), so konnten entweder durch Ca^{2+} -Komplexierung nicht alle Peptid-CaM-Bindungen gelöst werden, oder aber es handelte sich um Signale, die nicht durch eine spezifische Peptid-CaM-Bindung hervorgerufen wurden (z.B. Offset oder Präzipitation des Analyten).

Die Auswertungen wurden über 18 Messungen gemittelt. In einigen Fällen standen nur neun Messungen zur Verfügung. Eine Ausnahme bildete die Auswertung der apparenten Raten- und Bindungskonstanten, der Einzelmessungen zugrunde lagen.

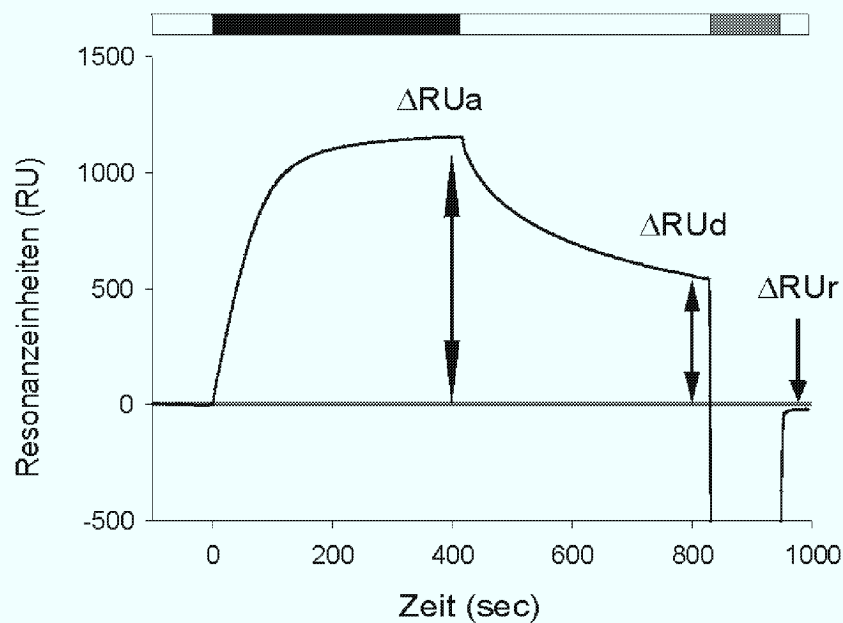


Abb. 3.14: Auswertung des relativen Resonanzsignals. Dargestellt ist eine Messung mit 50 nM CaM in Ca^{2+} -Puffer über eine NOS-I WT-Oberfläche (401 fmol/mm^2) bei einer Flußrate von $5 \mu\text{l/min}$. Die Zeitskala wurde am Startpunkt der Injektion von CaM auf Null gesetzt. Der offene Balken symbolisiert den Pufferstrom, der schwarze Balken die CaM-Injektion und der graue Balken den Regenerationspuls mit 10 mM EGTA. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen die Resonanzeinheiten bei einer Flußrate von $5 \mu\text{l/min}$ abgelesen wurden: ΔRU_a : 400 sec nach Beginn der Injektion. ΔRU_d : 800 sec nach Beginn der Injektion und ΔRU_r : 950 sec nach Beginn der Injektion. Bei anderen Flußraten wurden die Zeiten entsprechend variiert.

3.3.4 SPR-Messungen mit den NOS-Peptiden

Die Messungen mit den NOS-Peptiden beider Isoformen erfolgten sowohl in Ca^{2+} -, als auch in EGTA-Puffer. Für fast alle Peptide konnte in Anwesenheit von Ca^{2+} eine CaM-Bindung gezeigt werden. Ausnahmen bildeten die Peptide mmNOS-II WT und NOS-II M521K. Mit diesen beiden Peptiden wurden verschiedene Kopplungsmethoden (Immobilisierung über Cysteingruppen, Aminogruppen und im Falle von mmNOS-II WT über Biotin) getestet.

Außerdem wurde die Bindung der Peptide an immobilisiertes CaM untersucht. In keinem Fall ergab sich ein spezifisches Bindungssignal. Das Peptid NOS-II K514E wurde nicht untersucht, nachdem sich in anderen Experimenten (Gelshiftexperimente und ITC-Bindungsstudien) keinerlei Bindung an CaM nachweisen lies.

Wurden die Peptide in der mobilen Phase (Pufferstrom) über die Flußzelle gespült, zeigten alle eine unspezifische Bindung an die CM5-Chipoberfläche. Auf Kontrollflußzellen ergaben sich beinahe ebenso große Bindungssignale, wie auf CaM-immobilisierten Oberflächen. Zog man die Kontrollsignale von den Bindungssignalen ab, so ergaben sich häufig kastenförmige Signale, die nicht ausgewertet werden konnten. Daher stammen alle gezeigten Daten von Messungen mit immobilisiertem Peptid und CaM in der mobilen Phase. Kontrollmessungen mit CaM auf einer Kontrolloberfläche ergaben keine unspezifischen Bindungssignale.

In Abwesenheit von Ca^{2+} konnte ausschließlich mit dem Peptid hhNOS-II WT eine ApoCaM-Bindung beobachtet werden. Mit allen anderen Peptiden ergaben sich keine spezifischen Bindungssignale in EGTA-Puffer.

In allen Fällen wurden die Messungen als Doppelansätze mit integrierten Pufferkontrollen durchgeführt. Die Pufferkontrollen wurden von den Meßdaten abgezogen.

3.3.4.1 Abhängigkeit des Resonanzsignals von der Immobilisierungsdichte

In einer Arbeit von FISCHER et al. (2001) konnte gezeigt werden, daß das Verhältnis von gebundenem CaM zur Anzahl der CaM-Bindungsstellen auf einem CM5-Chip mit einer NOS-I WT-Oberfläche von der Immobilisierungsdichte abhängt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhältnis (CaM zu CaM-Bindungsstellen) als prozentualer Anteil des Maximalsignals am Ende der Assoziationsphase ausgedrückt. Für jede Oberfläche wurde anhand der Immobilisierungsdichte das maximal mögliche Bindungssignal berechnet. Bei einem Injektionsvolumen von 35 μl und einer CaM-Konzentration von 1 μM war sichergestellt, daß theoretisch alle Bindungsplätze belegt werden konnten. Es zeigte sich, daß schon bei der niedrigsten Immobilisierungsdichte von 43 fmol/mm^2 (NOS-I E736K) nur eine Belegung der potentiellen Bindungsstellen zu 35 % erreicht wurde (Tab. 3.8). Bei sehr hohen Immobilisierungsdichten von über 1000 fmol/mm^2 sank die Belegung der Bindungsstellen auf 3 %. In Sättigungsexperimenten mit dem Peptid hhNOS-II WT wurden bei einer niedrigen Immobilisierungsdichte von 37 fmol/mm^2 40 % der Bindungsplätze irreversibel belegt.

Die Ergebnisse bestätigen, daß unabhängig vom verwendeten Peptid ein Zusammenhang zwischen der eingestellten Immobilisierungsdichte und dem Resonanzsignal auf dieser Oberfläche besteht. Je höher die Immobilisierungsdichte ist, desto weniger der potentiell

vorhandenen Bindungsstellen werden von CaM belegt. Daher sollten für SPR-Messungen niedrige Immobilisierungsdichten im Bereich von wenigen fmol/mm² verwendet werden.

Bei vielen Peptiden ließ sich eine niedrige Immobilisierungsdichte nicht einstellen, bzw. auf Flußzellen mit niedriger Immobilisierungsdichte wurden keine Bindungssignale beobachtet. Daher wurden für die Auswertungen immer die Messungen mit der niedrigsten Immobilisierungsdichte des entsprechenden Peptides verwendet. Mit dem Peptid NOS-I VFM konnte nur in wenigen Fälle eine Oberfläche hergestellt werden, die eine CaM-Bindung ermöglichte.

Tab. 3.9: Zusammenhang zwischen der Immobilisierungsdichte (ID) und dem maximal erreichten Resonanzsignal.

Peptid	ID (fmol/mm²)	maximal mögliches Bindungssignal (RU)	mit 1 µM CaM erreichtes Signal (RU)	prozentualer Anteil am Maximalsignal
NOS-I WT	401	6697	2223	33,2 %
NOS-I VKF	80	1336	198	15 %
NOS-I E736K	43	718	250	35 %
NOS-I VKFM	1020	17034	511	3 %
NOS-I VFM	1050	17535	526	3 %
NOS-II V511K	330	5511	188	3,4 %
NOS-II E3K	127	2121	350	16,5 %
NOS-II 3K	140	2338	468	20 %
NOS-II F517K	800	13360	495	3,7 %
Peptid	ID (fmol/mm²)	maximal mögliches Bindungssignal (RU)	in Sättigungs- experimenten erreichtes Signal (RU)	prozentualer Anteil am Maximalsignal
hhNOS-II WT	37	618	250	40 %
hhNOS-II WT *	306	5110	276	5,4 %

Es wurde für jede Oberfläche das maximal mögliche Bindungssignal bei Belegung aller Bindungsstellen mit CaM berechnet. Aus den gemessenen Sensorgrammen wurde das maximale, mit 1 µM CaM erreichte Resonanzsignal abgelesen und dessen prozentualer Anteil am maximalen Bindungssignal berechnet.

* hhNOS-II-Sättigungsexperiment in Abwesenheit von Ca²⁺.

3.3.4.2 CaM-Bindung des Peptides NOS-I WT und seiner Mutanten

Tab. 3.10: Auswertung des Gleichgewichtssignals der SPR-Messungen mit dem Peptid NOS-I WT und den NOS-I-Mutanten.

Peptid	ID (fmol/mm ²)	EC ₅₀ (nM)	K _D Scatchard (nM)
NOS-I WT	401	44,7 ± 7	33,4 ± 2
NOS-I VKF	80	40	39,4
NOS-I E736K	43	59 ± 1	/
NOS-I VKFM	1020	68,2 ± 15	94,7 ± 17,4
NOS-I VFM	1050	531	480

Es wurde die Messung mit der niedrigsten Immobilisierungsdichte (ID) des entsprechenden Peptides ausgewertet. Die Flußrate betrug 5 µl/min. Die Messungen erfolgten in Ca²⁺-Puffer. Die Plots finden sich unter 5.2.

Mit allen Peptiden war eine Bestimmung des EC₅₀-Wertes möglich. Für das Peptid NOS-I E736K ergab sich kein linearer Scatchard-Plot. In Tab. 3.10 sind die EC₅₀- bzw. K_D-Werte der Messungen aufgeführt. Beide Werte liegen immer in der gleichen Größenordnung. Wenn vorhanden, wurde der K_D-Wert als Maß für die Affinität herangezogen. Damit ergab sich für das NOS-I WT-Peptid eine Affinität zu Ca²⁺/CaM von 33,4 nM. Eine ähnliche Affinität hatte das Peptid NOS-I VKF (K_D = 39,4 nM). Die Einführung der Punktmutation E736K dagegen bewirkte eine niedrigere Affinität von 59 nM zu Ca²⁺/CaM. Die Vierfachmutante NOS-I VKFM hatte in Bezug auf den Wildtyp einen 2,8-fach höheren K_D-Wert. Die niedrigste Affinität wiesen die Messungen mit NOS-I VFM auf, die einen 14,4-fach höheren K_D-Wert ergaben als für den Wildtyp.

Sowohl beim EC₅₀-Plot, als auch beim Scatchard-Plot werden die Bindungskonstanten aus dem Gleichgewichtssignal einer Messung bestimmt. Diese Art der Auswertung ist unabhängig davon, wie sich dieses Gleichgewicht eingestellt hat. Massentransportprobleme und Bindung an heterogene Oberflächen gehen ungefiltert in die Auswertung ein. Ebenso bleiben Ratenkonstanten der Bindung und die Form der Dissoziationsphase unberücksichtigt. Besonders letztere zeigte in den Experimenten häufig ein ausgeprägtes Plateau. Der EGTA-Puls diente der Regeneration der Flußzellen. EGTA komplexiert das Ca²⁺ auf der Oberfläche und löst so die Ca²⁺-abhängigen Bindungen auf. Bei Ca²⁺-unabhängiger Bindung können daher Peptid-CaM-Komplexe auch nach der Regeneration bestehen bleiben.

Um das Plateau in der Dissoziationsphase und das Restsignal nach der Regenerationsphase auszuwerten, wurde der prozentuale Anteil des Resonanzsignals am Ende der eingestellten Dissoziationsphase und nach dem Regenerationspuls bestimmt. In Tab. 3.11 sind die

entsprechenden Daten für die NOS-I-Peptide zusammengefaßt. Bei den Messungen mit NOS-I WT-Peptid bestand am Ende der Aufzeichnung der Dissoziationsphase noch 52 % des Signals. Die NOS-I-Mutanten E736K und VKFM unterschieden sich hierin nicht deutlich vom Wildtyp. Mit durchschnittlich 69 % lag der Wert für NOS-I VKF allerdings deutlich höher. Nach der Regenerationsphase erreichte das Signal bei Messungen mit dem NOS-I WT fast wieder den Ausgangswert. Die ermittelten $0,14 \% \pm 0,2 \%$ Restsignal entsprechen $3,1 \pm 4,5$ RU und liegen damit knapp oberhalb des Hintergrundrauschens der Methode (1-2 RU). Für alle NOS-I-Mutanten wurde ein Anteil von 8,9 bis maximal 11,4 % an Signal nach der Regenerationsphase ermittelt. Damit unterschieden sich die drei NOS-I-Mutanten E736K, VKF und VKFM deutlich vom Wildtyp. Für das Peptid NOS-I VFM ergaben sich bei zwei Messungen mit verschiedenen Flußraten (1 und 5 $\mu\text{l/min}$) sehr unterschiedliche Ergebnisse. Während bei 5 $\mu\text{l/min}$ ein ausgeprägtes Plateau bei ca. 100 % festgestellt werden konnte ($\Delta\text{RUd} = 102,4 \pm 8,5 \%$) und der Anteil an Resonanzsignal nach der Regeneration noch $9,4 \pm 6,6 \%$ betrug, lag das Plateau am Ende der eingestellten Dissoziationsphase bei 1 $\mu\text{l/min}$ bei $35,8 \pm 14,1 \%$. ΔRUr lag hier bei 0 %. Eine Messung mit verschiedenen Flußraten (10-100 $\mu\text{l/min}$) auf der gleichen Oberfläche ergab Werte für ΔRUd von 33 bis 60 % und für ΔRUr von 11 bis 23 %. Eine leichte Drift der Basislinie konnte nur bei der Meßreihe mit einer Flußrate von 1 $\mu\text{l/min}$ beobachtet werden und kann damit nicht die Ursache für das hohe Plateau in der 5 $\mu\text{l/min}$ -Messung sein.

Die Ergebnisse aller Messungen sind graphisch in Abb. 3.15 zusammengefaßt.

Tab. 3.11: Auswertung des relativen Resonanzsignals der SPR-Messungen mit dem NOS-I WT-Peptid und den NOS-I-Mutanten.

<i>Peptid</i>	ID (fmol/mm²)	$\Delta\text{RUd} (\%)$	$\Delta\text{RUr} (\%)$	FR ($\mu\text{l/min}$)
NOS-I WT	401	$52,3 \pm 0,5$	$0,14 \pm 0,2$	5
NOS-I VKF	80	$69,3 \pm 7,4$	$8,9 \pm 2,6$	5
NOS-I E736K	43	$64,3 \pm 12,3$	$9,1 \pm 1,4$	5
NOS-I VKFM	1020	$50,7 \pm 11,3$	$11,4 \pm 1,4$	5
NOS-I VFM *	1050	$102,4 \pm 8,5$	$9,4 \pm 6,6$	5
NOS-I VFM *	1050	$35,8 \pm 14,1$	0	1
NOS-I VFM *	1050	33 - 60	11 - 23	10 - 100

Die Messungen erfolgten in Ca^{2+} -Puffer. ΔRUd steht für den prozentualen Anteil an Resonanzsignal nach der eingestellten Dissoziationsphase, ΔRUr für den Anteil, der nach dem Regenerationspuls mit 10 mM EGTA noch besteht. FR: Flußrate. * Messungen mit dem Peptid NOS-I VFM bei unterschiedlichen Flußraten.

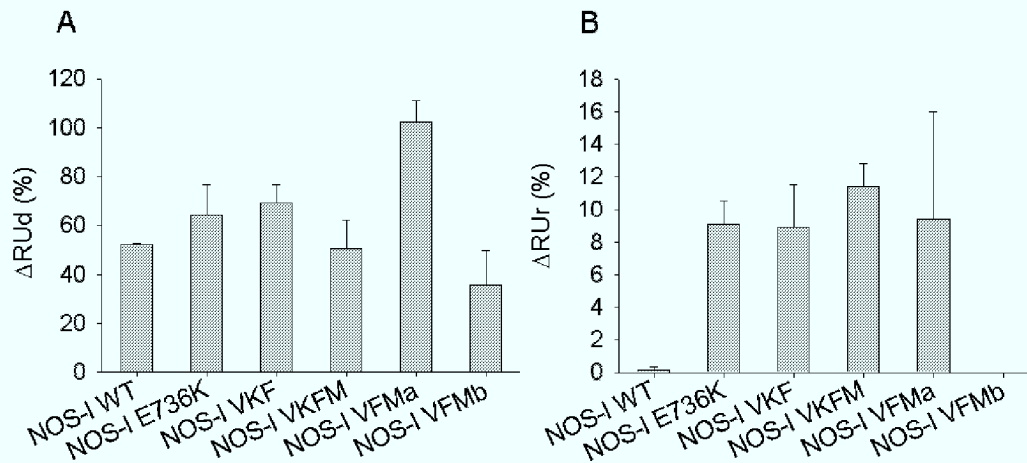


Abb. 3.15: Graphische Darstellung des relativen Resonanzsignals der NOS-I-Peptide. In **A** ist das relative Resonanzsignal ΔRU_d am Ende der eingestellten Dissoziationsphase, in **B** ΔRU_r nach der Regenerationsphase dargestellt. Bei der Messung NOS-I VFMa betrug die Flußrate 5 $\mu\text{l}/\text{min}$, bei NOS-I VFMB 1 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die anderen Messungen erfolgten alle mit 5 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Eine Auswertung der Ratenkonstanten über alle CaM-Konzentrationen gleichzeitig (*globaler Fit*) war nicht möglich (3.3.3). Daher wurde die CaM-Konzentration von 100 nM ausgewählt, um die apparenten Ratenkonstanten der einzelnen Peptide miteinander zu vergleichen (3.3.3). Es wurden Messungen bei einer Flußrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ mit der Methode des *simultanen Fits* nach einer 1:1-Bindung mit Massentransport ausgewertet. Die apparenten Raten- und Bindungskonstanten sind in Tab. 3.12 zusammengefaßt.

Tab. 3.12: Apparente Raten- und Bindungskonstanten der NOS-I-Peptide.

Peptid	ID (fmol/mm ²)	k_a (1/M s)	k_d (1/s)	K_A (1/M)	K_D (nM)
NOS-I WT	401	$3,7e^5$	$3,2e^{-3}$	$1,2e^8$	8,6
NOS-I E736K	43	$2,1e^5$	$2,5e^{-3}$	$8,2e^7$	12
NOS-I VFM *	1050	$4,1e^4$	$5,3e^{-5}$	$7,9e^7$	12,8
NOS-I VKF	80	$3,8e^5$	$8,4e^{-5}$	$4,6e^9$	0.22
NOS-I VKFM	1020	$1,3e^5$	$6,8e^{-5}$	$1,9e^9$	0,54

Die Messungen wurden bei einer Flußrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ und mit 100 nM CaM in Ca^{2+} -Puffer durchgeführt. Es handelt sich um Einzelmessungen, die mit der Auswertungsroutine des *simultanen Fits* nach einer 1:1-Bindung mit Massentransport ausgewertet wurden. * Bei der Messung mit dem Peptid NOS-I VFM wurde eine CaM-Konzentration von 150 nM ausgewertet, da bei Messungen mit $[\text{CaM}] < 150$ nM eine hohe Drift der Basislinie die Auswertung störte. (ID = Immobilisierungsdichte).

Vergleicht man die Messungen der fünf NOS-I-Peptide miteinander, so fällt auf, daß die Assoziationsratenkonstanten mit einer Ausnahme relativ nahe beieinander lagen. Den niedrigsten apparenten Wert für k_a hatte die Peptidmutante NOS-I VFM ($4,1e^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), die anderen Peptide wiesen Werte im Bereich von $1,3$ bis $3,8e^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ auf. Dagegen zeigten sich große Unterschiede in den apparenten Dissoziationsratenkonstanten. Sie nahmen in folgender Reihenfolge ab: NOS-I WT > E736K > VKF > VKFM > VFM. Die Mutante NOS-I VFM zeigte mit $5,3e^{-4} \text{ s}^{-1}$ die niedrigste Dissoziationsratenkonstante. Zusammen mit der niedrigen Assoziationsratenkonstante ergab sich für das Peptid ein apparenter K_D -Wert von $12,8 \text{ nM}$. Die anderen NOS-I-Peptide wiesen apparente Dissoziationskonstanten im Bereich von $0,22$ bis 12 nM auf. Während die Peptidmutanten NOS-I VFM und NOS-I E736K eine leicht geringere Affinität zu $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ zeigten als der Wildtyp, wiesen NOS-I VKF und VKFM eine höhere apparente Affinität auf. Die ausgewerteten Messungen sind in Abb. 3.16 dargestellt.

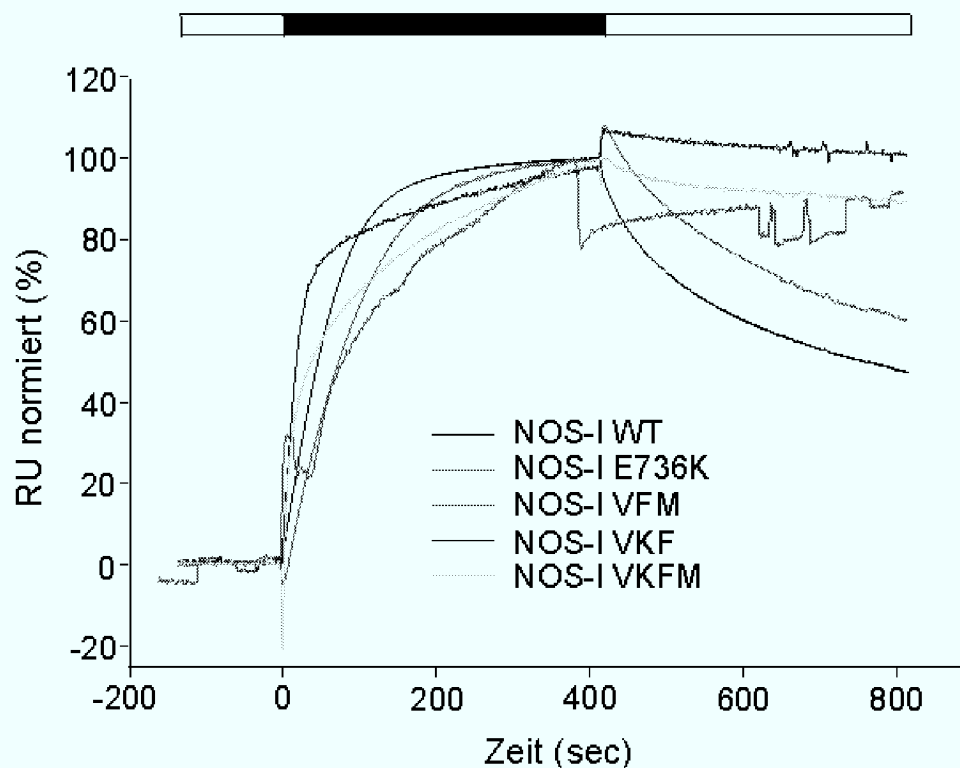


Abb. 3.16: Einzelne Messungen mit den NOS-I-Peptiden in Ca^{2+} -Puffer. Die Daten wurden auf 100 % normiert und der Start der Injektion wurde als Zeitpunkt $t = 0$ gewählt. Der Übersichtlichkeit halber ist der Regenerationspuls nicht dargestellt. Die Flußrate betrug bei allen Messungen $5 \mu\text{l}/\text{min}$ und die CaM -Konzentration lag bei 100 nM (Ausnahme: NOS-I VFM). Für letzteres Peptid ist eine Messung mit 150 nM CaM gezeigt. Der Pufferfluß ist als offener Balken und die CaM -Injektion als schwarzer Balken dargestellt. Die Assoziationsphase war bei der Messung mit NOS-I VFM leicht verkürzt. Die Auswertung der Daten findet sich in Tab. 3.11.

3.3.4.3 CaM-Bindung des Peptides hhNOS-II WT

Mit dem Peptid hhNOS-II WT konnte eine Bindung an $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ und ApoCaM nachgewiesen werden.

$\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Bindung

Es konnte kein K_D - oder EC_{50} -Wert der hhNOS-II WT-Bindung an $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ mittels Scatchard- oder EC_{50} -Plot ermittelt werden. Da das Peptid zu einigen Anteilen irreversibel an $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ band, akkumulierte CaM auf der Oberfläche und sättigte diese. So wurden die Bindungssignale mit steigenden Konzentrationen an CaM flacher. In Abb. 3.17 ist eine einzelne Messung mit 50 nM CaM dargestellt. Man erkennt deutlich das hohe Plateau in der Dissoziationsphase und den Anstieg der Basislinie nach dem Regenerationspuls. Der Abfall des Signals zu Beginn der Dissoziationsphase war durch einen Puffersprung bedingt, der für diese Abbildung nicht abgezogen worden war. Für die Auswertung der Messungen wurde der Puffersprung dagegen immer abgezogen.

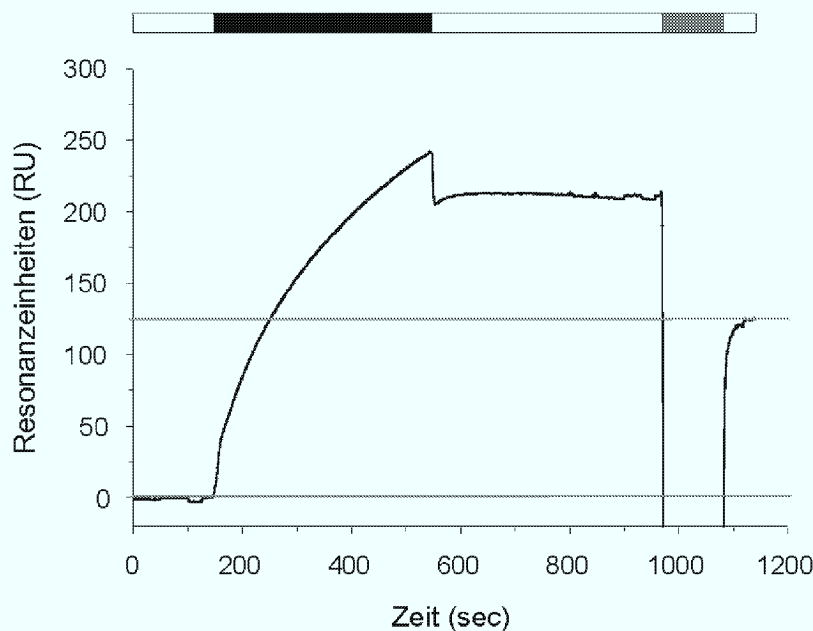


Abb. 3.17: Einzelmessung mit 50 nM CaM in Ca^{2+} -Puffer auf einer hhNOS-II WT-Oberfläche ($\text{ID} = 92 \text{ fmol/mm}^2$). Die CaM-Injektion ist als schwarzer Balken dargestellt, die EGTA-Injektion als grauer Balken. Der offene Balken symbolisiert den Pufferstrom. Die grauen Linien verdeutlichen die Basislinie vor (unten) und nach (oben) der Messung. Der Puffersprung wurde nicht abgezogen. Es wurden 18% der theoretisch vorhandenen Bindungsplätze belegt.

Eine Auswertung der Signale am Ende der eingestellten Dissoziationsphase (ΔRUd) ergab, daß fast 98 % des Resonanzsignals bestehen blieb ($\Delta\text{RUd} = 97,5 \%$). Durch den EGTA-Puls

wurde das Signal anschließend nur um 47 % vermindert ($\Delta RU_r = 51,4 \%$). Die Daten sind in Tab. 3.15 zusammen mit den Daten für die NOS-II-Mutanten aufgeführt.

In Abb. 3.18 ist ein Sättigungsexperiment in Anwesenheit von Ca^{2+} gezeigt. Es wurde wiederholt 50 nM CaM injiziert. Nach jeder Injektion erfolgte eine Dissoziationsphase und ein Regenerationspuls. Man sieht deutlich, daß das Signal auch nach dem Regenerationspuls nicht auf die Basislinie zurückfiel. So kam es mit wiederholter Injektion zur Akkumulation auf der Oberfläche. Nach fünf Injektionen waren 40 % aller potentiellen Bindungsplätze belegt.

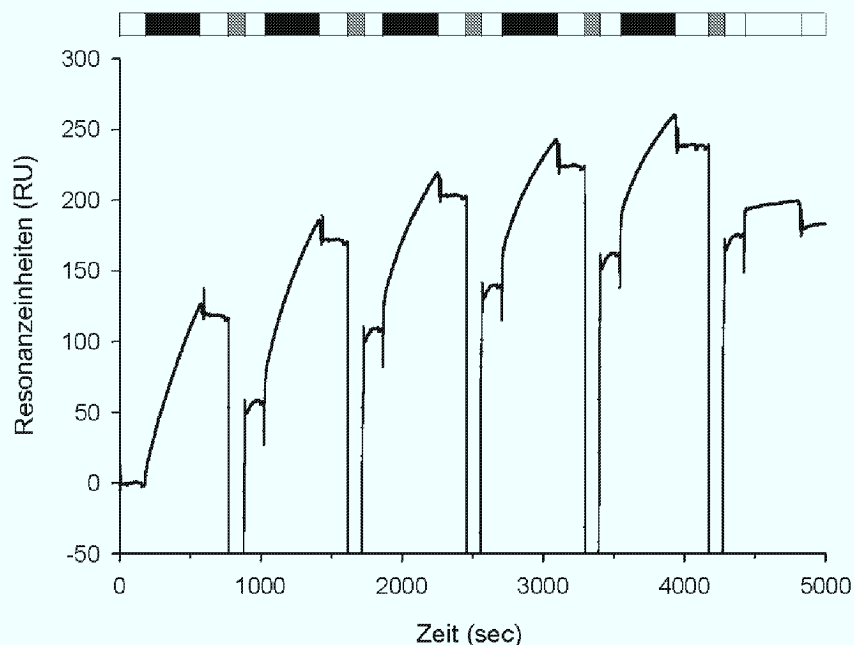


Abb. 3.18: Sättigungsexperiment auf einer hhNOS-II WT-Oberfläche (37 fmol/mm^2). Es wurde wiederholt 50 nM CaM in Ca^{2+} -Puffer injiziert (schwarze Balken). Nach jeder Injektion erfolgte eine kurze Dissoziationsphase (offener Balken) und ein Regenerationspuls (grauer Balken). Zum Schluß wurde einmal Puffer injiziert, um die Größe des Puffersprungs zu detektieren.

Die Auswertung einer einzelnen Messung mit 50 nM CaM bei einer Flußrate von $5 \mu\text{l/min}$ mittels *simultane Fit* nach einer 1:1-Bindung mit Massentransport ergab nach Abzug der Kontrollmessungen eine apparente Dissoziationskonstante von 2 nM. Dieser Wert bestätigt die Messungen von MATSUBARA et al. (1997), die in Experimenten mit einem hhNOS-II Peptid und dansyliertem CaM in Anwesenheit von Ca^{2+} einen K_D -Wert von 3,3 nM ermittelten. Die mit hhNOS-II WT-Peptid ermittelten Daten sind in Tab. 3.13 und Abb. 3.20 zusammen mit den Daten für die ApoCaM-Bindung dargestellt.

ApoCaM-Bindung

Es wurden Sättigungsexperimente in Abwesenheit von Ca^{2+} durchgeführt. ApoCaM (100 nM) wurde wiederholt injiziert. Ein solches Experiment ist in Abb. 3.19 dargestellt.

Während das Signal bei der ersten ApoCaM-Injektion noch stark anstieg, wurde der Anstieg mit jeder weiteren Injektion flacher. Innerhalb der kurzen Dissoziationsphasen nahm das Signal immer um ca. 5 % ab. Der EGTA-Puls sollte zeigen, ob sich das Signal durch den Pufferwechsel veränderte. Es nahm ebenfalls um ca. 5 % ab. Insgesamt wurden nur 5,4 % der potentiellen Bindungsplätze belegt.

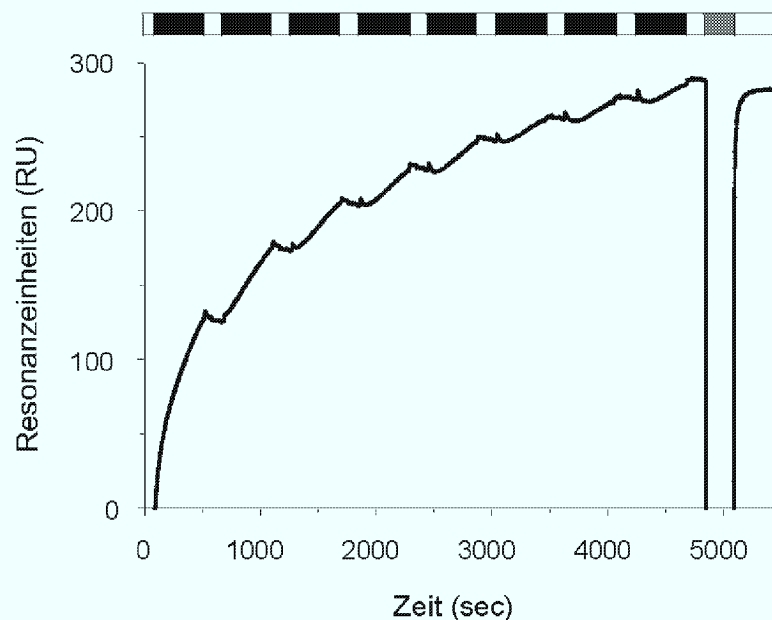


Abb. 3.19: Sättigungsexperiment auf einer hhNOS-II WT-Oberfläche (306 fmol/mm^2) in Abwesenheit von Ca^{2+} . Es wurde wiederholt 100 nM ApoCaM (schwarzer Balken) injiziert. Zwischen den Injektionen erfolgten kurze Dissoziationsphasen (offene Balken). Zum Schluß wurde einmalig 10 mM EGTA injiziert (grauer Balken).

Die Auswertung einer einzelnen Messung mit dem *simultanen Fit* nach einer 1:1-Bindung mit Massentransport ergab eine etwas höhere apparente Dissoziationskonstante in EGTA-Puffer als in Anwesenheit von Ca^{2+} . Der K_D -Wert lag bei 6,9 nM. Die einzelnen apparenten Raten- und Bindungskonstanten der Messungen in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} sind in Tab. 3.13 aufgeführt. Exemplarische Messungen sind in Abb. 3.20 dargestellt. MATSUBARA et al. (1997) hatten für ein hhNOS-II-Peptid eine ApoCaM-Affinität von 41 nM ermittelt.

Tab. 3.13: Apparente Raten- und Bindungskonstanten des Peptides hhNOS-II WT.

Puffer	k_a (1/M s)	k_d (1/s)	K_A (1/M)	K_D (nM)
Ca ²⁺ -Puffer	$1,5e^5$	$3,0e^{-4}$	$5,0e^8$	2
EGTA-Puffer	$2,4e^5$	$1,6e^{-3}$	$1,5e^8$	6,9

Die Messungen wurden bei einer Flußrate von 5 µl/min und mit 50 nM CaM bei einer Immobilisierungsdichte von 92 fmol/mm² durchgeführt. Es handelt sich um Einzelmessungen, die mit der Auswertungsroutine des *simultanen Fits* nach einer 1:1-Bindung mit Massentransport ausgewertet wurden.

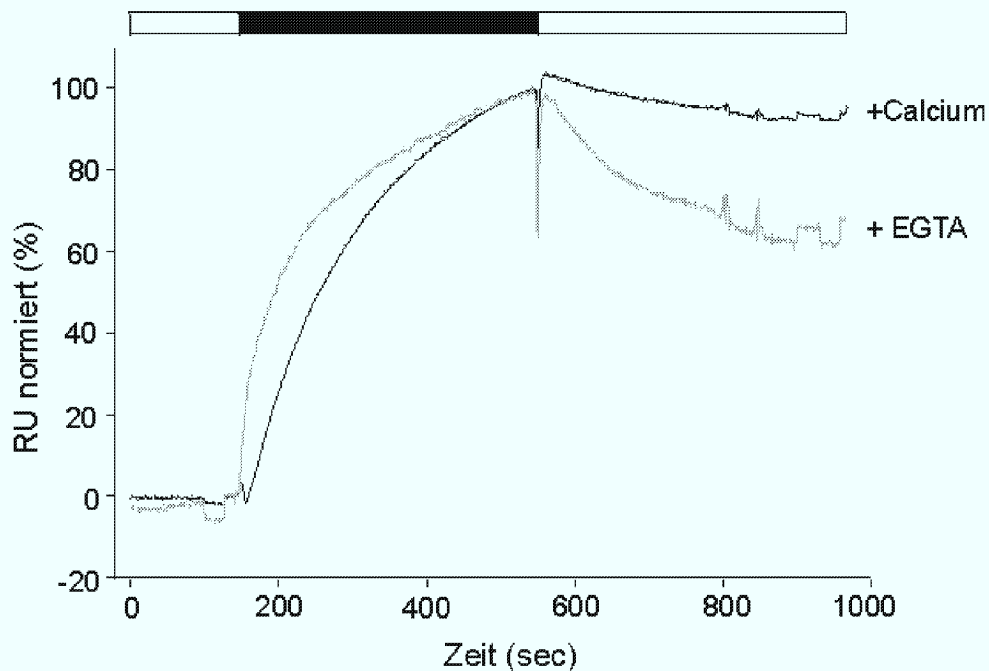


Abb. 3.20: Einzelne Messungen mit dem Peptid hhNOS-II WT in Ca²⁺- (schwarz) und EGTA-Puffer (grau). Die Daten wurden auf 100 % normiert und der Regenerationspuls wurde der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt. Die Flußrate betrug 5 µl/min. Die Messungen erfolgten mit 50 nM CaM und die Immobilisierungsdichte betrug 92 fmol/mm². Der Pufferfluß ist als offener Balken und die CaM-Injektion als schwarzer Balken dargestellt. Die Auswertung der Daten findet sich in Tab. 3.12.

3.3.4.4 CaM-Bindung der mutierten NOS-II-Peptide

Die Affinität des mmNOS-II WT-Peptides gegenüber Ca²⁺/CaM liegt im subnanomolaren Bereich (ZOCHE et al., 1996). Für die NOS-II-Peptidmutanten wurden EC₅₀- bzw. K_D-Werte im nanomolaren Bereich ermittelt. Auch bei diesen Messungen konnte nicht für alle Peptide eine niedrige Immobilisierungsdichte eingestellt werden. Es zeigte sich auch hier ein Zusammenhang zwischen hoher Immobilisierungsdichte und einer geringen Belegung der potentiell vorhandenen Bindungsstellen (siehe 3.3.2.1).

Nur für Messungen mit dem Peptid NOS-II F517K konnte ein linearer Scatchard-Plot erstellt werden. Daher wurden im Fall der NOS-II-Mutanten die EC_{50} -Werte zum Vergleich der Affinitäten herangezogen. In Tab. 3.13 sind die Daten zusammengefaßt.

Die Einführung der Mutation V511K ergab einen EC_{50} -Wert von 69 nM. Ein 3,5-fach höherer EC_{50} -Wert ergab sich für die Einzelmutante NOS-II F517K. Messungen mit der Dreifachmutante NOS-II 3K ergaben einen EC_{50} -Wert von 131 nM. Die Einführung der vierten Mutation K514E (NOS-II E3K) erhöhte die Affinität zu Ca^{2+} /CaM wieder und ergab einen EC_{50} -Wert von 55 nM.

Tab. 3.14: Auswertung des Gleichgewichtsignals der SPR-Messungen mit den NOS-II-Mutanten.

Peptid	ID (fmol/mm ²)	EC_{50} (nM)	K_D Scatchard (nM)
NOS-II V511K	330	68,9	/
NOS-II E3K	127	$55,0 \pm 5$	/
NOS-II 3K	140	$131,3 \pm 4,3$	/
NOS-II F517K	800	$241,8 \pm 33,8$	141

Es wurden die Messungen mit der niedrigsten Immobilisierungsdichte des entsprechenden Peptides ausgewertet. Die Flußrate betrug 5 μ l/min. Die Messungen erfolgten in Ca^{2+} -Puffer. Die Plots finden sich unter 5.2.

Die Auswertung ΔRU_d bzw. ΔRU_r zeigte für hhNOS-II WT, daß das Resonanzsignal in der Dissoziationsphase kaum abnahm ($\Delta RU_d = 98 \%$) und nach der Regenerationsphase noch 50 % des Signals bestehen blieb. Für alle NOS-II-Mutanten fielen die Werte für ΔRU_d niedriger aus als für den Wildtyp. Mit 83,2 % lag er für die Einzelmutante NOS-II F517K am höchsten und für die Dreifachmutante NOS-II 3K mit 63,6 % am niedrigsten. Die Daten sind in Tab. 3.15 zusammengefaßt. Die Vierfachmutante NOS-II E3K zeigte ein deutlicher ausgeprägtes Plateau, als die Dreifachmutante NOS-II 3K. Ihr Verhalten ähnelte damit mehr dem NOS-II WT-Peptid als dem der Mutante NOS-II 3K. Mit einem Wert von 25 % für ΔRU_r wies die Einzelmutante NOS-II V511K das höchste prozentuale Resonanzsignal nach der Ca^{2+} -Komplexierung auf. Dagegen ging das Signal bei Messungen mit NOS-II F517K auf den Ausgangswert zurück. Auch die beiden Mehrfachmutanten wiesen mit 2,2 und 5,9 % nur noch ein geringes Resonanzsignal nach dem Regenerationspuls auf. Die Daten sind graphisch in Abb. 3.21 dargestellt.

Tab. 3.15: Auswertung des relativen Resonanzsignals der SPR-Messungen mit hhNOS-II WT und den NOS-II-Mutanten.

Peptid	ID (fmol/mm ²)	ΔRU_d (%)	ΔRU_r (%)
hhNOS-II WT	92	$97,5 \pm 3,4$	$51,4 \pm 1,5$
NOS-II V511K	330	$64,5 \pm 10,6$	$25,0 \pm 12,9$
NOS-II E3K	127	$73,7 \pm 8,1$	$5,9 \pm 3,4$
NOS-II 3K	140	$63,6 \pm 2,5$	$2,2 \pm 1,4$
NOS-II F517K	800	$83,2 \pm 2,9$	0

Die Flußrate betrug 5 μ l/min. Die Messungen erfolgten in Ca²⁺-Puffer. ΔRU_d steht für den prozentualen Anteil an Resonanzsignal nach der eingestellten Dissoziationsphase, ΔRU_r für den Anteil, der nach dem Regenerationspuls mit 10 mM EGTA noch bestand.

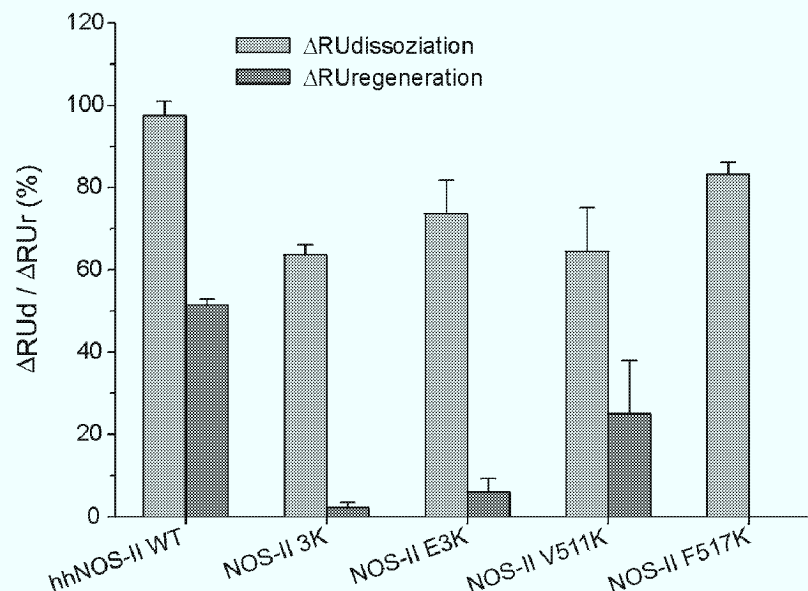


Abb. 3.21: Graphische Darstellung des relativen Resonanzsignals der NOS-II-Peptide. Die hellgrauen Balken stellen das relative Resonanzsignal am Ende der Dissoziationsphase (ΔRU_d) dar, die dunkelgrauen Balken das relative Resonanzsignal nach der Regenerationsphase (ΔRU_r).

Eine Auswertung der Ratenkonstanten über alle CaM-Konzentrationen gleichzeitig (*globaler Fit*) war auch für die NOS-II-Mutanten nicht möglich (3.3.3). Um die apparenten Raten- und Bindungskonstanten der Peptide miteinander zu vergleichen, sollten daher Auswertungen bei einer möglichst niedrigen CaM-Konzentration gewählt werden (3.3.3). In drei von vier Fällen lagen Messungen mit 50 nM CaM und einer Flußrate von 5 μ l/min vor. Daher wurden diese Messungen mit der Methode des *simultanen Fits* nach einer 1:1-Bindung mit Massentransport ausgewertet. Die fehlenden Daten für das Peptid NOS-II F517K bei 50 nM CaM und 5 μ l/min

wurden durch Messungen mit einer höheren Flußrate (100 $\mu\text{l}/\text{min}$) ergänzt. Die apparenten Raten- und Bindungskonstanten sind in Tab. 3.16 aufgelistet.

Die apparenten Assoziationsratenkonstanten der beiden Peptide V511K und E3K unterschieden sich um einen Faktor von 3,4. Das Peptid NOS-II 3K hatte dagegen mit $1,6\text{e}^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ einen wesentlich niedrigeren k_a -Wert. Im Gegensatz zu den NOS-I-Peptiden (Tab. 3.12) lagen hier die apparenten Dissoziationsratenkonstanten nahe beieinander. Alle drei NOS-II-Mutanten wiesen eine apparente Affinität zu $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ im nanomolaren Bereich auf, die in folgender Reihenfolge zunahm: NOS-II 3K < E3K < V511K.

Die Meßdaten sind in Abb. 3.22 dargestellt.

Tab. 3.16: Apparente Raten- und Bindungskonstanten der NOS-II-Peptide.

Peptid	ID (fmol/ mm^2)	k_a (1/M s)	k_d (1/s)	K_A (1/M)	K_D (nM)
NOS-II V511K	330	$4,8\text{e}^5$	$1,8\text{e}^{-4}$	$2,7\text{e}^9$	0,21
NOS-II F517K *	250	$2,3\text{e}^8$	$5,7\text{e}^{-2}$	$4,1\text{e}^9$	0,24
NOS-II 3K	690	$1,6\text{e}^4$	$3,4\text{e}^{-4}$	$4,6\text{e}^7$	32
NOS-II E3K	127	$1,4\text{e}^5$	$3,8\text{e}^{-4}$	$3,8\text{e}^8$	2,6

Die Messungen wurden bei einer Flußrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ und mit 50 nM CaM in Ca^{2+} -Puffer durchgeführt. Es handelt sich um Einzelmessungen, die mit der Auswertungsroutine des *simultanen Fits* nach einer 1:1-Bindung mit Massentransport ausgewertet wurden. Für das Peptid NOS-II F517K lag keine auswertbare Messung mit 50 nM CaM und einer Flußrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ vor. Daher wurde eine Messung mit 50 nM CaM bei 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ (*) ausgewertet. (ID = Immobilisierungsdichte).

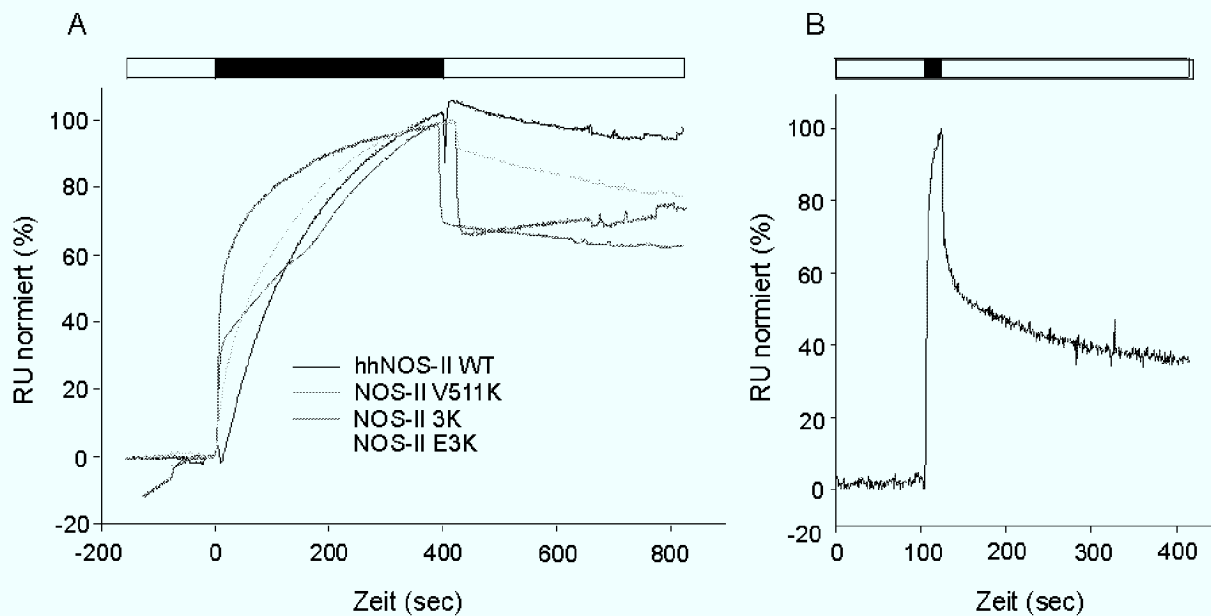


Abb. 3.22 (vorhergehende Seite): A Messungen mit den NOS-II-Peptiden in Ca^{2+} -Puffer. Die Daten wurden auf 100 % normiert und der Start der Injektion wurde als Zeitpunkt $t = 0$ gewählt. Der Übersichtlichkeit halber wurde der Regenerationspuls nicht dargestellt. Die Flußrate betrug bei allen Messungen 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ und die CaM-Konzentration lag bei 50 nM. Die starke Drift der Basislinie bei den Messung mit NOS-II V511K wurde in der Auswertung berücksichtigt. **B** Einzelne Messung mit dem Peptid NOS-II F517K bei einer Flußrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die CaM-Konzentration betrug 50 nM. Die Messung wurde ebenfalls auf 100 % normiert. Der Pufferfluß ist als offener Balken und die CaM-Injektion als schwarzer Balken dargestellt. Die Auswertung der Daten findet sich in Tab. 3.15.

Die apparenten Raten- und Bindungskonstanten des Peptides NOS-II F517K können nur unter Vorbehalt mit den anderen Peptiden verglichen werden, da eine Messung mit einer Flußrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ ausgewertet wurde. Es ergab sich eine subnanomolare apparente Affinität dieses Peptides zu $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$.

3.3.4 Zusammenfassung der SPR-Daten

Es konnte eine Aussage über die Affinität der Peptide zu CaM bzw. die EC_{50} -Werte der Bindung getroffen werden. Die apparenten Raten- und Bindungskonstanten konnten anhand von ausgewählten Messungen bestimmt werden. Zusätzlich zu den Bindungskonstanten wurde der prozentuale Anteil des Resonanzsignals nach der eingestellten Dissoziationsphase und nach der Regenerationsphase (relatives Resonanzsignal) untersucht.

NOS-I-CaM-Bindungsstelle:

- Mit allen NOS-I-Peptiden konnte eine CaM-Bindung in Anwesenheit von Ca^{2+} nachgewiesen werden.
- Keines der Peptide zeigte eine Bindung an ApoCaM.
- Die Auswertung mittels Scatchard-Plot und EC_{50} -Plot ergab für alle Peptidmutanten eine Abnahme der Affinität zu $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ in folgender Reihenfolge: Dreifachmutante VKF < NOS-I E736K < Vierfachmutante VKFM < Dreifachmutante VFM.
- Alle Mutationen in der NOS-I-CaM-Bindungsstelle führten dazu, daß das Resonanzsignal nach dem Regenerationspuls nicht ganz auf den Ausgangswert zurück ging.
- Die apparenten Assoziationsratenkonstanten der Peptide lagen relativ nah beieinander; die apparenten Dissoziationsratenkonstanten nahmen in folgender Reihenfolge ab: NOS-I WT > E736K > VKF > VKFM > VFM. Für die Peptide NOS-I WT, E736K und VFM ergab sich eine apparente Affinität zu $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ im nanomolaren und für VKF und VKFM im subnanomolaren Bereich.

Peptid hhNOS-II WT:

- Nur mit dem Peptid hhNOS-II WT konnte eine hochaffine ApoCaM-Bindung gezeigt werden. Hier konnten die Flußzellen in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} mit CaM gesättigt werden.
- Die Auswertung einzelner Messungen in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} ergaben apparente Affinitäten zu CaM im nanomolaren Bereich. Die Ergebnisse decken sich gut mit Literaturwerten (MATSUBARA et al., 1997), wobei für die Bindung an ApoCaM ein etwas niedrigerer apparenter K_D -Wert ermittelt wurde.

mmNOS-II-CaM-Bindungsstelle:

- Mit allen Peptiden außer mmNOS-II WT und NOS-II M521K konnte eine Ca^{2+} /CaM-Bindung gemessen werden.
- Die Auswertung mittels Scatchard-Plot und EC_{50} -Plot ergab für alle Peptidmutanten eine Affinität zu Ca^{2+} /CaM im nanomolaren Bereich. Nimmt man für das NOS-II WT-Peptid eine subnanomolare Affinität an (ZOCHE et al., 1996), so lag der K_D -Wert aller Mutanten höher, als der des Wildtyps. Dabei nahm die Affinität zu Ca^{2+} /CaM in folgender Reihenfolge ab: Vierfachmutante E3K > NOS-II V511K > Dreifachmutante 3K > NOS-II F517K.
- Während bei Messungen mit dem hhNOS-II WT-Peptid noch 50 % des Resonanzsignals nach dem Regenerationspuls bestehen blieb, nahm dieser Anteil bei den Peptidmutanten ab. Das Signal ging bei Messungen mit NOS-II F517K sogar bis auf den Ausgangswert zurück.
- Die apparenten Dissoziationsratenkonstanten der Peptide NOS-II -V511K, 3K und E3K lagen nah beieinander. Die Dissoziationsratenkonstanten nahmen in folgender Reihenfolge ab: E3K > 3K > V511K. Die Affinität zu Ca^{2+} /CaM nahm in folgender Reihenfolge zu: 3K (32 nM) < E3K (2,6 nM) < V511K (0,21 nM). Das Peptid NOS-II F517K wies eine um zwei Größenordnungen höhere apparente Dissoziationsratenkonstante auf. Die apparente Affinität lag im subnanomolaren Bereich (0,24 nM).

Sowohl in den ITC-Messungen (3.2) wie auch in den SPR-Studien konnte mit dem Peptid mmNOS-II WT keine CaM-Bindung nachgewiesen werden. Das Peptid hhNOS-II dagegen zeigte ausschließlich in den SPR-Studien eine Bindung an CaM. Diese Beobachtung und die Tatsache, daß besonders das Peptid mmNOS-II WT in hohen Konzentrationen ein Präzipitat in H_2O bildete, führte zu der Vermutung, daß die NOS-II WT-Peptide zu

Selbstaggregation neigten. Dies sollte mittels Größenausschlußchromatographie (3.4) überprüft werden.

3.4 Größenausschlußchromatographie

Die Größenausschlußchromatographie (SEC) ermöglicht das Auftrennen von Proteinen oder Peptiden entsprechend ihrer Größe. Die Chromatographie sollte Aufschluß darüber geben, ob die Peptide mmNOS-II WT und hhNOS-II WT Aggregate bildeten. Die Säule (Superdex Peptide von Amersham Pharmacia Biotech) war mit Cytochrom c und Aprotinin kalibriert worden. Die ermittelten Retentionsvolumina entsprachen den Angaben im Säulenhandbuch (Amersham Pharmacia Biotech). Daher wurde mit den Angaben aus dem Handbuch und den selbst gemessenen Werten eine Kalibriergerade für die Säule erstellt (Abb. 3.23).

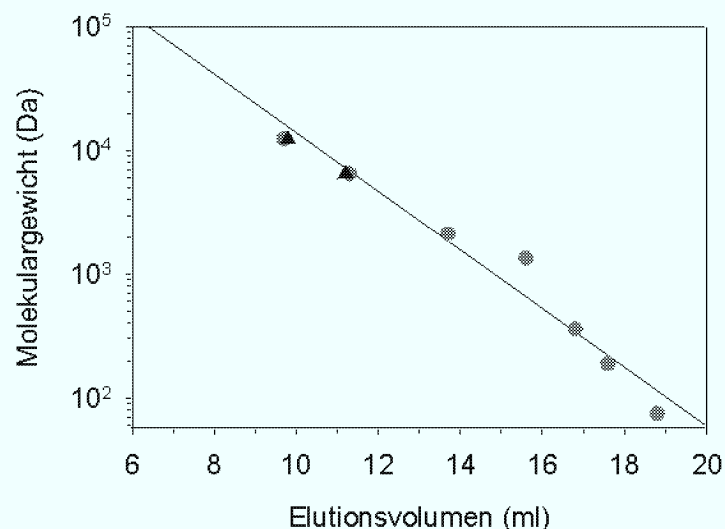


Abb. 3.23: Kalibriergerade für die SEC-Säule „Superdex Peptide“. Die grauen Punkte stehen für die Werte aus dem Säulenhandbuch. Die schwarzen Dreiecke symbolisieren die eigenen Messungen. Folgende Substanzen wurden verwendet: Cytochrom c (12.500 Da), Aprotinin (6500 Da), Gastrin I (2126 Da), Substanz P (1348 Da), (Glycin)₆ (360 Da), (Glycin)₃ (189 Da) und Glycin (75 Da).

Das Ausschlußvolumen (AV) der Säule wurde mit Dextran-Blau bestimmt. Es ergab sich ein Ausschlußvolumen von 8 ml. Anhand der Kalibriergeraden konnte ein relatives Molekulargewicht pro Peptid bestimmt werden. In Tabelle 3.17 sind die Ergebnisse für alle Messungen aufgeführt.

Tab. 3.17: Ergebnisse der Größenausschlußchromatographie (SEC).

Peptid	Puffer	RV (ml)	MG (Da)	Cystein	Peptid (%)
NOS-I WT	Ca ²⁺	8,8 / 10,5	27.000 / 11.000	Nein	24
	EGTA	8,8 / 10,5 / 16	27.000 / 11.000 / 550	Ja	29
hhNOS-II WT	Ca ²⁺	7,5 / 10,5	AV / 11.000	?	100
	EGTA	7,5 / 10,5	AV / 11.000	Nein	100
mmNOS-II WT	Ca ²⁺	7,5	AV	Nein	15
	EGTA	7,5	AV	Nein	15
NOS-II 3K	Ca ²⁺	10,5	11.000	Ja	40
	EGTA	11	8000	Ja	64
NOS-II E3K	Ca ²⁺	10,5	11.000	Nein	74
	EGTA	11	8000	Ja	64

RV = Retentionsvolumen; MG = Molekulargewicht; AV = Ausschlußvolumen; Cystein = positives Ergebnis der Cysteinbestimmung; Peptid (%) = prozentualer Anteil der eingesetzten Peptidmenge, der im Eluat detektiert werden konnte.

Zunächst fiel auf, daß keines der Peptide ein Retentionsvolumen aufwies, das einem Molekulargewicht von 3300-3450 Da entsprach. Wie Tabelle 2.1 entnommen werden kann, liegt das durchschnittliche Molekulargewicht der NOS-I-Peptide bei ca. 3450 Da und der NOS-II-Peptide bei ca. 3300 Da. Mehrere Gründe sprechen aber dafür, daß es sich bei den Peptiden, die ein Retentionsvolumen von 10,5 bis 11 ml ($\approx$ 8000-11.000 Da) aufwiesen, um Peptidmonomere handelte:

- Die Peptide nehmen in Lösung eine zufällige Konformation an (NOS-I: ZHANG und VOGEL, 1994; NOS-II: MATSUBARA et al., 1997) und weisen keine globuläre Form auf. Daher kann die SEC ein höheres apparentes Molekulargewicht ergeben, als die Aminosäuresequenz erwarten läßt.
- Zumindest das NOS-I WT-Peptid liegt in wäßriger Lösung als Monomer vor (ZHANG und VOGEL, 1994). Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten der Peptide können ausgeschlossen werden, da die Bestimmung von freien Cysteingruppen in vielen Fällen positiv ausfiel. Ein negatives Ergebnis der Cysteingruppenbestimmung korrelierte nicht mit einem höheren Retentionsvolumen (Tab. 3.13).
- Durch die logarithmische Scala der Eichgerade führt auch schon eine kleine Verschiebung im Retentionsvolumen zu einem großen Fehler in der Bestimmung des Molekulargewichts, was zu dem erhöhten apparenten Molekulargewicht beitragen kann.

Geht man von Peptidmonomeren bei einem Retentionsvolumen von 10,5 bis 11 ml aus, lägen die Peptide NOS-II 3K und NOS-II E3K sowohl in Ca^{2+} - wie auch in EGTA-Puffer als Monomere vor. Ebenfalls eluierten die Peptide NOS-I WT und hhNOS-II WT in beiden Puffern zum Teil als Monomere. Bei NOS-I WT trat noch ein Peak bei ca. 27.000 Da auf, der eventuell Dimeren oder Trimeren entsprechen könnte. Ein weiterer Peak in EGTA-Puffer bei 550 Da blieb ungeklärt. Abbauprodukte des Peptides hätten in beiden Puffern zu sehen sein müssen. Wahrscheinlich handelte es sich um eine Verunreinigung. Ein Teil der Peptidlösung hhNOS-II WT und das gesamte Peptid mmNOS-II WT eluierten im Ausschlußvolumen. Es handelte sich wahrscheinlich um größere Aggregate der Peptide. Eine Aussage über die Größe konnte nicht gemacht werden.

Um festzustellen, ob das gesamte, eingesetzte Protein im Eluat enthalten war, wurde die Proteinmenge aller Fraktionen addiert und der prozentuale Anteil an der eingesetzten Proteinmenge (400 µg) bestimmt (Tab. 3.16). Für das Peptid hhNOS-II WT konnte die gesamte Proteinmenge im Eluat detektiert werden. Hier fällt auf, daß in beiden Puffern das Peptid über einen weiten Elutionsbereich „schmierte“. Nach den beiden, deutlichen Peaks blieb der Proteingehalt der Fraktionen mit 3,75 bzw. 7,5 µg pro Fraktion recht hoch (siehe Abb. 3.24 E & F). Für das Peptid mmNOS-II WT wurde in beiden Puffern nur 15 % der eingesetzten Proteinmenge detektiert, für NOS-I WT 24 bzw. 29 % und für die beiden NOS-II-Mutanten 40-74 %. Es gibt mehrere Möglichkeiten, warum nicht die gesamte Menge an eingesetztem Peptid wiedergefunden werden konnte: Die Nachweisgrenze der BRADFORD-Proteinbestimmung liegt bei 1-2 µg Protein. Lag die Peptidmenge in einer Fraktion darunter, konnte sie nicht detektiert werden. Peptide können innerhalb der Chromatographie-Anlage an Schläuchen oder an der Säule über hydrophobe Interaktionen haften bleiben. Dies sollte durch einen Anteil an Detergenz im Puffer vermieden werden, kann aber trotzdem nicht ausgeschlossen werden. Sehr große Peptidaggregate können vom Filtersystem der Chromatographie-Anlage zurückgehalten werden.

In den gleichen Fraktionen, in denen der Hauptanteil an Protein detektiert wurde, sollten sich auch freie Cysteingruppen nachweisen lassen. Dies war aber nicht immer der Fall (Tab. 3.16). Zum Beispiel ließen sich bei dem Peptid NOS-I WT in der Chromatographie mit Ca^{2+} -Puffer keine freien Cysteingruppen nachweisen, während in der Chromatographie mit EGTA-Puffer ein deutlicher Peak detektiert werden konnte. In den entsprechenden Fraktionen befand sich aber ungefähr gleich viel Protein (je 10 bzw. 12 µg). Disulfidbrücken können ausgeschlossen werden, da die SEC in Ca^{2+} - und in EGTA-Puffer das gleiche Retentionsvolumen für das Peptid ergab. Es ließ sich auch kein Zusammenhang zu den verwendeten Puffern feststellen.

Da vor der Chromatographie die Cysteingruppenbestimmung zur Konzentrationsbestimmung der Peptide immer positiv ausgefallen war, könnte eine Oxidation der Cysteingruppen während der Chromatographie für die negativen Ergebnisse der Cysteinbestimmung verantwortlich sein.

Wenn die Bestimmung der freien Cysteingruppen ein positives Ergebnis aufwies, dann stimmte ihr Maximum mit dem aus der Proteinbestimmung überein. In einem Fall (hhNOS-II WT in EGTA-Puffer) konnten freie Cysteinreste bei einem Retentionsvolumen von 22 bis 24 ml nachgewiesen werden. Da dieses Peptid nicht N-terminal mit einem Cystein modifiziert war, sind freie Cysteine als Abbauprodukte ausgeschlossen. Woher das positive Signal in den letzten Fraktionen kam, blieb ungeklärt. Dies ist in der Tabelle 3.16 mit einem Fragezeichen gekennzeichnet.

Die Größenausschlußchromatographie bestätigte die Vermutung, daß die Peptide mmNOS-II WT und hhNOS-II WT Aggregate bildeten, während dies bei NOS-I WT und den verwendeten NOS-II-Mutanten nicht der Fall war. Das Peptid mmNOS-II WT schien vollständig aggregiert vorzuliegen. Das erklärt auch, warum mit diesem Peptid keine erfolgreichen Interaktionsstudien durchgeführt werden konnten. Zumindest eine Fraktion des Peptides hhNOS-II WT lag als Monomer vor. Dieser Peptidanteil ermöglichte erfolgreiche SPR-Messungen, da zur Immobilisierung nur geringe Peptidmengen benötigt wurden. Für ITC-Studien sind dagegen Mengen im mikromolaren Bereich notwendig, um ausreichende Signale zu erzeugen. Bei zu geringen Mengen an monomerem Peptid kann das Bindungssignal unterhalb der Detektionsgrenze des Gerätes gelegen haben. Die Peptide NOS-II 3K und NOS-II E3K lagen auch in Ca^{2+} -Puffer vollständig als Monomere vor.

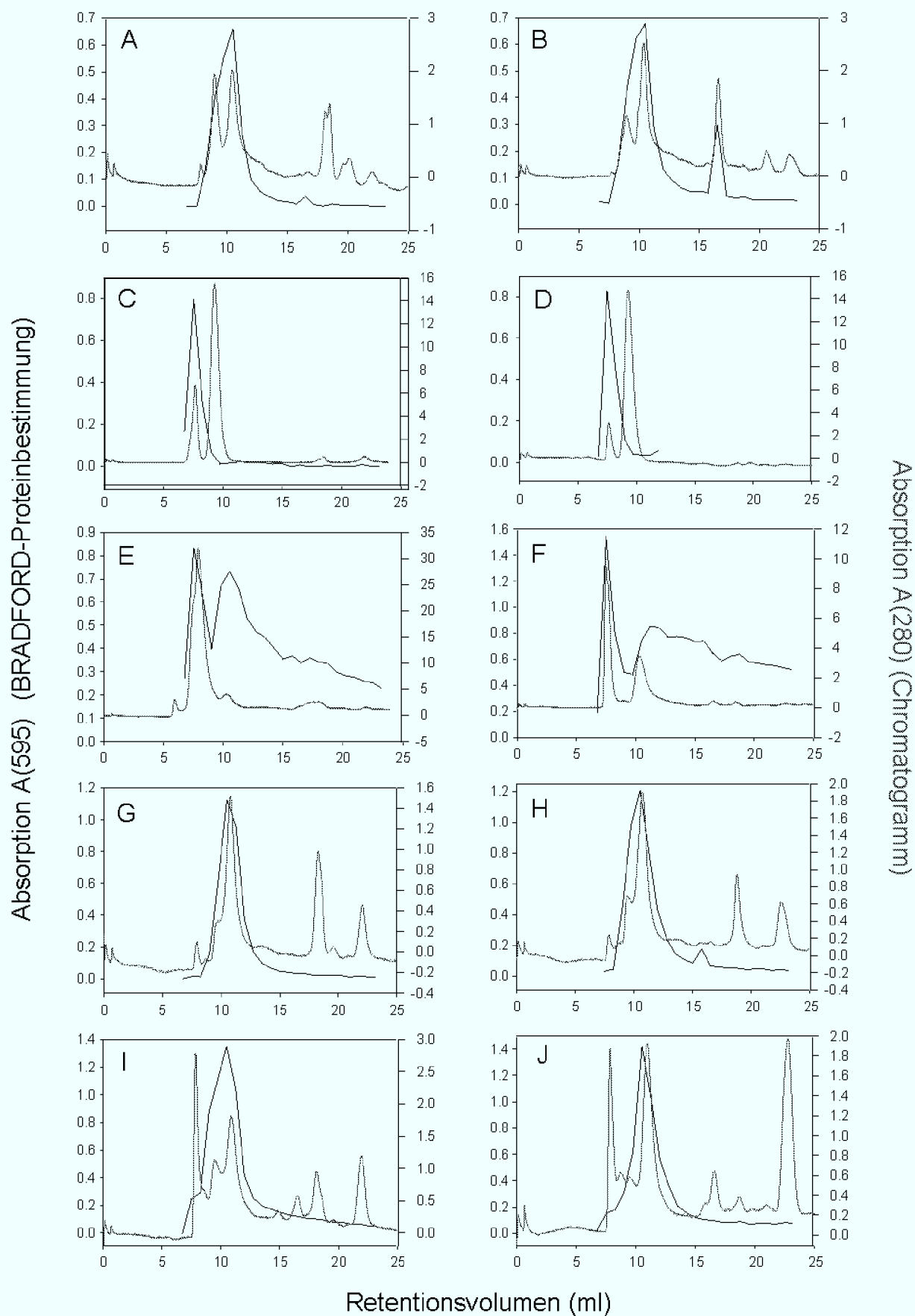


Abb. 3.24 (vorhergehende Seite): Chromatogramme und Profile der Proteinbestimmung von allen SEC-Messungen. In rot ist jeweils das Chromatogramm, in schwarz die Proteinbestimmung dargestellt. NOS-I WT in Ca^{2+} -Puffer (A) und in EGTA-Puffer (B), mmNOS-II WT in Ca^{2+} -Puffer (C) und in EGTA-Puffer (D), hhNOS-II WT in Ca^{2+} -Puffer (E) und in EGTA-Puffer (F), NOS-II 3K in Ca^{2+} -Puffer (G) und in EGTA-Puffer (H) und NOS-II E3K in Ca^{2+} -Puffer (I) und in EGTA-Puffer (J).

3.5 Zusammenfassung der Peptidstudien

Die Gelshiftexperimente hatten gezeigt, daß prinzipiell alle Peptide (mit Ausnahme der Mutante NOS-II K514E) an Ca^{2+} /CaM banden. Eine Bindung von ApoCaM war mit dieser Methode nicht zu detektieren. Das Fehlen einer Bindung an ApoCaM in Gelshiftexperimenten wurde für den NOS-II WT schon von MATSUBARA et al. (1997) beschrieben.

NOS-I-CaM-Bindungsstelle

In den ITC-Experimenten konnte mit den Peptiden NOS-I WT, NOS-I E736K, NOS-I VKF und NOS-I VKFM eine Ca^{2+} /CaM Bindung gezeigt werden. Dabei nahm die Affinität für Ca^{2+} /CaM in der oben beschriebenen Reihenfolge zu. Das Peptid NOS-I VFM zeigte in ITC-Studien keine Bindung an Ca^{2+} /CaM. Die apparente Affinität dieses Peptides lag in SPR-Studien im nanomolaren Bereich (12,8 nM). Große Abweichungen in den Messungen mit diesem Peptid (3.3.3) und Probleme mit der Immobilisierung (3.3.2.1) lassen aber vermuten, daß die Konformation dieses Peptides durch die dreifache Mutation leicht gestört war. Die SPR-Studien ergaben für die NOS-I-Peptide eine Zunahme der apparenten Dissoziationsratenkonstanten in folgender Reihenfolge: NOS-I WT > E736K > VKF > VKFM > VFM. Die Peptide NOS-I WT, E736K und VFM wiesen eine nanomolare apparente Affinität zu Ca^{2+} /CaM, bei den Peptiden VKF und VKFM lag die apparente Affinität im subnanomolaren Bereich.

Die Mutation von nur einer Position in der NOS-I WT-CaM-Bindungsstelle führte zur ApoCaM-Bindung. Während für das NOS-I WT-Peptid keine spezifische ApoCaM-Bindung gezeigt werden konnte, wies das Peptid NOS-I E736K schon eine mikromolare Affinität zu ApoCaM auf. Durch zusätzliche Mutationen (NOS-I VKF und NOS-I VKFM) wurde diese Affinität in den nanomolaren Bereich gesteigert. Mit beiden Meßmethoden ließ sich keine ApoCaM-Bindung von NOS-I VFM detektieren.

Mit den SPR-Studien konnte gezeigt werden, daß bei Messungen mit den NOS-I-Peptidmutanten ein höherer prozentualer Anteil an Resonanzsignal nach der Regenerationsphase bestehen blieb. Während das Signal bei dem Peptid NOS-I WT wieder fast auf den Ausgangswert zurück ging, blieb bei den Mutanten 8,9 bis 11,4 % des Signals

bestehen. Einzig für die Mutante NOS-I VFM kann darüber keine Aussage getroffen werden. Alle Daten wurden in Tab. 3.18 zusammengefaßt:

Tab. 3.18: Zusammenfassung der Daten für die NOS-I-Peptide.

Peptid	Ca²⁺/CaM-Affinität (ITC)	ApoCaM-Affinität (ITC)	Apparente Ca²⁺/CaM-Affinität (SPR)	relatives Resonanzsignal nach Ca²⁺-Komplexierung (ΔR_{Ur})
NOS-I WT	64,8 nM	/	8,6 nM	0,14 %
NOS-I E736K	54,9 nM	1,36 μ M	12 nM	9,1 %
NOS-I VKF	20 nM	356 nM	0,22 nM	8,9 %
NOS-I VKFM	4,4 nM	182 nM	0,54 nM	11,4 %
NOS-I VFM	/	/	12,8 nM	0 - 23 % ¹

Die genauen Daten finden sich in den Tabellen 3.1, 3.3, 3.10 und 3.11. (ITC : die Daten stammen aus den ITC-Studien; SPR : die Daten stammen aus den SPR-Studien).

NOS-II-CaM-Bindungsstelle

Es konnte in keiner der beiden Bindungsstudien eine Bindung von mmNOS-II WT an CaM beobachtet werden. Mit dem Peptid hhNOS-II WT wurde nur in SPR-Studien eine Bindung an CaM erreicht. Der Verdacht, daß beide Peptide Aggregate bilden, wurde durch Größenausschlußchromatographie bestätigt. Während das Peptid mmNOS-II WT vollständig aggregiert vorlag, eluierte das Peptid hhNOS-II WT z.T. in monomerer Form. Da für SPR-Experimente nur geringe Mengen an Peptid benötigt werden, reichte diese monomere Fraktion aus, um intakte hhNOS-II WT-Sensoroberflächen herzustellen. Für ITC-Studien, die eine wesentlich höhere Proteinkonzentration benötigen, reichte der Anteil an intaktem Peptid allerdings nicht aus, um spezifische Bindungssignale zu messen.

Das Peptid hhNOS-II WT zeigte in den SPR-Studien eine hochaffine Bindung an Ca²⁺/CaM mit einem apparenten K_D-Wert von 2 nM. Fünfzig Prozent des Resonanzsignals blieb auch nach der Komplexierung von Ca²⁺ bestehen. Auch die Bindung an ApoCaM schien hochaffin mit einer apparenten Dissoziationskonstante von 6,9 nM.

Die apparenten K_D-Werte der NOS-II-Mutanten für die Bindung an Ca²⁺/CaM lagen im nanomolaren Bereich und nahmen in folgender Reihenfolge zu: V511K < F517K < E3K < 3K. In der Reihenfolge V511K > E3K > 3K nahm der Wert für ΔR_{Ur} ab und erreichte für NOS-II F517K 0 %. Das Peptid NOS-II M521K ließ sich nicht für SPR-Studien immobilisieren.

In Abwesenheit von Ca^{2+} ergaben die SPR-Studien für keine der NOS-II-Mutanten eine ApoCaM-Bindung. ITC-Messungen mit den Peptiden zeigten aber sehr wohl eine ApoCaM-Bindung. Die Affinität zu ApoCaM lag im nanomolaren Bereich für die Einzelmутanten und im mikromolaren Bereich für die Dreifach- und Vierfachmutante. Die K_D -Werte nahmen in folgender Reihenfolge zu: M521K, F517K, V511K, E3K und 3K. Es konnten keine Ca^{2+} /CaM-Bindungen der NOS-II-Mutanten in ITC-Experimenten gemessen werden. Ein Aggregationsproblem kann zumindest für die Peptide NOS-II 3K und E3K ausgeschlossen werden.

Tab. 3.19: Zusammenfassung der Daten für die NOS-II-Peptide.

Peptid	Apparente Ca^{2+}/CaM-Affinität (SPR)	ApoCaM-Affinität (ITC)	relatives Resonanzsignal nach Ca^{2+}-Komplexierung ($\Delta\text{R}_{\text{Ur}}$)
hhNOS-II WT	nahezu irreversibel	nahezu irreversibel ¹	51,4 %
NOS-II M521K	/	67 nM	/
NOS-I F517K	0,24 nM	232,1 nM	0 %
NOS-I V511K	0,21 nM	927,6 nM	25 %
NOS-II E3K	2,6 nM	1,199 μM	5,9 %
NOS-II 3K	32 nM	1,66 μM	2,2 %

Die Affinitäten zu Ca^{2+} /CaM stammen aus SPR-Studien, die der Mutanten zu ApoCaM aus ITC-Messungen.

¹ Die Messung des NOS-II WT-Peptides in Abwesenheit von Ca^{2+} war nur in SPR-Messungen erfolgreich. Die genauen Daten finden sich in den Tabellen 3.5, 3.14 und 3.15.

Untersuchungen an heterolog exprimierter NOS-I und -II und ihren Mutanten

3.6 Herstellung von Mutanten der NOS-I und NOS-II

3.6.1 Sequenzierung der Wildtyp-cDNA von NOS-I und -II

Die NOS-I-cDNA wurde freundlicherweise von Frau Dr. Ulrike Zabel (AG Prof. Schmidt), Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Julius-Maximilian-Universität, Würzburg, zur Verfügung gestellt. Sie lag ursprünglich im Vektor pBlueskript vor. Die cDNA der NOS-II erhielten wir von Herrn Dr. Timothy R. Billiar, Department of Surgery, University of Pittsburgh, USA. Auch sie lag im Vektor pBluescript vor. Beide cDNAs wurden vor der Mutagenese auf Mutationen hin untersucht. Die Sequenzierung erfolgte wie unter 2.6 beschrieben mit einem LICor Sequencer. Die verwendeten fluoreszenzmarkierten Primer sind unter 2.6.3 aufgeführt.

Es wurden folgende Veränderungen gegenüber der Datenbanksequenz festgestellt:

Tab.: 3.20: Veränderungen der WT-Sequenzen gegenüber den Datenbanksequenzen.

	Position	Basenaustausch	AS-Austausch
NOS-I	1267 Bp	C→T	still: V=V
	2485 Bp	C→T	still: V=V
	4579 Bp	G→T	R ¹²⁷² →S
NOS-II	1473 Bp	A→C	I ⁴²³ →L
	1484 Bp	T→C	still: F=F
	2620 Bp	A→C	D ⁸⁰⁵ →A
	2698 Bp	C→T	S ⁸³¹ →F
	2701 Bp	C→T	P ⁸³² →L
	3003 Bp	G→C	G ⁹³³ →R
	3032 Bp	T→C	still: G=G
	3103 Bp	C→G	A ⁹⁶⁶ →G
	3166 Bp	T→C	V ⁹⁸⁷ →A
	3590 Bp	C→T	still: F=F
	3929 Bp	G→A	außerhalb des ORF

NOS-I GenBank accession number: L02881, NOS-II GenBank accession number: L09210. Die AS sind im Einbuchstabencode aufgeführt. Hochgestellt ist die Position in der AS-Sequenz angegeben. ORF = offener Leserahmen.

Die CaM-Bindungsstellen befinden sich in der NOS-I im Sequenzbereich 2873 bis 2962 Bp und in der NOS-II im Sequenzbereich 1731 bis 1808 Bp. Innerhalb dieser Sequenzbereiche fanden sich in beiden DNAs keine Mutationen. Die NOS-I-cDNA trug nur eine Mutation, die zu einem nicht konservativen Basenaustausch von Arginin¹²⁷² zu Serin führte. Dieser Austausch lag innerhalb der NADPH-Bindungsdomäne, aber außerhalb der NADPH-Bindungsstelle selbst (HEMMENS und MAYER, 1998). Die NOS-II-cDNA trug dagegen vier konservative Aminosäureaustausche und drei nicht konservative Austausche, wobei zwei zu einem Ladungsunterschied führten. Der erste Austausch (Position 423) lag in der Oxygenasedomäne, die anderen sechs waren in der FAD-Bindungsregion der Reduktasedomäne (HEMMENS und MAYER, 1998) lokalisiert.

3.6.2 Herstellung der NOS-Mutanten

Die Mutagenese erfolgte jeweils durch Herstellung eines Mutagenesevektors, in den die mutierte DNA-Sequenz eingesetzt wurde. Die genaue Mutagenesestrategie für NOS-I und NOS-II ist unter 2.7.10 und 2.7.11 dargestellt.

Die Aminosäuresequenzen der humanen NOS-I und der NOS-I aus der Ratte sind innerhalb der CaM-Bindungsstelle identisch. Die Sequenzen der NOS-II aus Mausmakrophagen und der humanen hepatischen NOS-II zeigen in diesem Bereich allerdings nur 70 % Homologie. Sie unterscheiden sich z.B. in der Position 9 des CaM-Bindungsmotives. Die humane NOS-II trägt an dieser Position ein Leucin, während man in der NOS-II aus Mausmakrophagen ein Phenylalanin findet. Damit eine einheitliche Bezeichnung zwischen Peptidstudien und Enzymstudien bestand, wurden die Mutanten nach den Peptidmutationen und damit nach der Sequenz aus den Mausmakrophagen benannt. Die hergestellten Mutanten, deren Namen und die jeweiligen Mutationen können Tab. 3.21 entnommen werden.

Die Mutanten wurden jeweils komplett sequenziert, um den Erfolg der Mutagenese zu überprüfen und ungewollte Mutationen auszuschließen. In keiner DNA wurde eine zusätzliche Mutation im Vergleich zum Wildtyp außer den gewünschten festgestellt.

Tab. 3.21: Mutanten der humanen NOS-I und der humanen hepatischen NOS-II. Die Namen der Mutanten beziehen sich auf die entsprechenden Peptide.

Name der Mutante	AS und deren Position im jeweiligen Wildtyp	eingeführte AS
NOS-I K737V	Lysin ⁷³⁷	Valin
NOS-I VFM	Lysin ⁷³⁷ , Lysin ⁷⁴³ , Lysin ⁷⁴⁷	Valin, Leucin, Methionin
NOS-I VKF	Lysin ⁷³⁷ , Glutamat ⁷⁴⁰ , Lysin ⁷⁴³	Valin, Lysin, Leucin
NOS-I VKFM	Lysin ⁷³⁷ , Glutamat ⁷⁴⁰ , Lysin ⁷⁴³ , Lysin ⁷⁴⁷	Valin, Lysin, Leucin, Methionin
NOS-II 3K	Valin ⁵¹⁷ , Leucin ⁵²³ , Methionin ⁵²⁷	Lysin, Lysin, Lysin
NOS-II E3K	Valin ⁵¹⁷ , Lysin ⁵²⁰ , Leucin ⁵²³ , Methionin ⁵²⁷	Lysin, Glutamat, Lysin, Lysin

3.7 Heterologe Expression der NO-Synthasen

Um NO-Synthasen heterolog in HEK 293-Zellen zu exprimieren (2.8.1), wurde die DNA in *E. coli* Kulturen vermehrt und mit der LiCl-Methode gereinigt (2.5). Ziel dieser Reinigungsmethode ist es, möglichst viel superhelikale Plasmid-DNA zur Transfektion zu erhalten. Sowohl der Anteil an superhelikaler DNA an der DNA-Gesamtmenge, wie auch die Qualität der DNA fallen unterschiedlich aus. Neben den konstanten Faktoren (pH-Wert, CaCl₂-Konzentration, Zelldichte) spielen Qualität und Quantität der DNA eine große Rolle für den Erfolg der Transfektion. Daher wurde für jede neue DNA-Präparation die optimale DNA-Menge zur Transfektion auf 5 cm Schalen bestimmt. Hierzu wurden mehrere Schalen mit unterschiedlichen DNA-Mengen transfiziert und das Expressionsoptimum mittels immunologischem Nachweis der NOS (2.8.6) ermittelt.

3.7.1 Transfektionseffizienz

Die Transfektionseffizienz wurde durch Zellfärbung in Wells (2.8.3) ermittelt. Hierzu wurden die fixierten Zellen immuncytochemisch (2.8.3.1) oder über ihre Diaphoraseaktivität (2.8.3.2) gefärbt und der prozentuale Anteil an gefärbten Zellen ermittelt. Eine Colokalisation beider Färbemethoden konnte schon bei TWELKER (1998) für NOS-I gezeigt werden und wurde für NOS-II bestätigt.

Tab. 3.22: Transfektionseffizienz der einzelnen Enzyme.

Enzym	Transfektionseffizienz	
	Immuncytochemie	Diaphorasefärbung
NOS-I WT	50-60 %	50-60 %
NOS-I VKF	50-60 %	40-50 %
NOS-I VFM	70-80 %	50-60 %
NOS-I VKFM	80-90 %	60-70 %
NOS-I V737K	20-30 %	10-20 %
NOS-II WT	20-30 %	10-20 %
NOS-II 3K	20-30 %	0-10 %
NOS-II E3K	10-20 %	0-10 %

Die Effizienz wurde mit zwei Zellfärbemethoden ermittelt: Immuncytochemie und Diaphorasefärbung. Es wurden die Effizienzen verschiedener DNA-Präparationen zusammengefaßt.

In Tab. 3.22 sind die durchschnittlichen Transfektionseffizienzen der einzelnen Enzyme aufgeführt. Sie entsprechen der mittleren Effizienz aus verschiedenen DNA-Präparationen. Hierbei fällt auf, daß die Effizienz bei der Bestimmung mittels Diaphorasefärbung immer etwas niedriger lag als der durch Immuncytochemie ermittelte Wert. Auffällig war auch, daß mit der Diaphorasefärbung nur die stark vergrößerten Zellen mit sehr langen Streßfasern angefärbt wurden (Abb. 3.25), während die kleineren Zellen nicht deutlich von der Hintergrundfärbung zu unterscheiden waren. Dies deutet darauf hin, daß die immuncytochemische Färbung sensitiver ist und auch Zellen mit geringer Expression detektiert werden, während die Diaphorasefärbung nur Zellen mit starker enzymatischer Aktivität erfaßt.

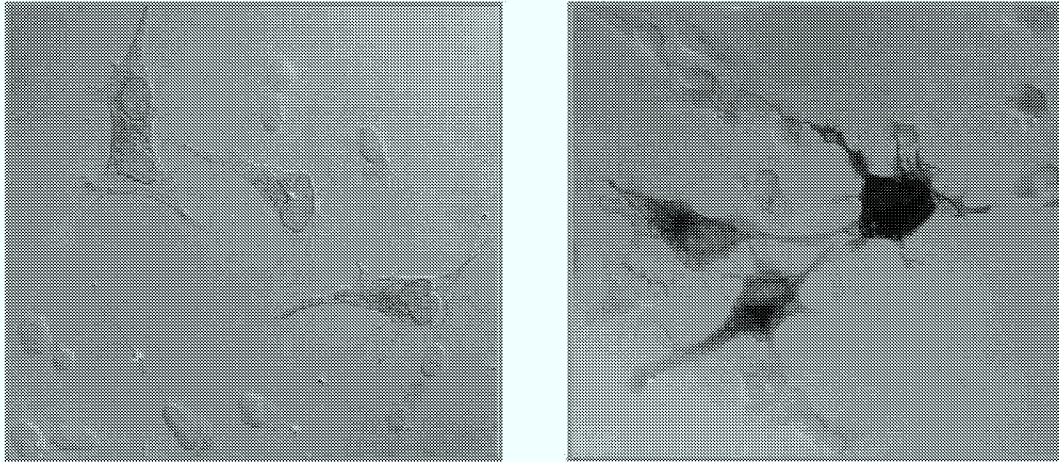


Abb. 3.25: Links: Färbung von NOS-I WT-transfizierten HEK-293-Zellen mittels Immunocytochemie. Es wurde der AK α NOS-Ip in 10-facher Verdünnung verwendet. Rechts: Färbung von NOS-I WT-transfizierten HEK-293-Zellen mittels Diaphoraseaktivität. Da hier die Hintergrundfärbung stärker ist als bei der Immunocytochemie, lassen sich nur die großen, dunkelgefärbten Zellen als NOS-I-positiv bezeichnen.

3.7.2 Zelllyse

Die Zelllyse mittels Ultraschall (2-3 x 10 sec) (2.8.4) war ein Mittelweg zwischen effizienter Lyse und Erhalt der Enzymaktivität. Die NO-Synthasen sind extrem empfindlich gegenüber Einfrieren und Auftauen. Sie verlieren im allgemeinen innerhalb eines Zyklus von Einfrieren und Auftauen einen Großteil ihrer Aktivität (eigene Beobachtung). Daher war eine Zelllyse auf diesem Wege nicht möglich. Auch durch Ultraschallbehandlung ging ein Teil der Enzymaktivität verloren. Daher wurde die Dauer der Ultraschallpulse auf 10 sec beschränkt und Eiswasser im Ultraschallbad verwendet. Auf diese Weise erfolgte die Lyse nicht vollständig und es blieb immer ein Anteil von ca. 40-50 % der NOS nach der Zentrifugation im Pellet zurück. Dafür blieb aber die Enzymaktivität erhalten.

Die hohe Labilität der NOS ermöglichte nur eine sofortige Verwendung der Zelllysate für Aktivitätsstudien. Für die Gelelektrophorese wurden auch eingefrorene Zelllysate verwendet.

3.7.3 „Größenanomalie“ der Mutanten NOS-I VKF und NOS-I K737V

Die Expression aller Mutanten und der Wildtypenzyme wurde für jede Transfektion im Westernblot (2.8.6) überprüft. Die NOS-II WT und ihre beiden Mutanten (Abb. 3.26, rechts) ließen sich jeweils bei einer Größe von ungefähr 130 kDa nachweisen. Dies entspricht dem errechneten Molekulargewicht. Es zeigte sich häufig eine zusätzliche Bande bei 60 kDa. Eventuell handelte es sich hierbei um ein Abbauprodukt der NOS-II. Ganz schwach waren gelegentlich noch höhere Banden auszumachen, die von Dimeren herrühren könnten.

NOS-I WT, NOS-I VFM und NOS-I VKFM liefen bei einer apparenten Größe von 160 kDa, was dem Molekulargewicht der NOS-I entspricht (Abb. 3.26, links). Bei NOS-I VFM und NOS-I VKFM fand man kurz oberhalb der Hauptbande eine zweite, schwächere Bande bei ca. 170 kDa und außerdem eine Bande direkt unterhalb der Slots. Bei der obersten Bande könnte es sich um Aggregate handeln. Die Hauptbande der NOS-I VKF fand man bei ca. 180 bis 190 kDa. Eine wesentlich schwächere Bande war meist bei 160 kDa zu sehen. Der Größenunterschied von ca. 20 bis 30 kDa läßt die Vermutung zu, daß die NOS-I VKF CaM gebunden hatte. Bemerkenswert ist, daß diese Bande bei 180 bis 190 kDa bei keiner anderen exprimierten NOS-I zu sehen war.

Die Hauptbande der NOS-I K737V lief oberhalb von 212 kDa. Da es sich um Gradientengele von 3,5-7,5 % handelte, war die Größe dieser Bande oberhalb des HMW-Markers schwer zu bestimmen. Diese Bande trat auch bei allen anderen exprimierten NOS-I ganz schwach auf. Daher könnte es sich hierbei um Dimere handeln, die bei allen Formen auftreten, aber bei der Mutante NOS-I K737V auch im SDS-Gel unter denaturierenden Bedingungen stabil blieben.

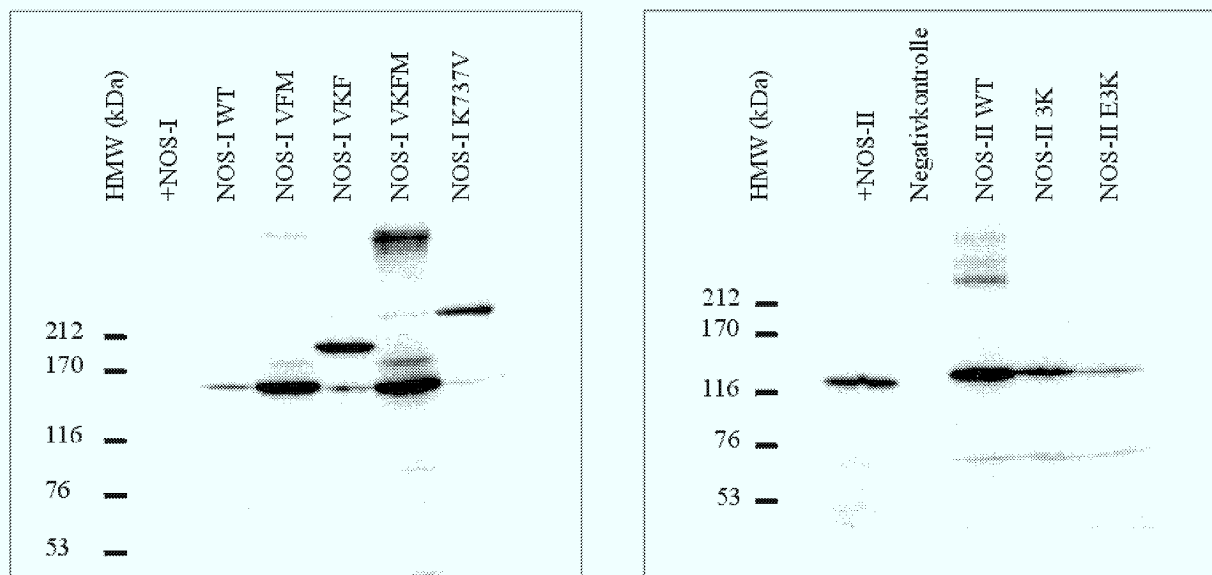


Abb. 3.26: Nachweis der NOS in Zelllysaten. Die Proteine wurden über ein 3,5-7,5 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und die NOS mit den Antikörpern α NOS-Ip und α NOS-IIp detektiert. Die aufgetragene Gesamtproteinmenge betrug jeweils 20 μ g. Als Positivkontrolle wurde kommerziell erhältliche NOS-I (+NOS-I; Sigma, 400ng) und NOS-II (+NOS-II; Alexis, 11,2 μ g) verwendet. Im Gel ließ sich erkennen, daß die Positivkontrollen schon stark degradiert waren. Das erklärt auch, warum sich für die Kontrolle +NOS-I kein Signal im Blot ergab.

Für die Mutanten NOS-I VKF und NOS-I K737V wurde untersucht, ob die Anomalie im Laufverhalten auf eine Bindung von CaM während der Elektrophorese zurückzuführen ist. Eine Auftrennung von Enzym und CaM ermöglichen Gele mit einem 7,5-15 %-igen

Gradienten. Diese Gele wurden nach der Elektrophorese geblottet und die Membranen nacheinander mit NOS-I und CaM-Antikörper inkubiert. Während der NOS-I-Antikörper positive Signale ergab, konnte mit dem CaM-Antikörper kein Calmodulin detektiert werden. Es ist möglich, daß die jeweilige NOS-I das CaM „maskiert“ und somit für den Antikörper unzugänglich gemacht hat. Daher wurden verschiedene Versuche durchgeführt, um eine bessere Denaturierung der Proben zu erreichen. Aber auch nach Denaturierung mit 5 % SDS in Gel und Puffern oder mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid konnte kein CaM nachgewiesen werden. Bei den Versuchen mit Guanidiniumhydrochlorid war der Proteinverlust insgesamt zu groß. Es bleibt daher weiterhin ungeklärt, warum die beiden Mutanten NOS-I VKF und NOS-I K737V bei einem höheren apparenten Molekulargewicht nachgewiesen wurden, als zu erwarten war.

3.8 Aktivitätsstudien mit heterolog exprimierten NO-Synthasen

Die Aktivität der exprimierten Enzyme wurde mit zwei verschiedenen Assays nachgewiesen. NO ist ein sehr reaktives und kurzlebiges Gas. Man behilft sich oft damit, entweder Nebenprodukte der NO-Produktion oder aber Reaktionsprodukte von NO nachzuweisen.

Der Tritiumassay (2.9.1) weist markiertes L-Citrullin nach. L-Citrullin entsteht in stöchiometrischen Mengen neben NO aus L-Arginin. Der Griessassay (2.9.2) dagegen weist die NO-Reaktionsprodukte Nitrit und Nitrat nach. Hierbei wird das Nitrat vollständig zu Nitrit reduziert und das Nitrit mittels einer Farbreaktion nachgewiesen.

Um die spezifische Enzymaktivität zu ermitteln, muß die Menge an eingesetztem Enzym bekannt sein. Setzt man Zellysate ein, die eine Vielzahl von verschiedenen Proteinen enthalten, muß der Anteil des Enzyms an der Gesamtproteinmenge bestimmt werden, um die spezifische Aktivität des Enzyms berechnen zu können.

3.8.1 Quantifizierung der NOS

Um die spezifische Aktivität der Enzyme zu bestimmen, mußte die Menge an exprimierter NOS im Zellextrakt bestimmt werden. Die Menge an NO-Synthase sollte über coomassiegefärbte Gele (2.8.6.2) ermittelt werden. Es wurden jeweils zwei identische Gele hergestellt. Eines davon wurde geblottet, das andere direkt mit Coomassie-Blau gefärbt. Da die NOS mit 160 bzw. 130 kDa in einem Bereich des Gels läuft, der sehr viele Banden enthält, mußte jeweils ein Gradient gefunden werden, der eine bessere Auftrennung in diesem Molekulargewichtsbereich ermöglicht. Für die NOS-I erwies sich ein Gradient von 4-6 % Polyacrylamid mit einem 3,5 % Sammelgel als optimal. Die Elektrophorese wurde gestoppt, sobald der Blaumarker aus dem Gel ausgelaufen war. Die NOS-I Banden wurden anhand des

Westernblots identifiziert. Das coomassiegefärbte Gel wurde mit dem Kodak Imager aufgezeichnet. Das Programm Kodak 1D ermöglichte es, die Intensitäten einzelner Banden zu ermitteln. Es wurden die Intensitäten aller Banden einer Spur ermittelt und summiert. So ergab sich die Gesamtintensität aller Proteine, die proportional zur aufgetragenen Proteinmenge sein sollte. Die Gesamtintensität wurde gleich 100 % gesetzt und die Intensität der NOS-I Bande dazu ins Verhältnis gesetzt. So erhielt man den prozentualen Anteil der NOS-I am Gesamtprotein und konnte über die aufgetragene Proteinmenge die Menge an NOS-I berechnen. Die Auswertung ist am Beispiel eines Gels mit allen NOS-I Mutanten gezeigt (Abb.3.27). Das Ergebnis ist in Tabelle 3.23 aufgeführt.

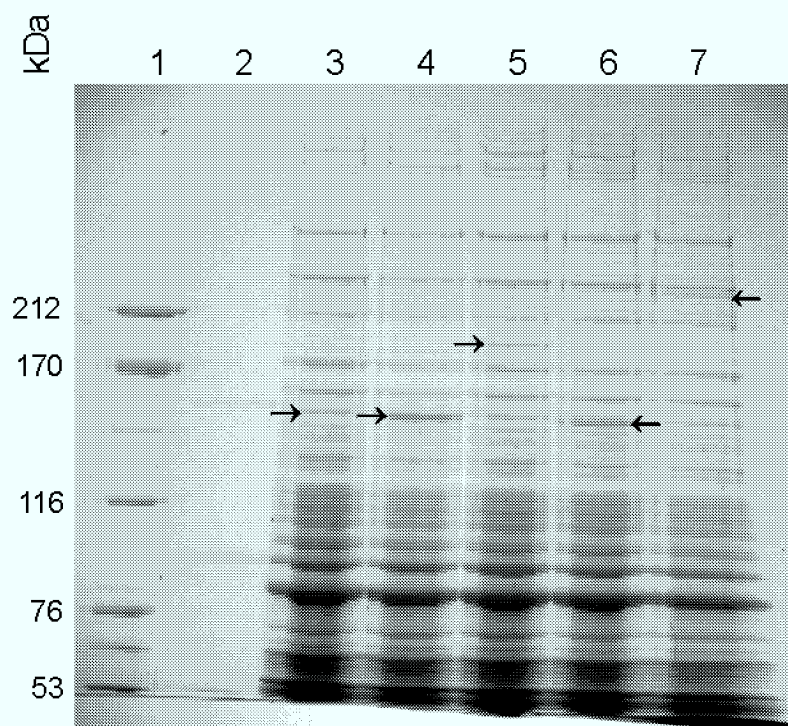


Abb. 3.27: Kodak Image eines coomassiegefärbten Gels (Gradient 4-6 %) mit allen NOS-I Mutanten. Spur 1: HMW-Standard, Spur 2: NOS-I Positivkontrolle, Spur 3: NOS-I WT, Spur 4: NOS-I VFM, Spur 5: NOS-I VKF, Spur 6: NOS-I VKFM, Spur 7: NOS-I K737V. Die Pfeile markieren die jeweilige NOS-Bande, die über einen Westernblot identifiziert wurde.

Aufgrund von Problemen in der Zellkultur konnte für die NOS-I nur einmalig eine solche genaue Mengenbestimmung durchgeführt werden.

Für die NOS-II war das Gradientengel von 4-6 % nicht optimal. Die NOS-II Bande ließ sich in diesem Gradienten nicht separat quantifizieren. Aber auch hiermit konnten aufgrund der Probleme in der Zellkultur keine weiteren Experimente durchgeführt werden.

Tab. 3.23: Auswertung des coomassiegefärbten Gels aus Abb. 3.27.

Enzym	NOS-I WT	NOS-I VFM	NOS-I VKF	NOS-I VKFM	NOS-I K737V
Gesamtintensität aller Banden (Pixel)	2,139 e ⁷	2,127 e ⁷	2,368 e ⁷	2,243 e ⁷	2,243 e ⁷
Gesamtproteinmenge (mg/ml)	2,15	2,0	2,2	1,9	2,13
Intensität der NOS-Bande (Pixel)	3,911 e ⁵	6,115 e ⁵	4,333 e ⁵	6,198 e ⁵	2,922 e ⁵
Prozentualer Anteil der NOS-Bande	1,83 %	2,87 %	1,83 %	2,76 %	1,31 %
NOS-Menge (µg/ml)	39,3	57,4	40,3	52,4	27,9

Die Intensitäten der Banden wurden mit dem Program Kodak 1D™ ermittelt. Die Proteinmenge wurde mittels BRADFORD-Proteinbestimmung (2.8.5) bestimmt. Die NOS-Banden wurden über NOS-I Antikörperfärbung eines Westernblots identifiziert.

3.8.2 Griessassay

Der Griessassay setzt sich aus drei Teilschritten zusammen. Zunächst erfolgt eine Inkubation des Zelllysates in zwei verschiedenen Puffern (Ca²⁺-Inkubationspuffer und EGTA-Inkubationspuffer, siehe 2.9.2) für 60 oder 120 min. Der zweite Teilschritt besteht aus der vollständigen Reduktion des Nitrats zu Nitrit. Im dritten Schritt wird dann das Nitrit colorimetrisch durch die Griess-Reaktion nachgewiesen.

3.8.2.1 Allgemeiner Vergleich der Aktivitäten in den Zelllysaten

Da nur für eine Messung (hier mit erster Messung bezeichnet) eine Quantifizierung der Enzymmenge im Zelllysate vorlag, und das auch nur für die NOS-I und ihre Mutanten, wurden die Enzymaktivitäten zunächst als Aktivität pro Milligramm Gesamtprotein ausgewertet. Durch die immunocytochemischen Färbungen konnte gezeigt werden, daß die Expression für jedes Enzym recht konstant war. Daher kann man davon ausgehen, daß sich vergleichbare Mengen von NOS in den Zelllysaten befanden. Allerdings handelt es sich bei dieser Auswertung nicht um die spezifische Enzymaktivität der einzelnen Mutanten.

Aktivität in Anwesenheit von Ca^{2+}

Die Inkubation erfolgte nach ABU-SOUD und STUEHR (1993) zunächst für 120 min. Sie wurde später auf 60 min verkürzt. Die Messungen unterschieden sich sehr stark in ihrer Grundaktivität (Tab. 3.24). Während die erste Messung insgesamt nur eine geringe Aktivität zeigte, wiesen die folgenden zwei Messungen höhere Aktivitäten auf. Jede Messung wurde als Doppelansatz angesetzt, der Meßwert wurde gemittelt und der gemittelte Wert von der Eichgerade abgelesen. In Abb. 3.28 sind die Einzelmessungen in Ca^{2+} -Puffer dargestellt.

Um die Grundtendenz der Aktivitäten zwischen den einzelnen Mutanten deutlich zu machen, wurde das Verhältnis zwischen der Aktivität des Wildtyps und der Aktivität seiner Mutanten berechnet. In der Tabelle 3.24 ist dieser Wert als „Faktor“ angegeben. Aus allen drei Messungen wurde für diesen Wert ein Mittelwert gebildet, um die einzelnen Mutanten miteinander vergleichen zu können.

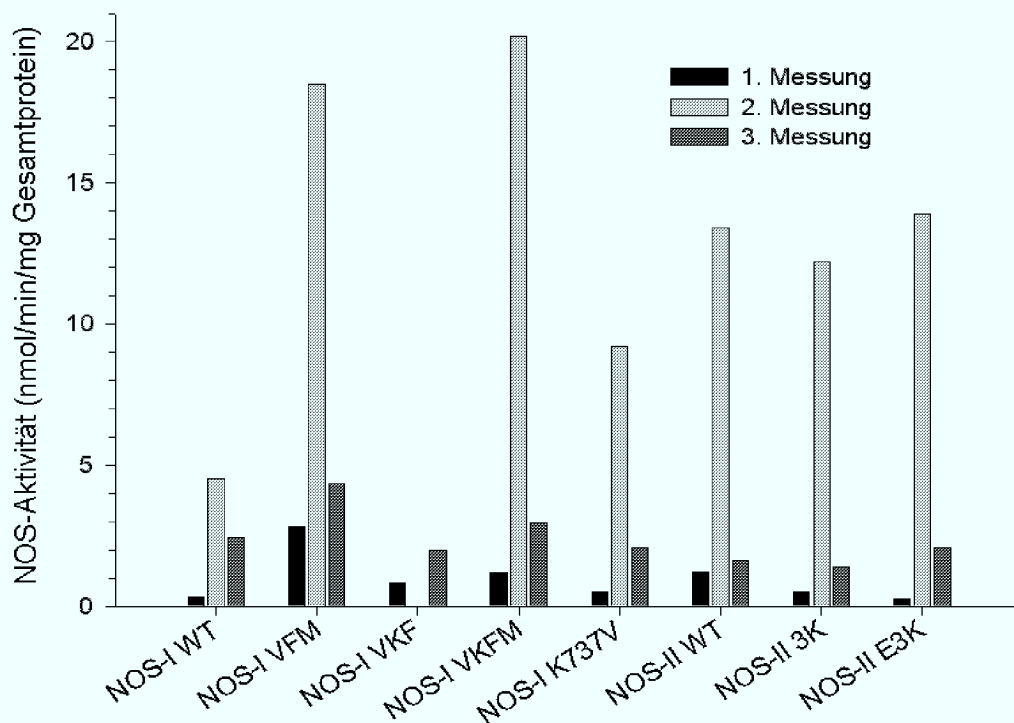


Abb. 3.28: Graphische Darstellung der NOS-Aktivitäten in Ca^{2+} -Puffer. Es sind alle drei Einzelmessungen (schwarzer, grauer und dunkelgrauer Balken) dargestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Aktivitäten konnte kein Mittelwert aus den Messungen gebildet werden. Daher wurde der Aktivitätsunterschied als „Faktor“ zwischen Wildtyp und Mutante ausgedrückt und dieser gemittelt (Tab. 3.24).

Tab. 3.24: Aktivitäten (Akt., in nmol/min/mg Gesamtprotein) der exprimierten Enzyme in Ca^{2+} -Puffer.

Enzym	1. Messung		2. Messung		3. Messung		Mittelwert	Std.
	Akt.	Faktor	Akt.	Faktor	Akt.	Faktor	Faktor	Faktor
NOS-I WT	0,34	1	4,5	1	2,43	1	/	/
NOS-I VFM	2,81	8,3	18,5	4,1	4,36	1,79	4,73	2,69
NOS-I VKF	0,81	2,38	0	0	1,99	0,82	1,07	0,99
NOS-I VKFM	1,19	3,5	20,2	4,5	2,95	1,2	3,07	1,38
NOS-I K737V	0,51	1,5	9,2	2	2,07	0,85	1,45	0,47
NOS-II WT	1,23	1	13,4	1	1,63	1	/	/
NOS-II 3K	0,5	0,41	12,2	0,9	1,37	0,84	0,72	0,22
NOS-II E3K	0,27	0,22	13,9	1,04	2,07	1,27	0,84	0,45

Die Inkubationszeit betrug bei der ersten Messung 120 min, bei der zweiten und dritten Messungen 60 min. Es wurde pro Messung der Faktor berechnet, um den die Aktivität der Mutante höher bzw. niedriger lag, als die des Wildtyps. Dieser Faktor wurde anschließend über alle drei Messungen gemittelt und die Standardabweichung (Std.) vom Mittelwert berechnet.

Es zeigte sich, daß die Mutationen VKFM und VFM zu einer deutlichen Steigerung der NOS-I Aktivität führten, während die Mutanten VKF und K737V nur eine leicht erhöhte Aktivität zeigten. Die beiden NOS-II-Mutanten wiesen eine leicht verminderte Aktivität im Bezug auf den NOS-II WT auf.

Aktivität in Abwesenheit von Ca^{2+}

Um die Ca^{2+} -Abhängigkeit der beiden Wildtypenzyme zu überprüfen, wurde eine Meßreihe mit NOS-I WT und NOS-II WT in Ca^{2+} - und EGTA-Puffer durchgeführt. Die Meßdaten sind in Tabelle 3.25 aufgeführt.

Die Enzymaktivität der NOS-I WT wurde in EGTA-Puffer auf 3,7 % reduziert. Dieser Wert lag an der Grenze dessen, was sich mit dem Assay detektieren ließ. Die Restaktivität der NOS-II WT in Abwesenheit von Ca^{2+} betrug 32 %. Beide Werte unterscheiden sich signifikant von der Enzymaktivität des jeweiligen Wildtyps in Anwesenheit von Ca^{2+} .

Tab. 3.25: Vergleich der NOS-I WT- und NOS-II WT-Aktivitäten in Ca^{2+} - und in EGTA-Puffer.

	NOS-I WT		NOS-II WT	
	Ca^{2+} -Puffer	EGTA-Puffer	Ca^{2+} -Puffer	EGTA-Puffer
NOS-Aktivität (nmol/min/mg Gesamtprotein)	1,5	0,077	1,13	0,3
	1,67	0,035	1,23	0,35
	1,08	0,044	0,83	0,38
Mittelwert	1,42	0,052	1,06	0,34
Std.	0,25	0,02	0,17	0,03
Irrtumswahrscheinlichkeit p	/	0,016	/	0,023
NOS-Aktivität (%)	100 %	3,7 %	100 %	32,1 %

Es handelte sich jeweils um drei unabhängige Transfektionen pro Enzym. Aus allen drei Messungen wurde ein Mittelwert gebildet (Std. = Standardabweichung vom Mittelwert). Die Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde mit einem heteroskedastischen Student'schen t-Test in Bezug auf den jeweiligen Wildtyp ermittelt. Die Enzymaktivität in Ca^{2+} -Puffer wurde gleich 100 % gesetzt und im Vergleich dazu die Restaktivität in EGTA-Puffer berechnet.

Für die Mutanten der NOS-I ergab die erste und zweite Messung mit EGTA-Inkubationspuffer sehr unterschiedliche Ergebnisse (siehe Tab. 3.24). Während in der ersten Messung die Enzyme NOS-IVFM und VKF eine Restaktivität in EGTA-Puffer von ca. 20 % und das Enzym VKFM sogar eine Aktivität von 38 % zeigten, ergab die zweite Messung in allen drei Fällen keine Aktivität in Abwesenheit von Ca^{2+} . Die Mutante NOS-I K737V wies in der ersten Messung sogar eine um 12 % höhere Enzymaktivität in EGTA- als in Ca^{2+} -Puffer auf. In der zweiten Messung dagegen betrug die Restaktivität in EGTA-Puffer nur noch 12 % der Aktivität in Ca^{2+} -Puffer. Die Aktivität aller Enzyme lag auch in Ca^{2+} -Puffer in der ersten Messung wesentlich niedriger als in der zweiten (Tab. 3.24). Die Meßwerte der ersten Messung in EGTA-Puffer hoben sich daher kaum vom Hintergrundrauschen ab. Für NOS-I VKF ergab die zweite Messung auch in Anwesenheit von Ca^{2+} keine Aktivität.

Tab. 3.26: Aktivität der NOS-I-Mutanten in EGTA-Puffer.

NOS-I-Mutante	Restaktivität in EGTA-Puffer	
	1. Messung	2. Messung
NOS-I VFM	20 %	0 %
NOS-I VKF	21,1 %	(keine Aktivität mit Ca^{2+})
NOS-I VKFM	38 %	0 %
NOS-I K737V	112,2 %	12,3 %

Die Aktivität wurde in Prozent ausgedrückt. Als 100 % Aktivität wurde die jeweilige Aktivität in Ca^{2+} -Puffer gesetzt.

Auch für die NOS-II-Mutanten gilt wie für die NOS-I-Mutanten, daß die Aktivität in Anwesenheit von Ca^{2+} in der ersten Messung sehr niedrig lag. Damit lagen auch hier die Meßwerte der ersten Messung in Abwesenheit von Ca^{2+} fast im Hintergrundrauschen der Methode. Beide Messungen ergaben für die Mutante NOS-II 3K eine Aktivität in EGTA-Puffer von 20-34 % (bezogen auf die Aktivität in Anwesenheit von Ca^{2+}) (Tab. 3.27). Dies entspricht ungefähr dem Wert für den NOS-II WT von 32 %. Für die Mutante NOS-II E3K widersprechen sich beide Messungen. Die erste Messung ergab eine Aktivität von 31 % in EGTA-Puffer, was ungefähr dem NOS-II WT entspräche. Die zweite Messung ergab keine Aktivität in Abwesenheit von Ca^{2+} für diese Mutante.

Tab. 3.26: Aktivität der NOS-II-Mutanten in EGTA-Puffer.

NOS-II-Mutante	Restaktivität in EGTA-Puffer	
	1. Messung	2. Messung
NOS-II 3K	34 %	20,2 %
NOS-II E3K	31 %	0 %

Die Aktivität wurde in Prozent ausgedrückt. Als 100 % Aktivität wurde die jeweilige Aktivität in Ca^{2+} -Puffer gesetzt.

Für alle Aktivitäten in EGTA-Puffer gilt aber, daß anhand der beiden durchgeführten Messungen noch keine gesicherte Aussage über die Abhängigkeit der Enzymaktivität von Ca^{2+} gemacht werden kann.

3.8.2.2 Spezifische Aktivität der NOS-I und ihrer Mutanten

Bezieht man die Aktivität der NOS-I-Enzyme aus der ersten Messung (Tab. 3.24) auf die für diese Messung eingesetzte Enzymmenge im Zelllysats (3.8.1), so ergeben sich folgende spezifisch Enzymaktivitäten:

Tab. 3.28: Spezifische NOS-Aktivität.

Enzym	Aktivität (nmol/min/mg Gesamtprotein)	prozentualer Anteil der NOS im Zelllysats	NOS-Menge (µg/ml)	spezifische NOS- Aktivität (nmol/min/mg NOS)
NOS-I WT	0,34	1,83 %	39,3	18,5
NOS-I VFM	2,81	2,87 %	57,4	98,8
NOS-I VKF	0,81	1,83 %	40,3	44,4
NOS-I VKFM	1,19	2,76 %	52,4	43,3
NOS-I K737V	0,51	1,31 %	27,9	38,6

In Spalte zwei ist die Aktivität bezogen auf die Gesamtproteinmenge angegeben. In den Spalten drei und vier sind der prozentuale Anteil der NOS an der Gesamtproteinmenge und die sich daraus ergebende Konzentration an NOS angegeben (3.8.1). Spalte fünf gibt die spezifische Enzymaktivität an.

Vergleicht man die spezifische Aktivität mit der Aktivität bezogen auf die Gesamtproteinmenge (Tab. 3.24), so gleicht sich der Aktivitätsunterschied zwischen den Mutanten NOS-I VKF, VKFM und K737V an. Die Mutante NOS-I VFM dagegen hat weiterhin eine wesentlich höhere Aktivität als die anderen NOS-I-Enzyme. Alle Mutanten weisen eine höhere spezifische Aktivität auf als der Wildtyp.

3.8.3 Tritiumassay

Es wurden Messungen mit den Enzymen NOS-I WT, NOS-I VKFM, NOS-I K737V, NOS-II WT und NOS-II E3K in Anwesenheit von Ca^{2+} und in Gegenwart von Inhibitor (L-NNA bzw. S-ETU) durchgeführt. Außerdem wurde die Aktivität von NOS-I WT, NOS-II WT und NOS-II E3K in Gegenwart von EGTA überprüft. Messungen mit den restlichen Mutanten konnten aus Mangel an exprimiertem Enzym nicht mehr durchgeführt werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.29 zusammengefaßt.

Mit 710 pmol/min/mg Gesamtprotein wies die NOS-I WT die höchste Enzymaktivität auf. In Abwesenheit von Ca^{2+} wurde keine Restaktivität detektiert. Die Mutanten NOS-I VKFM und NOS-I K737V waren ungefähr gleich aktiv und erreichten ca. 20 % der NOS-I WT Aktivität. Die drei NOS-I Enzyme ließen sich unterschiedlich gut mit L-NNA inhibieren. Während die

NOS-I WT mit 10 μM L-NNA vollständig inhibiert werden konnte, blieben bei NOS-I VKFM 17 % und bei NOS-I K737V 5 % Restaktivität übrig.

Tab. 3.29: NOS-Aktivitäten gemessen mit dem Tritiumassay.

Enzym	Ca^{2+} (240 μM) (pmol/min/mg) *	EGTA (1 mM)	L-NNA (10 μM)	Anzahl der Messungen
NOS-I WT	710	0	0	15
NOS-I VKFM	147	/	17 %	1
NOS-I K737V	146	/	5 %	2
NOS-II WT	199	60 %	55 % **	2
NOS-II E3K	23	30-60 %	0	2

* Die Aktivitäten beziehen sich auf die Gesamtproteinmenge im Zelllysate. Die Werte wurden entsprechend der Zähleffizienz korrigiert. Für die Messungen in Anwesenheit von EGTA bzw. L-NNA wurde die prozentuale Aktivität in Bezug auf die Ca^{2+} -Messung errechnet. ** Hier ließ sich nur mit dem Inhibitor S-ETU (10 μM) eine vollständige Inhibition bewirken.

Für NOS-II WT ergab sich eine Enzymaktivität von 199 pmol/min/mg Gesamtprotein. In Anwesenheit von EGTA wurde diese Aktivität nur um 40 % vermindert. Eine Inhibierung mit L-NNA war auch in höheren Konzentrationen nicht möglich. Der Inhibitor S-ETU dagegen erreichte eine 100 %-ige Inhibierung bei einer Konzentration von 10 μM . Die NOS-II-Mutante E3K war mit 23 pmol/min/mg Gesamtprotein kaum aktiv. Sie zeigte in Abwesenheit von Ca^{2+} noch eine Restaktivität, die aber nur schwierig zu quantifizieren war, da die Messungen hier schon im Bereich der Detektionsgrenze des Assays lagen.

3.8.4 Zusammenfassung der Aktivitätsstudien

Alle exprimierten Enzyme waren in Anwesenheit von Ca^{2+} aktiv. Wie zu erwarten war, zeigte das Enzym NOS-I WT in Abwesenheit von Ca^{2+} nur eine sehr geringe Aktivität, während das Enzym NOS-II WT noch 32-60 % Aktivität aufwies. Über die Aktivität der NOS-I-Mutanten in Abwesenheit von Ca^{2+} kann keine gesicherte Aussage gemacht werden. Die NOS-II-Mutante NOS-II 3K besaß eine Ca^{2+} -unabhängige Aktivität von 20-34 %. Über die Ca^{2+} -unabhängige Aktivität der NOS-II E3K kann keine gesicherte Aussage getroffen werden, da sich die beiden Aktivitätsstudien hier z.T. widersprechen.

Die spezifische Aktivität der NOS-I und ihrer Mutanten bewegte sich in einem Rahmen von 18 (NOS-I WT) bis 99 nmol/min/mg NOS (NOS-I VFM). Die drei anderen Mutanten lagen mit ± 40 nmol/min/mg NOS dazwischen.

4 Diskussion

In dieser Dissertation wurde die Interaktion der NOS-I und NOS-II mit Calmodulin (CaM) untersucht. Die CaM-Bindungsstellen beider Isoformen unterscheiden sich hauptsächlich durch vier nicht konservative Aminosäureaustausche (1.4.4). Es wurde die Bedeutung dieser vier Aminosäurereste in bezug auf die CaM-Bindung analysiert. Hierzu wurden synthetische Peptide, die Mutationen an den entsprechenden Positionen trugen, in verschiedenen Bindungsstudien eingesetzt. Von besonderem Interesse war dabei die Ca^{2+} -Abhängigkeit der CaM-Bindung dieser Peptide.

Um eine Aussage über die Bedeutung dieser Aminosäuren für die Aktivierung des Enzyms machen zu können, wurden entsprechende Enzymmutanten hergestellt und heterolog exprimiert. Ihre Aktivität in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} wurde in zwei Aktivitätsstudien untersucht.

Peptid-Calmodulin-Bindungsstudien

4.1 Die CaM-Bindung der Wildtyp-Peptide

Für ein Peptid der NOS-I-CaM-Bindungsstelle wurde in verschiedenen Studien eine nanomolare Affinität zu Ca^{2+} /CaM festgestellt (Tab. 4.1). Die Bindung war in allen Fällen reversibel und Ca^{2+} -abhängig. Die Bestimmung der Affinität der NOS-II WT-CaM-Bindungsstelle aus Mausmakrophagen ergab in fast allen Messungen eine subnanomolare Affinität zu Ca^{2+} /CaM und ApoCaM (Tab. 4.1). Eine Ausnahme bildete die Studie von VENEMA et al. (1996), die in Kompetitionsexperimenten eine etwas niedrigere Affinität zu Ca^{2+} /CaM ermittelten. Für ein Peptid der NOS-II-CaM-Bindungsstelle aus humanen Hepatozyten wurde eine Affinität zu Ca^{2+} /CaM von 3,3 nM bestimmt. Die Affinität in Abwesenheit von Ca^{2+} lag mit 40-100 nM deutlich niedriger.

Die in den hier beschriebenen SPR-Messungen mittels Kurvenanpassung ermittelte apparente Dissoziationskonstante für das NOS-I WT-Peptid lag mit 8,6 nM im Rahmen der Literaturwerte. Wesentlich höhere Werte ergaben die Auswertung der SPR-Messungen über den Scatchard-Plot (33 nM), sowie die ITC-Bindungsstudien (65 nM). Der erhöhte K_D -Wert im Scatchard-Plot kann evt. auf methodische Fehler zurückgeführt werden (4.3.3). In ITC-Messungen mit einem NOS-I WT-Peptid ermittelten BROKX et al. (2001) einen K_D -Wert von 7,7 nM. Der Unterschied zu meinen ITC-Messungen könnte von den speziellen Pufferbedingungen herrühren (4.3.2). Es konnte keine Bindung des NOS-I WT-Peptides an

ApoCaM beobachtet werden. Dies entspricht den Ergebnissen anderer Studien mit diesem Peptid (ZOCHE et al., 1996; VORHERR et al., 1993).

Tab. 4.1: Beispiele für Messungen mit Peptiden der NOS-I- und NOS-II-CaM-Bindungsstelle.

Peptid	K _D -Wert	Ca ²⁺	Methode	Publikation
NOS-I WT	1,8 nM	+	Fluoreszenzspektroskopische Messungen mit dansyliertem CaM	VORHERR et al., 1993
	2,2 nM	+	Peptid-Kompetitionsassay	ZHANG und VOGEL, 1994
	5,0 nM	+	SPR-Studien	ZOCHE et al., 1996
	3,9 nM	+	SPR-Studien	FISCHER et al., 2001
	2,6 nM	+	Peptid-Kompetitionsassay	FISCHER et al., 2001
	7,7 nM	+	ITC-Messungen	BROKX et al., 2001
NOS-II WT	< 0,1 nM	+	Fluoreszenzspektroskopische Messungen mit dansyliertem CaM	ANAGLI et al., 1995
	< 0,1 nM	-		
	1,5 nM	+	Peptid-Kompetitionsassay	VENEMA et al., 1996
	3,3 nM	+	Fluoreszenzspektroskopische Messungen mit dansyliertem CaM	MATSUBARA et al., 1997
	40-100 nM	-		
	< 0,1 nM	+	SPR-Studien	ZOCHE et al., 1996
	< 0,1 nM	-		

Für das Peptid mmNOS-II WT konnte wahrscheinlich aufgrund von Aggregation keine CaM-Bindung beobachtet werden. Für das NOS-II-Peptid aus der CaM-Bindungsstelle von humanen Hepatozyten (hhNOS-II WT) wurde eine apparente Dissoziationskonstante von 2 nM für die Bindung an Ca²⁺/CaM ermittelt. Dieser Wert korrespondiert sehr gut mit dem in der Literatur angegebenen Wert (Tab. 4.1). Der apparente K_D-Wert für die Bindung an ApoCaM lag mit 6,9 nM wesentlich niedriger als der Literaturwert (MATSUBARA et al., 1997). ZOCHE et al. ermittelten 1996 für das Peptid mmNOS-II WT eine Bindung an Ca²⁺/CaM und ApoCaM mit subnanomolarer Affinität. Dieses Peptid lag in den hier beschriebenen Studien vollständig aggregiert vor. Unterschiedliche Chargen verhielten sich ähnlich, so daß die Aggregation als Ursache für die fehlende Bindung in ITC- und SPR-Studien angenommen werden kann (4.3.1).

Für die beiden verwendeten NOS-II-Wildtyppeptide, die erwiesenermaßen an ApoCaM binden (ANAGLI et al., 1995; ZOCHE et al., 1996; MATSUBARA et al., 1997 und diese Arbeit, 3.3.4.3), konnte keine ApoCaM-Bindung in Gelshiftexperimenten gezeigt werden. Dies wurde für das Peptid mmNOS-II WT schon von ANAGLI et al. (1995) und VENEMA et al. (1996) beschrieben. Ebenso konnte für keine der Mutanten eine ApoCaM-Bindung in

Gelshiftexperimenten nachgewiesen werden. Es besteht die Möglichkeit, daß die Interaktion zwischen den Peptiden und ApoCaM über hydrophobe Wechselwirkungen und Salzbrücken zu schwach ist, um unter den Bedingungen der nativen Gelelektrophorese mit 4 M Harnstoff zu bestehen.

4.2 Auswirkung der Mutationen auf das CaM-Bindungsverhalten der Peptide

4.2.1 Welche Auswirkungen hatten die Mutationen auf die Affinität zu Ca^{2+} /CaM?

ITC- und SPR-Studien ergaben, daß sich die NOS-I-Peptide um maximal zwei Größenordnungen in ihrer Affinität zu Ca^{2+} /CaM unterschieden. Die Mutation der Positionen 3, 6 und 9 zusammen (VKF) bewirkte eine deutlich höhere Affinität im Vergleich zum Wildtyp zu Ca^{2+} /CaM. Ein Austausch der vierten Aminosäure (Position 13; VKFM) führte in ITC-Studien zu einer weiteren Erhöhung der Affinität.

Die erhöhte Affinität kam wahrscheinlich durch eine langsamere Dissoziation zustande. Die Mutanten besaßen alle eine niedrigere apparente Dissoziationsratenkonstante als der Wildtyp, die mit steigender Anzahl an Mutationen abnahm. Auf die Assoziation schien sich nur die Mutation der Positionen 3, 9 und 13 (VFM) auszuwirken. Dieses Peptid zeigte eine deutlich niedrigere apparente Assoziationsratenkonstante.

Die Mutation an Position 3 (V511K) des NOS-II-CaM-Bindungsmotives veränderte die Ca^{2+} /CaM-Affinität nicht grundlegend. Auch für die Mutante NOS-II F517K kann unter Vorbehalt eine apparente Dissoziationskonstante im subnanomolaren Bereich angenommen werden. Dies ergab eine Messung bei einer Flußrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ und einer CaM-Konzentration von 50 nM. Eine deutlich niedrigere apparente Affinität ergab sich durch die Mutation an drei Positionen (3K). Mit der vierten Mutation an Position 6 des Bindungsmotives (E3K) stieg die apparente Affinität zu Ca^{2+} /CaM wieder an. Alle Mutanten zeigten damit eine niedrigere Affinität als der Mausmakrophagen-Wildtyp (ZOCHE et al., 1996). Für diesen wurde eine Dissoziationsratenkonstante $< 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Die apparenten Dissoziationsratenkonstanten der Peptidmutanten lagen deutlich höher.

Die Auswertung der Dissoziationsphase mittels ΔRUd ermöglichte einen qualitativen Vergleich der Messungen. Ein stark ausgeprägtes Plateau kann auf niedrigen Dissoziationsratenkonstanten oder auf methodischen Problemen wie Rückbindung und Käfigeffekten beruhen (3.3.3). Die hohen Werte für ΔRUd in allen Messungen deuteten auf methodische

Probleme hin (4.3.3), da sie nicht mit extrem niedrigen Dissoziationsratenkonstanten korrelierten.

4.2.2 Welche Auswirkungen hatten die Mutationen auf die Affinität zu ApoCaM?

Der Austausch nur einer Aminosäure aus der NOS-I-Sequenz gegen die korrespondierende Aminosäure der NOS-II-Sequenz an Position 6 erzeugte eine ApoCaM-Bindungsstelle mit mikromolarer Affinität. Wie im Falle der Ca^{2+} /CaM-Bindung stieg die Affinität zu ApoCaM mit weiteren Mutationen an den Positionen 3, 9 und 13 an. Die Dreifach- und Vierfachmutanten wiesen nanomolare Affinitäten zu ApoCaM auf.

Durch die Mutationen in der CaM-Bindungsstelle der NOS-II wurde die Fähigkeit, an ApoCaM zu binden, zwar nicht aufgehoben, aber doch vermindert. Für die Affinität des Wildtyps zu ApoCaM in ITC-Studien existieren keine Daten. Geht man von der in SPR-Studien ermittelten apparenten Dissoziationskonstante aus, so zeigt der Wildtyp eine Affinität im Bereich von ca. 7 nM zu ApoCaM. Wie man schon an den ITC-Studien mit NOS-I WT sehen kann, lagen die K_D -Werte bei diesen Messungen um ca. eine Größenordnung höher als die apparenten Dissoziationskonstanten aus den SPR-Messungen (eigene Beobachtung; 4.3.2). Eine Affinität von ca. 70 nM zu ApoCaM wurde für die Einzelmutante ermittelt, bei der die Position 13 des Bindungsmotives mutiert war (M521K). Die anderen Einzelmutationen führten in der Reihenfolge Position 9 (F517K) und Position 3 (V511K) zu einer Erhöhung des K_D -Wertes. Während alle Einzelmutanten eine nanomolare Affinität zu ApoCaM aufwiesen, bewirkte die Mutation an drei oder vier Positionen des Bindungsmotives eine ApoCaM-Affinität im mikromolaren Bereich.

Erste Voruntersuchungen zu den Peptidmutanten von ZOCHE (1997) mittels SPR-Studien hatten eine besondere Bedeutung der Position 13 (NOS-II M521K) für die Ca^{2+} -Abhängigkeit der CaM-Bindung ergeben. Eine CaM-Bindung konnte anschließend mit diesem Peptid in SPR-Studien nur in einem Fall in Anwesenheit von Ca^{2+} gemessen werden (TWELKER, 1998). Hier zeigte sich eine irreversible Bindung an Ca^{2+} /CaM, die durch EGTA vollständig gelöst wurde. Die ITC-Bindungsstudien belegen aber, daß die Mutation an Position 13 keinerlei Auswirkungen auf die ApoCaM-Bindung hatte. Diese Ergebnisse deuten bereits darauf hin, daß zwischen der Bindung an ApoCaM und der Auflösung einer Ca^{2+} /CaM-Bindung durch Ca^{2+} -Komplexierung deutlich unterschieden werden muß.

4.2.3 Es muß zwischen der Bindung an ApoCaM und der Ca^{2+} -Abhängigkeit der CaM-Bindung unterschieden werden.

Sowohl der Unterschied in den Messungen mit Peptid NOS-II M521K (4.2.2), wie auch die Auswertung des Restsignals nach der Regenerationsphase in SPR-Messungen (ΔRUR) belegen, daß eine hochaffine Bindung an ApoCaM keine Aussage über die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Ca^{2+} /CaM-Bindung zuläßt. Für eine vollständig Ca^{2+} -unabhängige Bindung an CaM wird erwartet, daß das Peptid zum einen an ApoCaM bindet, und daß zum anderen die Bindung an Ca^{2+} /CaM durch EGTA nicht gelöst werden kann. Dies war aber schon für den NOS-II-Wildtyp nicht der Fall. Hier wurden ca. 40-50 % der Peptid- Ca^{2+} /CaM-Bindungen durch EGTA gelöst. Dagegen konnten alle Bindungen des NOS-I-Wildtyps an Ca^{2+} /CaM aufgehoben werden.

Schon mit der Einführung der einzelnen Mutation an Position 6 der NOS-I-CaM-Bindungsstelle stieg der Anteil an Bindungen, die durch Ca^{2+} -Komplexierung nicht gelöst werden konnten (ΔRUR) auf 9 % an. Durch weitere Mutationen stieg der Wert für ΔRUR aber nicht signifikant an, obwohl die Affinität zu ApoCaM zunahm.

Deutlicher war dagegen der Effekt der Mutationen auf die NOS-II-CaM-Bindungsstelle. Durch die Mutation an Position 9 wurden alle Peptid- Ca^{2+} /CaM-Komplexe in Anwesenheit von EGTA gelöst. Auch die Mutanten 3K und E3K, bei denen die Position 9 ebenfalls ausgetauscht ist, wiesen nur noch einen Anteil von 2-6 % an Komplexen nach dem Regenerationspuls auf.

Trotz mikro- bis nanomolarer Affinität zu ApoCaM blieb bei allen ApoCaM-bindenden Peptiden beider Isoformen eine Ca^{2+} -Abhängigkeit der Bindung bestehen, wenn die Interaktion zunächst zwischen Peptid und Ca^{2+} /CaM stattfand.

4.2.4 Welche Auswirkungen hatten die Mutationen auf die Thermodynamik der Bindung?

BROKX et al. zeigten 2001 anhand von Peptidstudien, daß die Thermodynamik der Bindung verschiedener CaM-Bindungspeptide an Ca^{2+} /CaM sehr unterschiedlich ist. Sie führten dies auf unterschiedliche Interaktionen zwischen den Peptiden und Ca^{2+} /CaM zurück. So konnten sie zeigen, daß die stärker helikalen Peptide, wie z.B. das NOS-I-Peptid, durch die starken hydrophoben Interaktionen hauptsächlich entropisch getrieben an CaM banden.

Das in dieser Arbeit verwendete NOS-I WT-Peptid band enthalpisch getrieben an Ca^{2+} /CaM. Es handelte sich um ein sieben Aminosäuren längeres Peptid, als das von BROKX et al. (2001) verwendete. Innerhalb dieser sieben Aminosäuren befinden sich drei positive Ladungen, die

die Ausbildung von Salzbrücken und damit die enthalpischen Anteile verstärken könnten. Auch die unterschiedlichen Pufferbedingungen könnten zu dem abweichenden Ergebnis geführt haben (4.3.2).

Die Mutationen der NOS-I-Bindungsstelle führten nicht zu einer grundlegenden Änderung in der Thermodynamik der Ca^{2+} /CaM-Bindung. Es handelte sich in allen Fällen um eine enthalpisch getriebene Reaktion mit positiver Bindungsentropie (die Ausnahmen sind unter 4.3.2 beschrieben). Die Bindungsenthalpie und -entropie nahmen mit steigender Anzahl an Mutationen leicht zu, die freie Bindungsenergie ab.

Ein deutlicher Unterschied zeigte sich allerdings für die Thermodynamik der Ca^{2+} /CaM- und der ApoCaM-Bindung. Für die Bindung an ApoCaM wird ein stärkerer Anteil an unspezifischen hydrophoben Interaktionen und konservierten Wasserstoffbrückenbindungen angenommen (SWINDELLS und IKURA, 1996). Der entropische Effekt dieser Interaktion kommt durch die Dehydratation der interagierenden Bereiche zustande (MAKHATADZE und PRIVALOV, 1995). Die Bindung an ApoCaM erwies sich für alle NOS-I- und NOS-II-Peptide als entropisch getrieben. ΔH war in allen Fällen positiv. Für die NOS-I-CaM-Bindungsstelle konnte eine deutliche Zunahme von ΔS durch den Austausch der geladenen gegen die hydrophoben Aminosäuren (VKF und VKFM) beobachtet werden. Die Bindungsentropie nahm parallel zur Hydrophobizität der Peptide (5.3) zu. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Mutanten der NOS-II zeigte sich allerdings nicht. Hier schien der Austausch von einzelnen hydrophoben gegen geladene Reste nicht ins Gewicht zu fallen, obwohl die Hydrophobizität der Peptide mit den Mutationen abnahm (5.3).

4.2.5 Kann man die Unterschiede in der CaM-Bindung strukturell erklären?

Mit der Mutation E736K wird in der NOS-I-CaM-Bindungsstelle an Position 6 eine positive Ladung eingeführt (Abb. 4.1). Diese ist sowohl bei der NOS-II wie auch in IQ-Motiven an dieser Position hoch konserviert und dient wahrscheinlich der Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zu ApoCaM. IQ-Motive sind im allgemeinen klassische Bindungsmotive für die ApoCaM-Bindung (1.3.2). Sie beginnen ebenso wie die klassischen Ca^{2+} /CaM-Bindungsmotive mit einer hydrophoben Aminosäure an Position 1. Eine Mutation der Position 6 in der NOS-I-Sequenz in eine positive Aminosäure führte daher dazu, daß gleichzeitig die Konsensussequenz für eine klassische Ca^{2+} /CaM-Bindung, wie auch für den N-terminalen Anfangsbereich eines IQ-Motives erfüllt wurde.

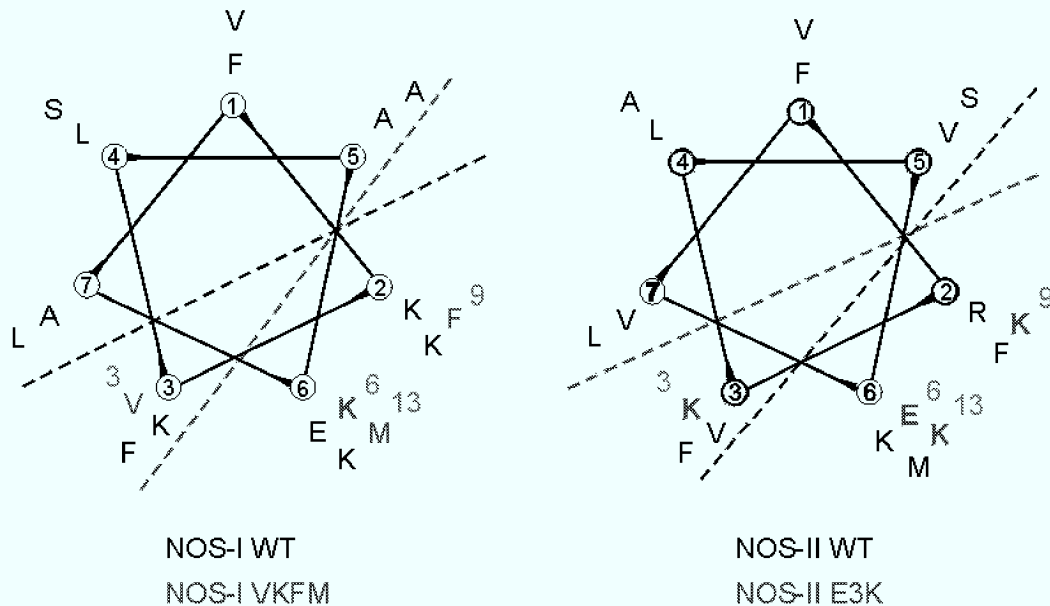


Abb. 4.1: α -helikale Darstellung des NOS-I- und NOS-II-CaM-Bindungsmotives (Position 1 bis 14) und ihrer Vierfachmutanten nach SCHIFFER und EDMUNDSON (1967). Die Sequenz des Wildtyps (NOS-I: AS 731-744 und NOS-II: AS 509-522) ist jeweils in schwarz dargestellt, die Veränderungen in den Mutanten sind rot dargestellt. Die kritischen Positionen im CaM-Bindungsmotiv sind mit grauen Zahlen markiert. Der amphipathische Charakter der Helices wird durch die gestrichelte Linie betont.

Für CaM konnten drei verschiedene Konformationen nachgewiesen werden (siehe Zitate unter 1.3.1). In Ca^{2+} -gesättigter Form liegen alle EF-Hände in der offenen Konformation vor und können mit α -helicalen Zielsequenzen über hydrophobe Bereiche an der Oberfläche spezifisch interagieren. In der Ca^{2+} -freien Form sind diese hydrophoben Bereich im inneren des CaMs verborgen. Eine Interaktion mit Bindungssequenzen ist nicht möglich. Trotzdem findet eine Bindung an ApoCaM statt. Der C-Terminus von ApoCaM kann eine semioffene Konformation annehmen, die die Interaktion mit dem N-terminalen Teilbereich eines IQ-Motives über unspezifische hydrophobe Interaktionen und einige konservierte Wasserstoffbrückenbindungen ermöglicht (SWINDELLS und IKURA, 1996; HOUDUSSE und COHEN, 1995). Somit wäre eine Interaktion des Peptides NOS-I E736K mit dem C-Terminus von ApoCaM möglich.

Der Austausch von weiteren geladenen Aminosäuren (Position 3, 9 und 13) in hydrophobe Aminosäuren führte zu einer Verkleinerung des amphipathischen Bereichs der Helix und zu einer Abnahme des amphipathischen Charakters insgesamt (Abb. 4.1). Die mutierte NOS-I-Sequenz gleicht damit nicht nur mehr der NOS-II-Sequenz, sondern auch dem Charakter von IQ-Motiven. Dies führte zu einer Zunahme der ApoCaM-Affinität.

Die Bedeutung einer positiven Ladung an Position 6 wird noch dadurch unterstrichen, daß für das Peptid NOS-I VFM, welches die native Aminosäure an Position 6 trägt, keine ApoCaM-Bindung gezeigt werden konnte.

Um die Bedeutung der Position 6 für die NOS-II-ApoCaM-Bindung zu untersuchen, wurde das Lysin gegen die korrespondierende Aminosäure (Glutamat) der NOS-I ausgetauscht. Zu erwarten wäre, daß dieses Peptid seine Fähigkeit, an ApoCaM zu binden, verloren hat. Mit diesem Peptid konnte keinerlei CaM-Bindung festgestellt werden. Auch in Gelshiftexperimenten, in denen sogar das hochaggregierte Peptid mmNOS-II WT eine Bindung an CaM einging, zeigte dieses Peptid keine Bindung. Dies deutet darauf hin, daß das Peptid seine Fähigkeit an CaM zu binden unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration verloren hat. In der NOS-II-CaM-Bindungsstelle könnte also die Position 6 eine große Bedeutung für die CaM-Bindung haben. Es könnte aber auch durch die Mutation eine Konformationsstörung hervorgerufen werden, die die CaM-Bindung verhindert.

Die Mutationen an den anderen Positionen bewirkten wie in der NOS-I-CaM-Bindungsstelle eine Veränderung der Affinität. Dabei nahm die Affinität zu ApoCaM immer weiter ab, je weiter N-terminal die Mutation lag (Position 13 > 9 > 3). Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, daß die Interaktion der semioffenen Konformation am C-Terminus von ApoCaM mit Zielsequenzen über deren N-terminalen Bereich erfolgt. So haben Mutationen im N-terminalen Bereich einen größeren Einfluß auf die ApoCaM-Bindung, als Mutationen im C-terminalen Bereich des Bindungsmotives.

Es verwundert ein wenig, daß das Peptid NOS-II E3K mit mutierter Position 6 keine schlechtere Bindung an ApoCaM zeigte, als das Peptid NOS-II 3K. Die Bindung ist in beiden Fällen mit mikromolarer Affinität möglich. Die Position 6 des Bindungsmotives scheint daher zwar eine große Bedeutung für die Bindung an ApoCaM zu haben, scheint jedoch in der NOS-II-Bindungssequenz nicht alleine ausschlaggebend zu sein.

YUAN et al. konnten 1998 zeigen, daß ein Peptid der NOS-II-CaM-Bindungsstelle in unterschiedlichen Konformationen an Ca^{2+} /CaM und ApoCaM band, Ca^{2+} /CaM in einer α -helicalen Konformation und an ApoCaM mit einer β -Faltblattstruktur Typ II. Dieser Konformationsunterschied könnte erklären, warum zwischen ApoCaM-Bindung und der Auflösung eines Ca^{2+} /CaM-Komplexes durch EGTA unterschieden werden muß (4.2.3). Während im ersten Fall die Bindung sofort in der „richtigen“ Konformation (also dem β -Faltblatt) erfolgt, muß diese Konformation bei Ca^{2+} -Komplexierung erst angenommen werden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß die α -helicale Konformation bei

Ca^{2+} -Komplexierung erhalten bleibt und die Bindung an ApoCaM deswegen geschwächt wird. Dies würde erklären, warum durch den Regenerationspuls in SPR-Messungen sogar Bindungen zwischen dem NOS-II WT-Peptid und Ca^{2+} /CaM zu 40-50 % gelöst wurden.

4.3 Diskussion der verwendeten Methoden für die Peptidstudien

Nicht alle Messungen ergaben ein konsistentes Bild. Besonders folgende Diskrepanzen waren auffällig:

- Die ermittelten Bindungskonstanten aus den verschiedenen Auswertungsverfahren der SPR-Messungen und den ITC-Messungen lagen z. T. um ein bis zwei Größenordnungen auseinander.
- Die NOS-II-Peptide zeigten keine Ca^{2+} /CaM-Bindung in den ITC-Studien, während sie in den SPR-Messungen an Ca^{2+} /CaM banden.
- Die NOS-II-Peptidmutanten zeigten keine ApoCaM-Bindung in SPR-Studien, während sie in ITC-Studien an ApoCaM banden.
- Mit dem Peptid mmNOS-II WT konnte weder in SPR- noch in ITC- Messungen eine CaM-Bindung gezeigt werden, mit dem Peptid hhNOS-II WT nur in SPR-Messungen.
- Für das Peptid NOS-I VFM konnte in ITC-Studien, für das Peptid NOS-II M521K dagegen in SPR-Studien keine CaM-Bindung gemessen werden.

Mögliche Ursachen dieser Diskrepanzen möchte ich kurz im Folgenden diskutieren.

4.3.1 Aggregation von Peptiden

Peptidaggregate können in Bindungsstudien nicht nur die Bindungsstöchiometrie verfälschen, sondern sie können auch eine Bindung komplett verhindern. Besonders hydrophobe Peptide tendieren in wässriger Lösung zur Ausbildung von Aggregaten. Für ein Peptid der NOS-II-CaM-Bindungsstelle aus Mausmakrophagen wurde schon von ANAGLI et al. (1995) eine Aggregation in Gelshiftexperimenten beobachtet. MATSUBARA et al. beschrieben 1997, daß ein Peptid der humanen hepatischen NOS-II-CaM-Bindungsstelle (AS 509-532) weniger stark zur Aggregation neige. Durch Größenausschlußchromatographie (3.4) konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Das Peptid mmNOS-II WT lag vollständig aggregiert vor, während das Peptid hhNOS-II WT zum Teil als Aggregat und zum Teil als Monomer auftrat. Vergleicht man die Hydrophobizität der beiden Peptide miteinander (5.3, nach EISENBERG et al., 1982b), so zeigt sich, daß das Peptid hhNOS-II WT die höhere Hydrophobizität besitzt. Allerdings hat dieses Peptid eine weniger stark ausgeprägte Amphiphilie (5.3, nach EISENBERG et al., 1982). Ein Grund für die starke Aggregation des Peptides mmNOS-II WT

könnte daher die Kombination aus einer hohen Hydrophobizität mit einem starken hydrophoben Moment sein.

Von den NOS-I-Peptiden zeigt NOS-I VFM die höchste Hydrophobizität und Amphiphilie. Eine besonders hohe Amphiphilie weist auch das Peptid NOS-II K514E auf. Für letzteres Peptid konnte keinerlei CaM-Bindung gezeigt werden. Starke Aggregation oder Störungen der Peptidkonformation könnten dafür verantwortlich sein.

Das Peptid NOS-I VFM ließ sich für SPR-Studien nur in seltenen Fällen immobilisieren und ergab in ITC-Studien in freier Lösung kein Bindungssignal. Dies könnte auf eine Aggregation des Peptids hindeuten.

4.3.2 Isotherme Titrationskalorimetrie

Auffällig bei dieser Methode ist, daß die ermittelten Bindungskonstanten der Peptide zu CaM um ca. eine Größenordnung höher lagen als die apparenten Bindungskonstanten aus SPR-Studien. Da die Detektionsgrenze dieser Methode für K_D -Werte bei ca. 1 nM liegt (DOYLE, 1997), bewegten sich die Messungen wahrscheinlich zum Teil in diesem Grenzbereich, was zu den Abweichungen zwischen den verschiedenen Methoden geführt haben könnte.

Sowohl für das Peptid NOS-I WT, wie auch für NOS-I E736K ergaben sich in verschiedenen Messungen in Ca^{2+} -Puffer positive und negative Werte für die Bindungsentropie. Es könnte sein, daß im Falle dieser Peptide sowohl entropisch vorteilhafte, als auch nachteilige Prozesse bei der Bindung an Ca^{2+} /CaM eine Rolle spielten, die bei minimalen Veränderungen der Assaybedingungen unterschiedlich stark zur Reaktion beitrugen. So ist z.B. bekannt, daß Veränderungen in der Salzkonzentration im Puffer oder des pH-Wertes einen großen Einfluß auf die Thermodynamik einer Bindung haben (WINTRODE und PRIVALOV, 1997; FUKADA und TAKAHASHI, 1998; TSVETKOV et al., 1999). Außerdem fanden BROKX et al. (2001) unter anderen Pufferbedingungen eine entropisch getriebene Bindung des Peptids an Ca^{2+} /CaM (4.2.4).

Mit den Peptiden mmNOS-II WT und hhNOS-II WT konnte in ITC-Experimenten keine CaM-Bindung nachgewiesen werden. Bei mmNOS-II WT ist wahrscheinlich eine vollständige Aggregation des Peptids dafür verantwortlich (3.4). Auch für das Peptid hhNOS-II WT reichte der Anteil an Peptidmonomeren wahrscheinlich nicht aus, um detektierbare Bindungssignale in ITC-Experimenten zu erzeugen. Mit den Peptiden NOS-I VFM und NOS-II K514E konnte ebenfalls keine Bindung an CaM beobachtet werden. Wie unter 4.3.1 diskutiert, könnten auch hier Peptidaggregate die Bindung verhindert haben.

Ein ungeklärtes Problem stellen die Messungen der NOS-II-Peptidmutanten in Ca^{2+} -Puffer dar. Keine der ITC-Messungen mit diesen Peptiden ergab eine Ca^{2+} /CaM-Bindung, obwohl in Gelshiftexperimenten (3.1) und SPR-Messungen (3.3.4.4) eine Bindung an CaM in Anwesenheit von Ca^{2+} gezeigt werden konnte. Eine Aggregation der Peptide kann zumindest für die beiden Mutanten NOS-II 3K und E3K ausgeschlossen werden (3.4).

4.3.3 Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Studien

In den Abschnitten 3.1 und 3.3 wurde die Problematik der Meßmethode eingehend besprochen. Zu den vordergründigen Problemen zählt die hohe Immobilisierungsdichte bei vielen Messungen, die besonders zu Massentransporteffekten und zu sterischer Hinderung der Peptid-CaM-Bindung führen kann. FISCHER et al. (2001) bestimmten für das NOS-I WT-Peptid eine optimale Immobilisierungsdichte auf CM5-Chips von $\leq 7,5 \text{ fmol/mm}^2$. Die Immobilisierungsdichten der hier diskutierten Experimente lag in einem Rahmen von 43 bis 1050 fmol/mm^2 und damit insgesamt zu hoch. Dies zeigte sich vor allem in der Abhängigkeit des maximalen Resonanzsignals von der Immobilisierungsdichte. Für das Peptid NOS-I WT konnte von FISCHER et al. (2001) gezeigt werden, daß ein linearer Zusammenhang zwischen der Immobilisierungsdichte und der CaM:Peptid-Stöchiometrie besteht. Dieser Zusammenhang konnte für alle verwendeten Peptide bestätigt werden (3.3.4.1). Eine niedrigere Immobilisierungsdichte konnte aber in einigen Fällen (z.B. NOS-I VFM, VKFM und NOS-II F517K) nicht eingestellt, bzw. auf Oberflächen mit niedrigerer Dichte keine Bindung detektiert werden.

Eine Ursache für die Abnahme der CaM:Peptid-Stöchiometrie könnte in einer sterischen Hinderung der 1:1-Bindung gelegen haben. Ab einer Immobilisierungsdichte von 610 fmol/mm^2 ist bei homogener Verteilung des Liganden theoretisch eine 2:1-Bindungsstöchiometrie von Peptid:CaM auf der CM5-Oberfläche möglich (TWELKER, 1998). Aber auch schon bei niedrigeren Immobilisierungsdichten kann eine inhomogene Verteilung von Liganden zur sterischen Hinderung einer 1:1-Bindung führen.

Neben der Stöchiometrie wird auch die Bindungskinetik durch hohe Immobilisierungsdichten negativ beeinflusst. MYSZKA (1997) und MYSZKA et al. (1998) geben eine gute Übersicht über die Auswertung massentransportlimitierter Messungen.

Die Bestimmung der apparenten Raten- und Bindungskonstanten erfolgte über eine ausgewählte CaM-Konzentration von 100 nM. Dabei ist zu beachten, daß diese Werte auf Einzelmessungen bei einer CaM-Konzentration und einer relativ langsamen Flußrate ($5 \mu\text{l/min}$) beruhen. Da die Messungen mit allen Peptiden nach der gleichen Methode

ausgewertet wurden, können diese Werte dem qualitativen Vergleich der Peptid-CaM-Bindung untereinander dienen. Die gute Übereinstimmung mit den Literaturwerten für die Peptide NOS-I WT und hhNOS-II WT (4.1) läßt vermuten, daß die Werte auch quantitativ recht zuverlässig sind.

Die Auswertung der Bindungskonstanten über das Gleichgewichtssignal (Scatchard-Plot und EC_{50} -Plot) ergab dagegen für alle Messungen Werte, die ein bis zwei Größenordnungen über den apparenten Bindungskonstanten lagen. Diese Inkonsistenz der Ergebnisse aus verschiedenen Auswertungsmethoden deutet auf methodische Fehler hin (SCHUCK und MINTON, 1996). Das Resonanzsignal R_{eq} wurde am Ende der Assoziationsphase manuell abgelesen, obwohl besonders bei niedrigen CaM-Konzentrationen noch kein Gleichgewicht der Bindungsreaktion erreicht war. Außerdem erfolgt diese Auswertung über alle CaM-Konzentrationen und schließt damit möglicherweise eine Bindung an unterschiedlich affine Bindungsplätze (heterogene Oberfläche) mit ein. Diese methodischen Fehler spiegelten sich vor allem darin wider, daß für Messungen mit den Peptiden NOS-I E736K, NOS-II V511K, 3K und E3K kein linearer Scatchard-Plot erstellt werden konnte. Die Auswertung über das Gleichgewichtssignal kann daher für die hier diskutierten Messungen weder dem qualitativen, noch dem quantitativen Vergleich der Daten dienen.

Rückbindungs- und Käfigeffekte führen in der Dissoziationsphase häufig zur Ausbildung eines Plateaus. Ein solches Plateau kann sich aber auch durch eine extrem langsame Dissoziationsratenkonstante einstellen. Die Ausbildung eines Plateaus wurde als relatives Resonanzsignal am Ende der eingestellten Dissoziationsphase (ΔRU_d) quantifiziert. Es kann anhand des Wertes für ΔRU_d kein direkter Rückschluß auf die Ursache des Plateaus gezogen werden. Allerdings lassen die apparenten Dissoziationsratenkonstanten vermuten, daß in den meisten Fällen methodische Probleme für die Ausbildung eines Plateaus verantwortlich waren.

Bei den SPR-Messungen fiel auf, daß nur mit dem Peptid hhNOS-II WT eine ApoCaM-Bindung gemessen werden konnte, obwohl alle NOS-I- und NOS-II-Mutanten in ITC-Studien an ApoCaM banden. Im Gegensatz zu den SPR-Messungen findet die Interaktion in ITC-Experimenten in freier Lösung statt. Wahrscheinlich kann sich die zur ApoCaM-Bindung notwendige Konformation der Peptide in der Cystein-immobilisierten Form nicht ausbilden. Im Gegensatz zu den Mutanten trug das Peptid hhNOS-II WT N-terminal ein Biotin zur Immobilisierung. Es könnte sein, daß eine Immobilisierung über Biotin-Streptavidin-Kopplung dem Peptid die notwendige Freiheit zur Interaktion mit ApoCaM ließ. Andererseits handelt es sich bei diesem Peptid um eine Sequenz aus der humanen Hepatozyten-NOS-II, die

eine wesentlich geringere Amphiphilie aufweist, als die NOS-II-Sequenz aus Mausemakrophagen. Es besteht daher auch die Möglichkeit, daß dieses Peptid in einer leicht anderen Konformation mit ApoCaM interagiert, als die Mutanten, die auf der Mausemakrophagen-Sequenz basieren.

Untersuchungen an heterolog exprimierter NOS-I und -II und ihren Mutanten

4.4 Aktivität der Wildtypenzyme in An- und Abwesenheit von Ca^{2+}

Die spezifische Aktivität von gereinigter NOS-I und NOS-II wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 zusammengefaßt.

Tab. 4.2: Literaturwerte aus verschiedenen Messungen zur Bestimmung der spezifischen NOS-Aktivitäten.

gereinigte NOS	spez. Aktivität	Assay	Publikation
heterolog exprimierte NOS-I	660 nmol/min/mg	Griessassay	ABU-SOUD und STUEHR, 1993
heterolog exprimierte NOS-I	700 nmol/min/mg	Oxyhämoglobinassay	ABU-SOUD et al., 1996
NOS-I aus dem humanen Cerebellum	74,3 nmol/min/mg	Tritiumassay	SCHMIDT und MURAD, 1991
NOS-I aus dem Rattencerebellum	960 nmol/min/mg	Tritiumassay	BREDT und SNYDER, 1990
NOS-I aus dem Schweinecerebellum	730 nmol/min/mg	Chemilumineszenz-detektion	MAYER et al., 1990
heterolog exprimierte NOS-II	842 nmol/min/mg	Griessassay	ABU-SOUD und STUEHR, 1993
Makrophagen-NOS-II der Maus	1313 nmol/min/mg	Griessassay	STUEHR et al., 1991
Makrophagen-NOS-II aus RAW 264.7 Zellen	325 nmol/min/mg	Tritiumassay	STEVENS-TRUSS und MARLETTA, 1995

In den hier diskutierten Messungen lag die spezifische Enzymaktivität der NOS-I WT in der ersten Messung des Griessassays bei 18,5 nmol/min/mg und damit weit unterhalb der Literaturwerte. Geht man von einem durchschnittlichen NOS-I WT-Anteil im Zelllysate von 2 % aus, was als Schätzung aus den immunologischen Nachweisen der NOS hervorging, so kann man auch für weitere Messungen Näherungswerte für die spezifische Enzymaktivität der NOS-I berechnen. Es ergäben sich Aktivitäten von 225 bzw. 122 nmol/min/mg für die zweite und dritte Messung im Griessassay, die damit im Rahmen der Literaturwerte lägen. Für den

Tritiumassay läge die NOS-I-Aktivität mit 36 nmol/min/mg unterhalb der Literaturwerte. Für die NOS-II liegen keine Werte der spezifischen Enzymaktivität vor. Es konnte keine Quantifizierung der NOS-II im Zelllysatsatz durchgeführt werden. Daher ist kein Vergleich mit den Literaturwerten möglich.

Der NOS-I-Wildtyp zeigte in Abwesenheit von Ca^{2+} in beiden Assays keine signifikante Aktivität. Dies entsprach den Erwartungen, da auch die NOS-I der Ratte in Messungen von BREDT und SNYDER (1990) keine Ca^{2+} -unabhängige Aktivität gezeigt hatte. Für den Wildtyp der NOS-II wurde eine Ca^{2+} -unabhängige Aktivität von 32 % (Griessassay) und 60 % (Tritiumassay) ermittelt. Diese Werte lagen unterhalb der von STEVENS-TRUSS und MARLETTA (1995) bestimmten NOS-II-Aktivität von 70 % in Anwesenheit von EGTA, zeigten aber trotzdem eine signifikante Aktivität in Abwesenheit von Ca^{2+} .

Für alle Mutanten konnte eine Aktivität in Anwesenheit von Ca^{2+} festgestellt werden. In keinem Fall hatte daher die Mutagenese der CaM-Bindungsstelle eine Aktivierung des Enzyms verhindert.

4.5 Auswirkungen der Mutationen auf die Enzymaktivität in An- und Abwesenheit von Ca^{2+}

Die Mutagenese der NOS-I-CaM-Bindungsstelle führte in zwei Fällen zu einer erhöhten Aktivität im Zelllysatsatz. Dabei handelte es sich um die Mutanten VFM, die Austausche an den Positionen 3, 9 und 13 des CaM-Bindungsmotives trägt, und VKFM, bei der alle vier kritischen Aminosäuren ausgetauscht sind. Für die NOS-I VFM wurde dieses Ergebnis der allgemeinen Enzymaktivität durch die spezifische Enzymaktivität bestätigt. Das Ergebnis für NOS-I VKFM korreliert mit einer erhöhten Affinität der Peptidmutanten VKFM zu Ca^{2+} /CaM. Es kann aber anhand der verwendeten Methoden keine Aussage darüber getroffen werden, ob diese Steigerung der Aktivität wirklich auf eine erhöhte Ca^{2+} /CaM-Affinität zurückzuführen ist.

Eine Ca^{2+} -unabhängige Aktivität von ca. 12 % konnte für die Mutante NOS-I K737V im Griessassay beobachtet werden. Der Tritiumassay bestätigte dieses Ergebnis nicht. Eine eindeutige Aussage über eine Ca^{2+} -unabhängige Aktivität kann anhand der vorliegenden Daten für keine der NOS-I-Mutanten getroffen werden.

Die dreifache bzw. vierfache Mutation der NOS-II-CaM-Bindungsstelle schien keinen großen Einfluß auf die Enzymaktivität im Zelllysatsatz zu haben. Da die Mutanten oft etwas schwächer exprimierten als der Wildtyp (Abb. 3.26, rechts), könnte die spezifische Enzymaktivität etwas höher liegen. Die Mutante NOS-II 3K zeigte im Griessassay eine Ca^{2+} -unabhängige Aktivität

von 20-30 %, die damit nur unwesentlich niedriger lag als die des Wildtyps. Für die Vierfachmutante E3K kann keine eindeutige Aussage über die Aktivität in Abwesenheit von Ca^{2+} getroffen werden. Während sich in Messungen mit extrem niedriger Grundaktivität in beiden Assays eine Restaktivität in EGTA-Inkubationspuffer detektieren ließ, zeigte der Griessassay mit der höheren Grundaktivität (zweite Messung) keine Aktivität in diesem Puffer. Die zweite Messung mit dem Griessassay läßt daher vermuten, daß die vierte Mutation (Position 6 des CaM-Bindungsmotives) die Ca^{2+} -unabhängige Aktivierung des Enzyms aufgehoben hat, während die drei anderen Mutationen (Positionen 3, 9 und 13) sie nicht beeinflussten.

Ein interessanter Punkt ist, daß die Mutanten NOS-I VKFM und NOS-I K737V wie der NOS-II WT im Tritiumassay nicht vollständig durch L-NNA inhibiert werden konnten. Bei dem NOS-II-Wildtyp scheint L-NNA kein effektiver Inhibitor zu sein (eigene Beobachtung). Die Aktivitäten in diesem Assay lagen aber so niedrig, daß eine gesicherte Aussage über die verbleibende Restaktivität nicht getroffen werden kann. Ob die Mutation der Position 6 in der CaM-Bindungsstelle der NOS-I bewirkt hat, daß die beiden Mutanten vermindert auf L-NNA reagieren, läßt sich daher noch nicht sicher sagen. Da die Substratbindungsstelle in unmittelbarer Nachbarschaft der CaM-Bindungsstelle liegt (Abb. 1.3), könnten auch kleine Veränderungen in der Sekundär- oder Tertiärstruktur einen Einfluß auf sie haben.

4.6 Diskussion der verwendeten Methoden für die Enzymaktivitätsstudien

Ein Problem der Aktivitätsstudien lag besonders in der Quantifizierung der NOS und den niedrigen Grundaktivitäten in einigen Messungen. Daher sollen im folgenden die Problematik der Meßmethoden und die Vorgehensweise der Auswertung näher diskutiert werden.

4.6.1 Mutationen in den Wildtyp-cDNAs

Bei der Sequenzierung der Wildtypsequenzen von NOS-I und NOS-II wurden besonders in der NOS-II-cDNA zahlreiche Abweichungen gegenüber der Datenbanksequenz festgestellt. Die Mutationen lagen alle außerhalb der CaM-Bindungsdomäne. Weder die Bindungsstellen für die Cofaktoren und das Substrat beider Isoformen, noch das inhibitorische Element der NOS-I waren betroffen. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, daß diese Mutationen einen Einfluß auf die Aktivität der Enzyme oder ihrer Regulation haben könnten. Dies beträfe aber sowohl den Wildtyp wie seine Mutanten und fiel damit im Vergleich zwischen beiden nicht ins Gewicht.

4.6.2 Quantifizierung der NOS im Zelllysät

Um die spezifische Enzymaktivität der NOS im Zelllysät berechnen zu können, mußte der Anteil NOS an der eingesetzten Proteinmenge bestimmt werden. Er wurde über die Intensität der entsprechenden Banden im coomassiegefärbten Gradientengel ermittelt (3.8.1). Problematisch bei dieser Methode ist, daß sich nicht alle Proteine gleichmäßig mit Coomassie-Blau anfärben lassen und daher der Proteingehalt nicht unbedingt linear mit der Färbungsintensität korreliert. Außerdem können kleine Proteine, die mit der Pufferfront laufen, aus dem Gel auslaufen. Sie gehen dann nicht in die Auswertung mit ein, obwohl sie in der Proteinmenge mit berücksichtigt sind. Solche Fehler zeigten sich in Abweichungen der Gesamtintensität aller Banden einer Spur bezogen auf die Menge an eingesetztem Protein. Dieser Wert bewegte sich in einem Rahmen von $1,075e^7 \pm 6,04e^5$ Pixel pro mg Gesamtprotein für alle NOS-I-Enzyme. Dies entspricht einer Abweichung von $\pm 5,6\%$, die in die Bestimmung der NOS-Menge und damit in die spezifische Enzymaktivität mit einging.

4.6.3 Bestimmung der NOS-Aktivitäten im Zelllysät

Die NOS-Aktivitäten im Zelllysät variierten zum Teil erheblich zwischen den einzelnen Messungen im Griessassay. Zum Beispiel lag die Aktivität der NOS-I WT in der zweiten Messung unter identischen Pufferbedingungen 13,2-fach höher, als in der ersten Messung (3.8.2.1, Tab. 3.24). Die Westernblotanalyse der Zelllysate zeigte, daß in beiden Fällen ähnlich viel NOS in den Lysaten vorhanden war. Zwei Gründe kommen für die unterschiedliche Grundaktivität in den Messungen in Betracht: Zum einen könnten leichte Unterschiede im Lyseverfahren die Aktivität der Enzyme beeinflußt haben. Zum anderen wurde die Inkubationsdauer von 120 min in der ersten Messung auf 60 min in den weiteren Messungen verkürzt. Nach Angaben von ABU-SOUD und STUEHR (1993) verläuft die Nitrit-Akkumulation unter diesen Assaybedingungen über den Zeitraum von zwei Stunden aber linear. Daher sollte die Verkürzung der Inkubationsdauer keinen Einfluß auf die Enzymaktivität pro Minute haben.

Die erste Messung mit dem Griessassay wies ein extrem schlechtes Signal:Hintergrund-Verhältnis auf. Besonders bei den Messungen in EGTA-Puffer machte das Hintergrundsignal mehr als 50 % des Gesamtsignals aus. Die zweite und dritte Messung wies nicht nur ein wesentlich besseres Signal:Hintergrund-Verhältnis auf, sondern zeigte auch eine um bis zu 17-fach höhere Enzymaktivität. Daher wurden hauptsächlich die Ergebnisse der zweiten und dritten Messung zum Vergleich der Enzymaktivitäten im Griessassay herangezogen.

Im Tritiumassay wurde die Zähleffizienz mittels einer Positivkontrolle bestimmt, die nur Inkubationspuffer mit Tritium in der verwendeten Verdünnung enthielt. Das theoretische Meßergebnis dieser Lösung kann über die eingesetzte Menge an tritiummarkiertem L-Arginin berechnet und mit dem tatsächlich gemessenen Wert verglichen werden. Der prozentuale Anteil des gemessenen Wertes am theoretischen Wert ist die Zähleffizienz. Diese lag im Durchschnitt bei $26,2 \pm 0,5 \%$. Niedrige Enzymaktivitäten könnten daher aufgrund der niedrigen Zähleffizienz nicht detektiert worden sein.

Mit Ausnahme der NOS-I WT-Messungen lagen die Meßwerte sehr niedrig. Sie überstiegen die Signale der Negativkontrolle selten um mehr als 10 %. Zum Teil lagen die Meßwerte unterhalb der Negativkontrolle und konnten daher nicht ausgewertet werden. Daher dürften besonders die Messungen in Abwesenheit von Ca^{2+} , die z.T. nur geringe Aktivität zeigten, große Ungenauigkeiten aufweisen.

4.6.4 Vergleich von Enzymaktivitäten im Zelllysät

Es war nur im Fall einer Expressionsreihe für die NOS-I und ihre Mutanten möglich, die genaue Menge an Enzym im Zelllysät zu bestimmen (3.8.1). Alle anderen Enzymaktivitäten beziehen sich auf die Gesamtmenge an eingesetztem Protein. Die Transfektionseffizienz der NOS-I-Enzyme variierte im Allgemeinen zwischen 50 und 90 % (3.7.1, Tab. 3.2). Nur die Mutante NOS-I K737V wies mit 20-30 % eine wesentlich niedrigere Transfektionseffizienz auf. Ebenso zeigten alle NOS-II-Enzyme eine sehr geringe Expression (10-30 %). Vergleich man die verschiedenen Transfektionen eines Enzyms miteinander, so zeigte sich eine relativ gleichbleibende Effizienz im Rahmen von $\pm 5 \%$. Auch die Analyse der Zelllysate mittels Westernblot ermöglichte eine Abschätzung der relativen Enzymmenge. Es zeigte sich, daß pro Enzym immer ein ähnlich starkes Signal bei gleicher Proteinmenge detektiert wurde. Dies bedeutet für die Auswertung der Aktivitäten, daß die Enzymmengen in den einzelnen Meßreihen mit dem gleichen Enzym durchaus vergleichbar sein sollten. Dagegen ist es schwierig, einen Vergleich der Enzyme untereinander durchzuführen. Der Vergleich der allgemeinen Aktivität im Zelllysät zwischen Wildtyp und Mutanten kann daher nur Tendenzen wiedergeben.

4.7 Vergleich der Ergebnisse der Peptid- und Enzymstudien

4.7.1 Was sagen Peptidstudien über die Vorgänge im gesamten Protein aus?

Die Ergebnisse von Peptidstudien lassen sich nicht in allen Fällen direkt auf das gesamte Protein übertragen. Ein Peptid kann zwar die Aminosäuresequenz eines Teilbereiches aus einem Protein genau abbilden, muß aber nicht zwingend die gleiche Sekundärstruktur aufweisen. Die Tertiär- und Quartärstruktur kann zu Interaktionen zwischen Bereichen des Proteins führen, die in der Primärstruktur weit auseinander liegen. Solche Interaktionen, aber auch Interaktionen mit direkt benachbarten Bereichen des Proteins werden in Peptidstudien nicht berücksichtigt.

Eine Möglichkeit, solche Interaktionen mit anderen Teilbereichen des Proteins zu untersuchen, bieten Studien an Chimären. Durch solche Chimärenstudien konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, daß der Austausch der CaM-Bindungsstellen zwischen NOS-I und NOS-II bzw. NOS-II und NOS-III nicht ausreicht, um das CaM-Bindungsverhalten der Isoformen umzukehren (RUAN et al., 1996; VENEMA et al., 1996).

Mit Hilfe von Deletionsmutanten fanden RUAN et al. (1996) einen Bereich in der NOS-II (AS 484-726), der für die Ca^{2+} -unabhängige Aktivierung des Enzyms essentiell ist.

In der Reduktasedomäne von NOS-I und NOS-III wurde ein autoinhibitorisches Element gefunden, das in der NOS-II fehlt (1.4.3). Die Deletion dieses Sequenzabschnittes aus der NOS-I (AS 831-870; DAFF et al., 1999) erzeugte eine Mutante, die auch in Abwesenheit von Ca^{2+} noch Aktivität zeigte.

Diese Studien bestätigen, daß im Falle der NOS Sequenzbereiche außerhalb der CaM-Bindungsstellen für die Aktivierung der Enzyme durch CaM eine wichtige Rolle spielen. Inwiefern sie auch eine Rolle für die CaM-Bindung spielen, kann nicht gesagt werden. Ebenso kann nicht vorhergesagt werden, ob sich Veränderungen in der CaM-Bindung auf die Aktivierung des Enzyms auswirken. Daher können Ergebnisse aus Peptidstudien immer nur als Grundlage für Experimente mit dem gesamten Protein dienen.

4.7.2 Welche Ergebnisse der Peptidstudien lassen sich auf das gesamte Enzym beziehen?

Tab. 4.3: Kurze Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der Peptid- und Enzymstudien.

Mutante	Peptidstudien	Enzymstudien
NOS-I VFM	Apparente Affinität zu $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ wie Wildtyp, keine ApoCaM-Bindung nachweisbar.	erhöhte Aktivität in Anwesenheit von Ca^{2+} .
NOS-I VKF	Erhöhte Affinität zu $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ im Vergleich zum Wildtyp, ApoCaM-Bindung mit nanomolarer Affinität.	Aktivität in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} ähnlich wie Wildtyp.
NOS-I VKFM	Erhöhte Affinität zu $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ im Vergleich zum Wildtyp, ApoCaM-Bindung mit nanomolarer Affinität.	Eventuell leicht erhöhte Aktivität in Anwesenheit von Ca^{2+} .
NOS-I K737V	Es wurde kein entsprechendes Peptid untersucht.	Aktivität in Anwesenheit von Ca^{2+} ähnlich wie Wildtyp, eventuell Restaktivität von 12 % in Abwesenheit von Ca^{2+} .
NOS-II 3K	Niedrigere Affinität zu $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ und ApoCaM als der Mausmakrophagen-Wildtyp.	Aktivität in Anwesenheit von Ca^{2+} ähnlich wie Wildtyp, Aktivität von 20-30 % in Abwesenheit von Ca^{2+} .
NOS-II E3K	Niedrigere Affinität zu $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ und ApoCaM als der Mausmakrophagen-Wildtyp.	Aktivität in Anwesenheit von Ca^{2+} ähnlich wie Wildtyp, keine Aktivität in Abwesenheit von Ca^{2+} .

Aus den Experimenten wurde deutlich, daß sich die Ergebnisse der Peptidstudien nicht direkt auf das ganze Enzym beziehen lassen. Besonders die herausragende Rolle der Mutation an Position 6 in den Peptidstudien mit NOS-I spiegelte sich zumindest in der Aktivität der Enzymmutanten nicht wider.

Die Mutationen im Enzym schienen im Allgemeinen einen größeren Einfluß auf die Aktivierung in Abwesenheit von Ca^{2+} , als auf die Aktivierung in Anwesenheit von Ca^{2+} zu haben. Dies korreliert mit der Feststellung, daß die Peptide sich zwar in ihrer Affinität zu $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ unterschieden, daß die einzelnen Mutationen aber eine größere Veränderung in der Ca^{2+} -unabhängigen Bindung von CaM bewirkten. Auch in den Chimärenstudien wurde durch den Austausch der CaM-Bindungsstellen zwischen NOS-I und NOS-II hauptsächlich die Aktivierung in Abwesenheit von Ca^{2+} beeinflusst (RUAN et al., 1996; 4.7.1).

Ein interessanter Punkt ist der Unterschied in der Ca^{2+} -unabhängigen Aktivität der Mutanten NOS-II 3K und NOS-II E3K. Die Untersuchungen deuten darauf hin, daß die Mutante

NOS-II 3K eine Aktivität in Abwesenheit von Ca^{2+} aufwies, während NOS-II E3K keine bzw. eine stark verminderte Aktivität in Abwesenheit von Ca^{2+} zeigte. Das würde bedeuten, daß die Aminosäure an der Position 6 des CaM-Bindungsmotives der NOS-II eine wichtige Rolle für die Ca^{2+} -unabhängige Aktivierung des Enzyms spielt. Dies korreliert insofern mit den Peptidstudien, als daß die Einzelmutation an Position 6 in der NOS-I-CaM-Bindungsstelle (Peptid NOS-I E736) eine Bindung an ApoCaM ermöglichte. Die entsprechende Mutation in der NOS-II-CaM-Bindungsstelle verhinderte dagegen jegliche CaM-Bindung, bzw. führte eventuell zur Aggregation des Peptides. Gegen diese Vermutung spricht allerdings die Tatsache, daß die beiden Peptidmutanten NOS-II 3K und NOS-II E3K, die sich nur durch die Mutation an Position 6 unterscheiden, mit mikromolarer Affinität an ApoCaM banden. Eine weiterführende Arbeitshypothese aus diesen Beobachtungen wäre, daß Position 6 wichtig für die NOS-II-Aktivierung in Abwesenheit von Ca^{2+} ist, aber nicht alleine die ApoCaM-Bindung in dieser Isoform steuert. In der NOS-I kontrolliert sie dagegen die Bindung an ApoCaM und hat damit eine etwas andere Funktion als in der NOS-II.

Abschließend kann man feststellen, daß sich die in den Peptidstudien ermittelten Affinitätsunterschiede zu Ca^{2+} /CaM von ein bis zwei Größenordnungen wahrscheinlich nicht auf die Enzymaktivität auswirkten. Eventuell sind diese Änderungen zu klein, um eine Auswirkung in der Aktivierung des Enzyms zu bewirken, oder aber sie werden durch Interaktionen mit anderen Bereichen des Enzyms überlagert. Eine Ca^{2+} -unabhängige Aktivität konnte durch die Mutationen in der NOS-I-CaM-Bindungsstelle nicht erzeugt werden. Dies korreliert mit den Ergebnissen einiger Arbeitsgruppen, daß noch andere Bereiche der NOS-II für die Ca^{2+} -Unabhängigkeit verantwortlich sind, und daß das autoinhibitorische Element der NOS-I eine solche Ca^{2+} -unabhängige Aktivität zumindest vermindert. Ebenso konnte die Ca^{2+} -unabhängige Aktivität der NOS-II durch drei Mutationen in der CaM-Bindungsstelle nicht unterbunden werden. Ob die Einführung der vierten Mutation dazu ausreicht, muß noch weiter untersucht werden.

4.8 Ausblick

Es ist von großer medizinischer Relevanz, die Regulation der NO-Synthasen zu verstehen, da NO-Synthasen in fast allen Geweben vorkommen und NO eine zentrale Rolle in vielen Vorgängen im Körper spielt (Tab. 1.3). Eine Fehlregulation der Enzyme scheint für einige Krankheiten verantwortlich zu sein. Auch die physiologische Bedeutung der Bindung an ApoCaM ist nur wenig erforscht und wurde bisher unterschätzt.

Die große Diversität von CaM-Bindungsmotiven und die hohe Flexibilität von CaM erschweren Vorhersagen für das CaM-Bindungsverhalten einzelner Proteine. Um so wichtiger ist es, einzelne Bindungsvorgänge genau zu verstehen, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen einzelnen Motiven zu finden.

Die große Bedeutung einzelner Aminosäuren für die CaM-Bindung von NOS-I- und NOS-II-Peptiden konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Um die Bedeutung dieser Aminosäuren verallgemeinern zu können, müßten weitere CaM-Bindungsstellen daraufhin untersucht werden. Dazu bietet sich zunächst die NOS-III-CaM-Bindungsstelle an, die einige nicht konservative Aminosäureaustausche im Vergleich zu NOS-I und NOS-II zeigt. Ebenso wie die NOS-I trägt sie an der Position 6 des CaM-Bindungsmotives keine positive Ladung.

Von größerer medizinischer Relevanz als Peptidstudien sind die Aktivitätsstudien mit mutierten Enzymen. Hier müßte zunächst die Ca^{2+} -unabhängige Aktivität aller Mutanten weiter untersucht werden. Durch Ca^{2+} -Titrationsstudien könnte die zur halbmaximalen Aktivierung notwendige Ca^{2+} -Konzentration bestimmt werden. CaM-Bindungsstudien könnten Unterschiede im CaM-Bindungsverhalten der Mutanten aufdecken. Außerdem würde eine Untersuchung des Elektronentransportes zwischen den einzelnen Domänen eventuell weiteren Aufschluß über die Bedeutung der Mutationen geben.

Von besonderem Interesse wäre eine Kombination aus Mutationen der CaM-Bindungsstelle und Chimären der NOS-I und NOS-II. So könnte zum Beispiel die Auswirkung des inhibitorischen Elementes auf die CaM-Bindung und die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Enzyme näher untersucht werden. Durch Deletion des autoinhibitorischen Elementes in der NOS-I könnte gezeigt werden, ob sich die ApoCaM-Bindung auch im Enzym mit den Mutationen verändert.

5 Anhang

5.1 Gelshift-Experimente

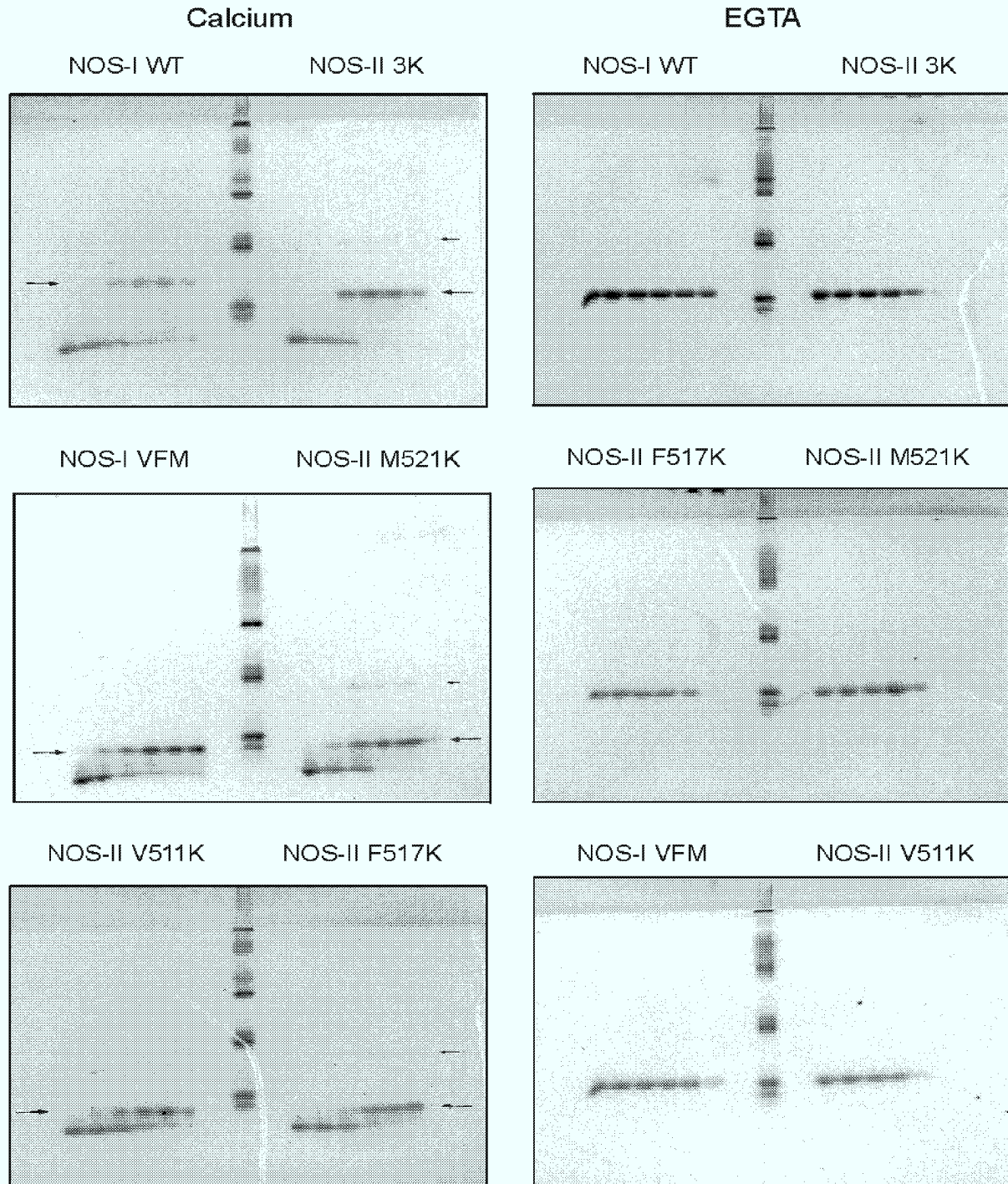


Abb. 5.1: Gelshiftexperimente. Links sind die Experimente mit Ca^{2+} , rechts die mit EGTA gezeigt. Das Verhältnis Peptid:CaM betrug jeweils von links nach rechts: 0, 0,5, 1, 2,5, 5 und 10. In der Mitte ist jeweils ein LMW-Größenmarker aufgetragen. Die CaM-Banden mit verminderter Mobilität sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Eine genaue Beschreibung dieser Experimente findet sich bei TWELKER (1998).

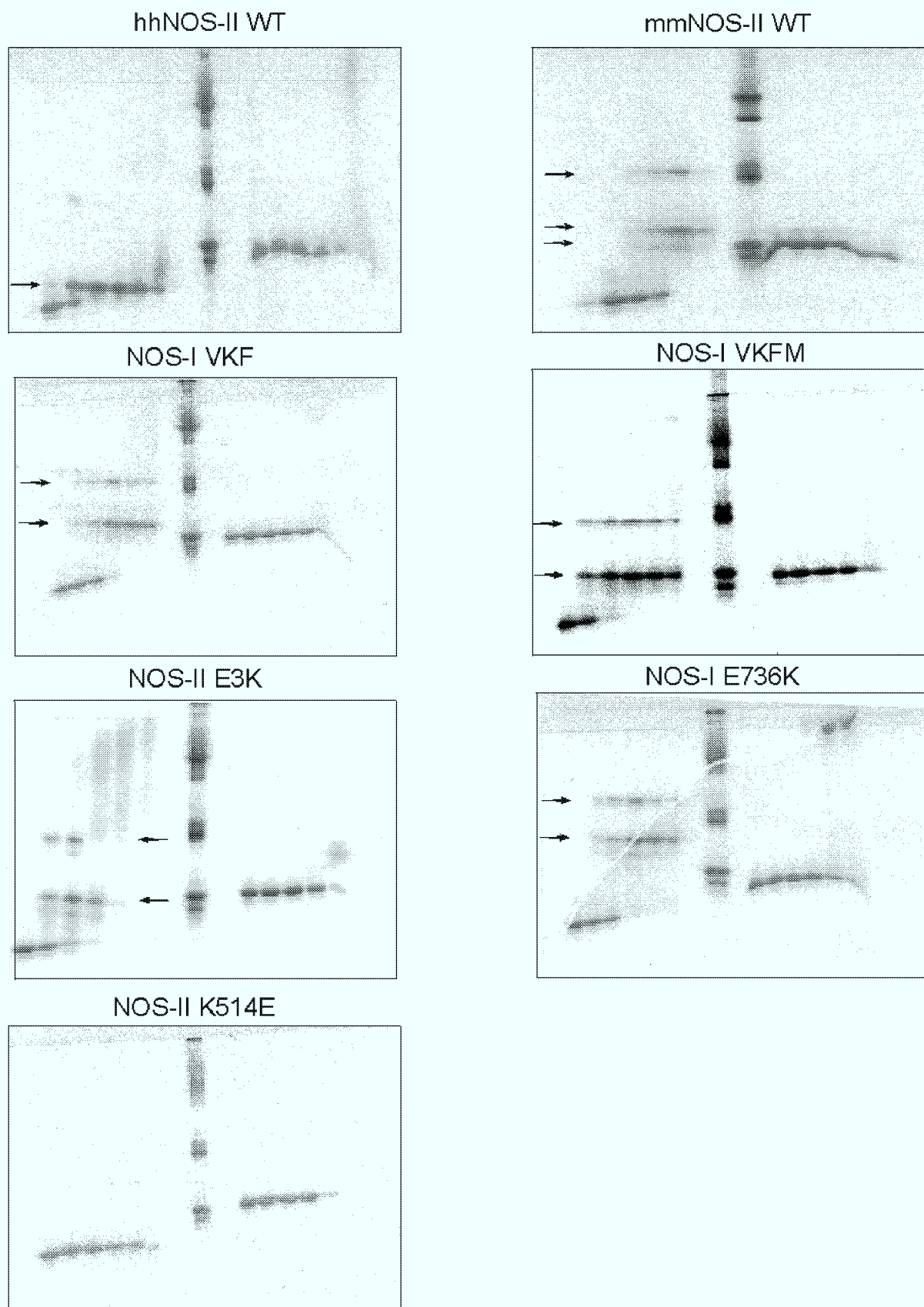


Abb. 5.2: Beschreibung auf der folgenden Seite.

Abb. 5.2 (vorhergehende Seite): Gelshiftexperimente mit den restlichen Peptiden. Auf jedem Gel wurden links die Ansätze mit Ca^{2+} und rechts die mit EGTA aufgetragen. Das Verhältnis Peptid:CaM betrug jeweils von links nach rechts 0, 0,5, 1, 2,5, 5 und 10. In der Mitte wurde ein LMW-Größenmarker aufgetragen. Die Banden mit verminderter, elektrophoretischer Mobilität sind mit Pfeilen markiert. Für alle Peptide außer NOS-II K514E sind deutliche Shifts zu erkennen. Mit Ausnahme von hhNOS-II WT zeigen die Peptide verschieden große Shifts, die von Komplexen mit unterschiedlicher Stöchiometrie verursacht werden. Bei den Peptiden hhNOS-II WT und NOS-I E736K sieht man, daß sich in Abwesenheit von Ca^{2+} bei einem hohen Verhältnis von Peptid:CaM große, unspezifische Komplexe bilden, die z.T. in den Gelslots liegen bleiben.

5.2 Beispiele für Scatchard- und EC_{50} -Plots aus den SPR-Messungen

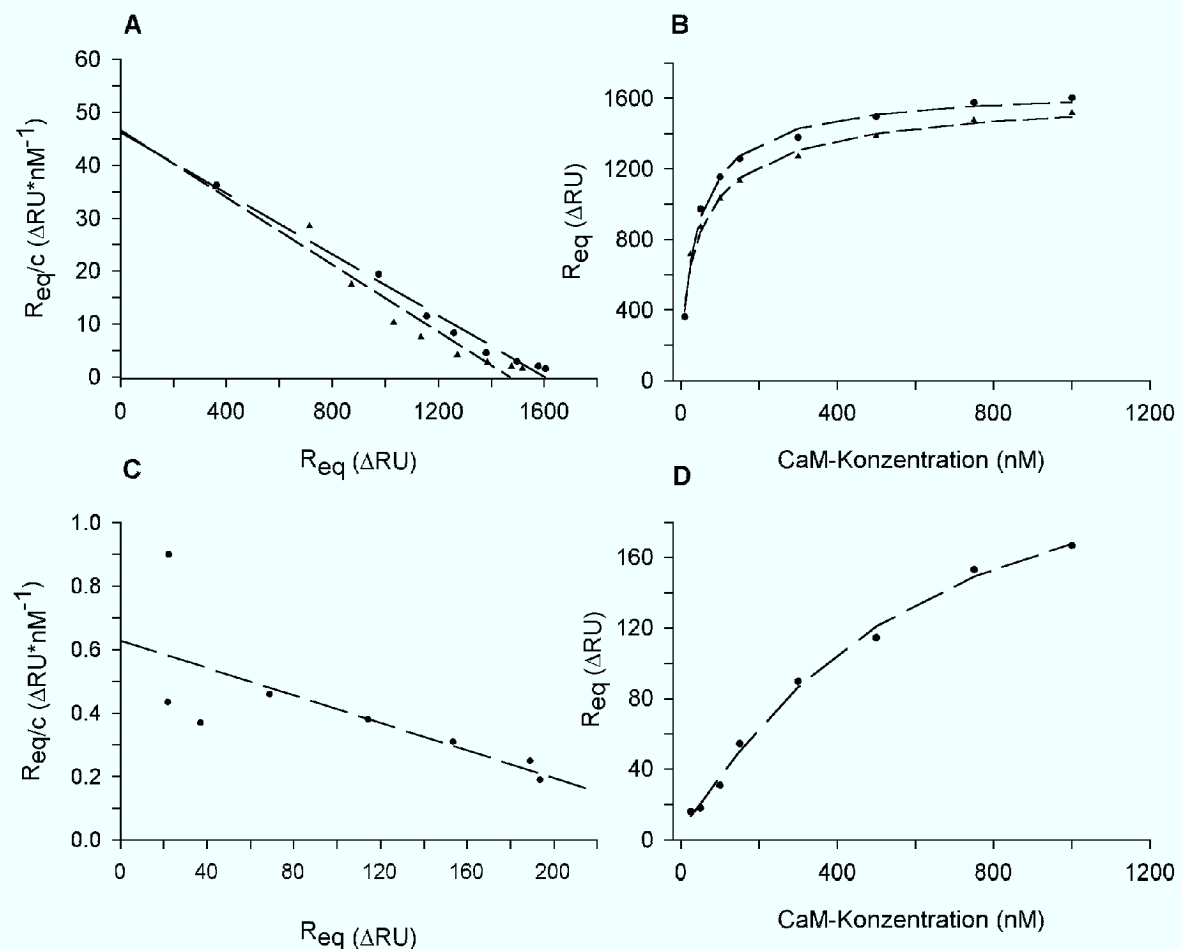


Abb. 5.3: **A** Scatchard-Plot einer Doppelmessung mit NOS-I WT ($\text{ID} = 401 \text{ fmol/mm}^2$). **B** EC_{50} -Plot einer Doppelmessung mit NOS-I WT ($\text{ID} = 401 \text{ fmol/mm}^2$). **C** Scatchard-Plot einer Messung mit NOS-I VFM ($\text{ID} = 1050 \text{ fmol/mm}^2$). Die Messungen mit den drei niedrigsten CaM-Konzentrationen wiesen große Störungen auf. **D** EC_{50} -Plot einer Messung mit NOS-I VFM ($\text{ID} = 1050 \text{ fmol/mm}^2$). Alle Messungen fanden bei einer Flußrate von $5 \mu\text{l/min}$ in Ca^{2+} -Puffer statt.

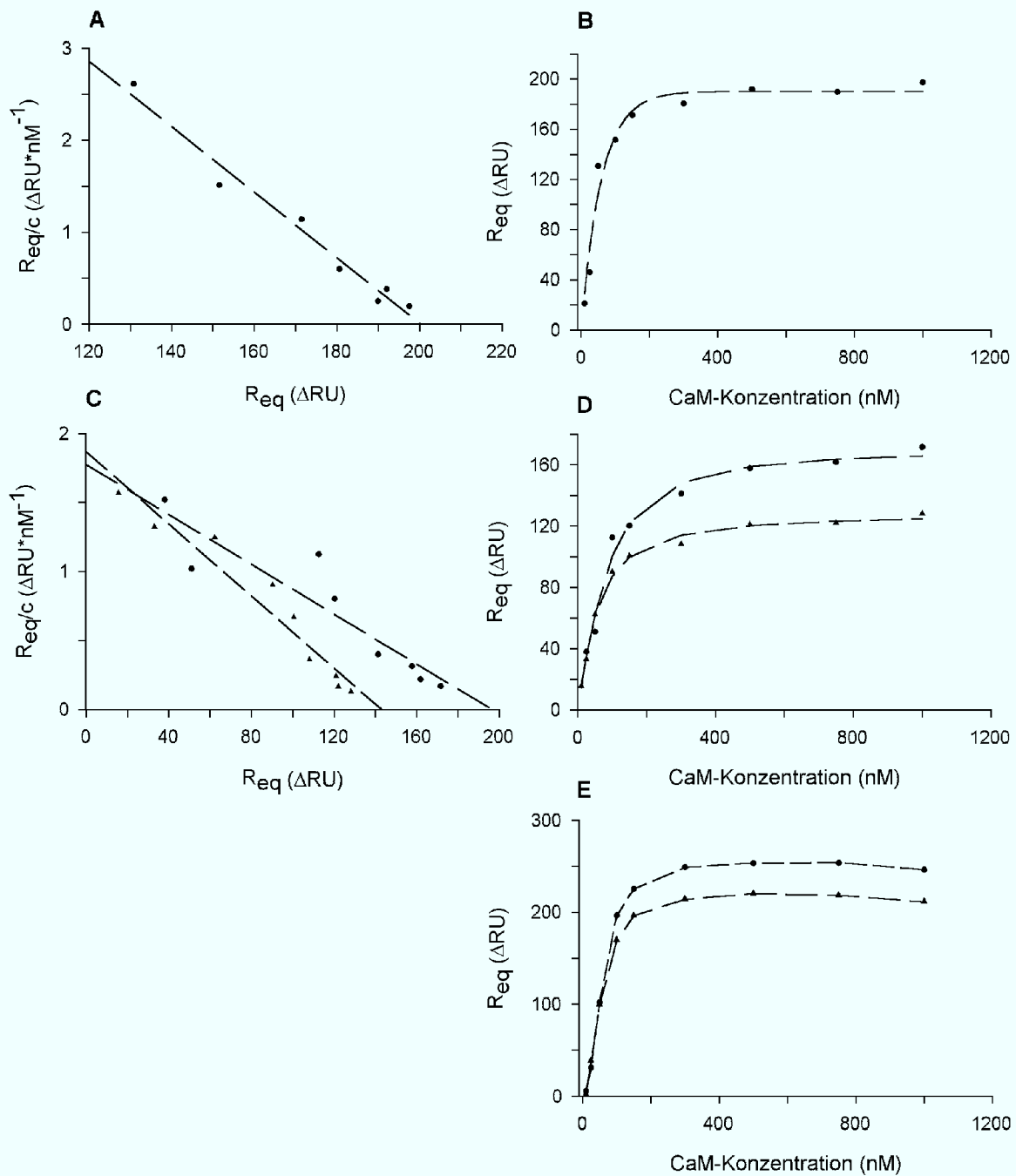


Abb. 5.4: **A** Scatchard-Plot einer Messung mit NOS-I VKF (ID = 80 fmol/mm²). **B** EC₅₀-Plot einer Messung mit NOS-I VKF (ID = 80 fmol/mm²). **C** Scatchard-Plot einer Doppelmessung mit NOS-I VKFM (ID = 1020 fmol/mm²). **D** EC₅₀-Plot einer Doppelmessung mit NOS-I VKFM (ID = 1020 fmol/mm²). **E** EC₅₀-Plot einer Doppelmessung mit NOS-I E736K (ID = 43 fmol/mm²). Ein Scatchard-Plot konnte nicht erstellt werden. Alle Messungen fanden bei einer Flußrate von 5 µl/min in Ca²⁺-Puffer statt.

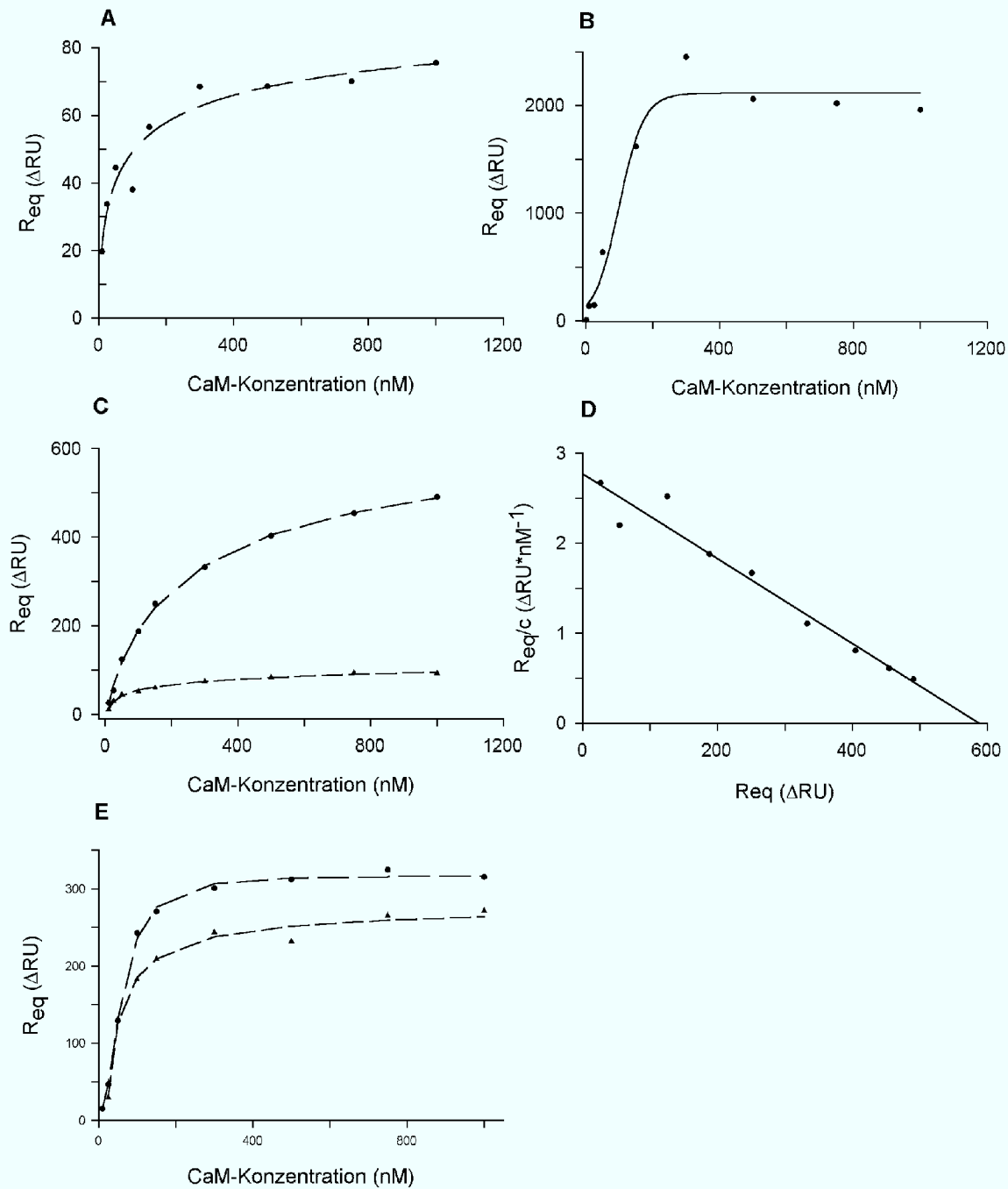


Abb. 5.5: **A** EC₅₀-Plot einer Messung mit NOS-II V511K (ID = 330 fmol/mm²). **B** EC₅₀-Plot einer Messung mit NOS-II 3K (ID = 140 fmol/mm²). **C** EC₅₀-Plot zweier Messungen mit NOS-II F517K (ID = 800 fmol/mm²). Die Amplituden der Messungen unterschieden sich sehr stark. **D** Scatchard-Plot einer Messung mit NOS-II F517K (ID = 800 fmol/mm²). **E** EC₅₀-Plot einer Doppelmessung mit NOS-II E3K (ID = 127 fmol/mm²). Ein Scatchard-Plot konnte für NOS-II V511K, 3K und E3K nicht erstellt werden. Alle Messungen fanden bei einer Flußrate von 5 µl/min in Ca²⁺-Puffer statt.

5.3 Hydrophobizität und Amphiphilie der Peptide

Die Hydrophobizität und Amphiphilie der Peptide wurden nach EISENBERG et al. (1982 und 1982b) berechnet. Dazu wurde die normalisierte Hydrophobizität der einzelnen Aminosäuren (Tab. 5.1) nach EISENBERG et al. (1984) verwendet.

Tab. 5.1: Normalisierte Hydrophobizität der einzelnen Aminosäuren nach EISENBERG et al. (1984).

Aminosäure	normalisierte Hydrophobizität	Aminosäure	normalisierte Hydrophobizität
Arginin	-2,53	Tyrosin	0,26
Lysin	-1,50	Cystein	0,29
Aspartat	-0,90	Glycin	0,48
Glutamin	-0,85	Alanin	0,62
Asparagin	-0,78	Methionin	0,64
Glutamat	-0,74	Tryptophan	0,81
Histidin	-0,40	Leucin	1,06
Serin	-0,18	Valin	1,08
Threonin	-0,05	Phenylalanin	1,19
Prolin	0,12	Isoleucin	1,38

Die Hydrophobizität (Hb) wurde nach Formel (1) berechnet, wobei i die Hydrophobizität der i -ten Aminosäure ist und n die Anzahl der Aminosäuren. Die Amphiphilie (μH) wurde nach Gleichung (2) berechnet.

$$Hb = \left(\sum_{i=1}^n Hbi \right) / n \quad (1)$$

$$\mu H = \left[\left(\left[\sum_{i=1}^n Hbi \sin(100^\circ i) \right]^2 + \left[\sum_{i=1}^n Hbi \cos(100^\circ i) \right]^2 \right)^{\frac{1}{2}} \right] / n \quad (2)$$

Damit ergaben sich für die verwendeten Peptide folgende Werte für Hb und μH :

Tab. 5.2: Hydrophobizität und Amphiphilie der NOS-I-Peptide, sortiert nach Hydrophobizität.

Peptid	Hb (Hydrophobizität)	μH (Amphiphilie)
NOS-I E736K	-0,221	0,346
NOS-I WT	-0,195	0,352
NOS-I VKF	-0,064	0,277
NOS-I VKFM	0,007	0,410
NOS-I VFM	0,032	0,576

Tab. 5.3: Hydrophobizität und Amphiphilie der NOS-II-Peptide, sortiert nach Hydrophobizität.

Peptid	Hb (Hydrophobizität)	μH (Amphiphilie)
NOS-II 3K	-0,419	2,391
NOS-II E3K	-0,389	2,689
NOS-II F517K	-0,237	4,725
NOS-II V511K	-0,233	4,172
NOS-II M521K	-0,216	4,421
NOS-II K514E	-0,104	6,255
mmNOS-II WT	0,134	5,725
hhNOS-II WT	0,362	1,140

6 Literaturverzeichnis

- ABU-SOUD, H.M., Stuehr, D.J. (1993): Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10769-10772.
- ABU-SOUD, H.M., Rousseau, D.L., Stuehr, D.J. (1996): Nitric oxide binding to the heme of neuronal nitric-oxide synthase links its activity to changes in oxygen tension, *J. Biol. Chem.* **271**, 32515-32518.
- ANAGLI, J., Hofmann, F., Quadroni, M., Vorherr, T., Carafoli, E. (1995): The calmodulin-binding domain of the inducible (macrophage) nitric oxide synthase, *Eur. J. Biochem.* **233**, 701-708.
- ANDREASEN, T.J., Luetje, C.W., Heideman, W., Storm, D.R. (1983): Purification of a novel calmodulin binding protein from bovine cerebral cortex membranes, *Biochemistry* **22**, 4615-4618.
- BABU, Y.S., Sack, J.S., Greenhough, T.J., Bugg, C.E., Means, A.R., Cook, W.J. (1985): Three-dimensional structure of calmodulin, *Nature* **315**, 37-40.
- BABU, Y.S., Bugg, C.E., Cook, W.J. (1988): Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution, *J. Mol. Biol.* **204**, 191-204.
- BIAcore Methods Manual (1991); BIAevaluation version 3.0, software handbook, BIAcore (1997)
- BIRNBOIM, H.C., Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- BRADFORD, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- BREDT, D.S., Snyder, S.H. (1989): Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9030-9033.
- BREDT, D.S., Snyder, S.H. (1990): Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 682-685.
- BREDT, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, R.R., Snyder, S.H. (1991): Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P₄₅₀ reductase, *Nature* **351**, 714-718.
- BRENNAN, J.E., Chao, D.S., Gee, S.H., McGee, A.W., Craven, S.E., Santillano, D.R., Wu, Z.Q., Huang, F., Wia, H.H., Peters, M.F., Froehner, S.C., Bredt, D.S. (1996): Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha 1-syntrophin mediated by PDZ domains, *Cell* **84**, 757-767.
- BROKX, R.D., Lopez, M.M., Vogel, H.J., Makhatadze, G.I. (2001): Energetics of target peptide binding by calmodulin reveals different modes of binding, *J. Biol. Chem.* **276**, 14083-14091.
- BURGOYNE, R.D., Weiss, J.L. (2001): The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins, *Biochem. J.* **353**, 1-12.
- BUSCONI, L., Michel, T. (1993): Endothelial nitric oxide synthase – N-terminal myristoylation determines subcellular localization, *J. Biol. Chem.* **268**, 8410-8413.

-
- CHAN, W. (1968): A method for the complete S-sulfonation of cysteine residues in proteins, *Biochemistry* **12**, 4247-4253.
- CHEN, C., Okayama, H. (1987): High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA, *Mol. and Cell. Biol.* **7**, 2745-2752.
- CHO, H.J., Xie, Q.-W., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Nathan, C. (1992): Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages, *J. Exp. Med.* **176**, 599-604.
- CHOI, K.Y., Kim, H.K., Lee, S.Y., Moon, K.H., Sim, S.S., Kim, J.W., Ching, H.K., Rhee, S.G. (1990): Molecular cloning and expression of a complementary DNA for inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase, *Science* **248**, 64-66.
- CLAPHAM, D.E. (1995): Calcium signalling, *Cell* **80**, 259-268.
- COHEN, P., Burchell, A., Foulkes, J.G., Cohen, P.T.W., Vanaman, T.C., Nairn, A.C. (1978): Identification of the Ca^{2+} -dependent modulator protein as the fourth subunit of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase, *FEBS Lett.* **92**, 287-293.
- COHEN, P., Klee, C.B. (1988): Calmodulin, *Molecular aspects of cellular regulation* **5**, Elsevier, Amsterdam.
- COMTE, M., Maulet, M., Cox, J.A. (1983): Ca^{2+} -dependent high-affinity complex formation between calmodulin and melittin, *Biochem. J.* **209**, 269-272.
- COX, J.A., Comte, M., Fitton, J.E., DeGrado, W.F. (1985): The interaction of calmodulin with amphiphilic peptides, *J. Biol. Chem.* **260**, 2527-2534.
- CRANE, B.R., Arvai, A.S., Ghosh, D.K., Wu, C., Getzoff, E.D., Stuehr, D.J., Tainer, J.A. (1998): Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate, *Science* **279**, 2121-2126.
- CRIVICI, A., Ikura, M. (1995): Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**, 85-116.
- DAFF, S., Sagami, I., Shimizu, T. (1999): The 42-amino acid insert in the FMN domain of neuronal nitric-oxide synthase exerts control over Ca^{2+} /calmodulin-dependent electron transfer, *J. Biol. Chem.* **274**, 30589-30595.
- DASGUPTA, M., Honeycutt, T., Blumenthal, D.K. (1989): The γ -subunit of skeletal muscle phosphorylase kinase contains two noncontiguous domains that act in concert to bind calmodulin, *J. Biol. Chem.* **264**, 17156-17163.
- DEDIO, J., König, P., Wohlfahrt, P., Schroeder, C., Kummer, W., Müller-Esterl, W. (2001): NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity, *FASEB J.* **15**, 79-89.
- DEGRADO, W.F., Prendergast, F., Wolfe, H.R., Cox, J.A. (1985): The design, synthesis, and characterization of tight-binding inhibitors of calmodulin, *J. Cell. Biochem.* **29**, 83-93.
- DIMMELER, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., Zeiher, A.M. (1999): Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by akt-dependent phosphorylation, *Nature* **399**, 601-604.
- DOYLE, M. (1997): Characterization of binding interactions by isothermal titration calorimetry, *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 31-35.

-
- EISENBERG, D., Weiss, R.M., Terwilliger, T.C. (1982): The helical hydrophobic moment: A measure of the amphiphilicity of a helix, *Nature* **299**, 371-374.
- EISENBERG, D., Weiss, R.M., Terwilliger, T.C., Wilcox, W. (1982b): Hydrophobic moments and protein structure, *Faraday Symp. Chem. Soc.* **17**, 109-120.
- EISENBERG, D., Schwarz, E., Komaromy, M., Wall, R. (1984): Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot, *J. Mol. Biol.* **179**, 125-142.
- ERICKSON-VIITANEN, S., DeGrado, W.F. (1987): Recognition and characterization of calmodulin-binding sequences in peptides and proteins, *Meth. Enzymol.* **139**, 455-478.
- FELDMAN, P.L., Griffith, O.W., Stuehr, D.J. (1993): The surprising life of nitric oxide, *C&EN special report*, 20. December, 26-38.
- FINN, B.E., Evenäs, J., Drakenberg, T., Waltho, J.P., Thulin, E., Forsén, S. (1995): Calcium-induced structural changes and domain autonomy in calmodulin, *Nat. Struct. Biol.* **2**, 777-783.
- FISCHER, T., Beyermann, M., Koch, K.-W. (2001): Application of different surface plasmon resonance biosensor chips to monitor the interaction of the CaM-binding site of nitric oxide synthase I and calmodulin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 463-469.
- FISHER, H.F., Singh, N. (1995): Calorimetric methods for interpreting protein-ligand interactions, *Meth. Enzymol.* **259**, 194-221.
- FUKADA, H., Takahashi, K. (1998): Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1M potassium chloride, *Proteins* **33**, 159-166.
- GARCIA-CARDENA, G., Oh, P., Liu, J., Schnitzer, J.S., Sessa, W.C. (1996): Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: Implications for nitric oxide signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6448-6453.
- GARCIA-CARDENA, G., Fan, R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirino, G., Papapetropoulos, A., Sessa, W.C. (1998): Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90, *Nature* **392**, 821-824.
- GARTHWAITE, J., Garthwaite, G., Palmer, R.M., Moncada, S. (1989): NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices, *Eur. J. Pharmacol.* **172**, 413-416.
- GELLER, D.A., Lowenstein, C.J., Shapiro, R.A., Nussler, A.K., Di Silvio, M., Wang, S.C., Nakayama, D.K., Simmons, R.L., Snyder, S.H., Billiar, T.R. (1993): Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3491-3495.
- GELLMAN, S.H. (1991): On the role of methionine residues in the sequence-independent recognition of nonpolar protein surfaces, *Biochemistry* **30**, 6633-6636.
- GERSHONI, M.J., Palade, G.E. (1982): Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gels to a positively charged membrane filter, *Anal. Biochem.* **124**, 396-405.
- GHOSH, K.D., Crane, B.R., Ghosh, S., Wolan, D., Gachhui, R., Crooks, C., Presta, A., Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Stuehr, D.J. (1999): Inducible nitric oxide synthase: role of the N-terminal β -hairpin hook and pterin-binding segment in dimerization and tetrahydrobiopterin interaction, *EMBO J.* **18**, 6260-6270.

- GILLI, R., Lafitte, D., Lopez, C., Kilhoffer, M.-C., Makarov, A., Briand, C., Haiech, J. (1998): Thermodynamic analysis of calcium and magnesium binding to calmodulin, *Biochemistry* **37**, 5450-5456.
- GORETSKI, J., Hollocher, T.C. (1988): Trapping of nitric oxide produced during denitrification by extracellular hemoglobin, *J. Biol. Chem.* **263**, 2316-2323.
- GRAY-KELLER, M.P., Polans, A.S., Palczewski, K., Detwiler, P.B. (1993): The effect of recoverin-like calcium binding proteins on the photoresponse of retinal rods, *Neuron* **10**, 523-531.
- GRIFFITH, O.W., Stuehr, D.J. (1995): Nitric oxide synthases: Properties and catalytic mechanism, *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 707-736.
- HEERY, D.M., Gannon, F., Porwell, R. (1990): A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices, *Trends Gen.* **6**, 173.
- HEMMENS, B., Mayer, B. (1998): Enzymology of nitric oxide synthases, *Methods in Molecular Biology* **100**, Nitric Oxide Protocols (edited by M.A. Thithradge, Humana Press), p.8.
- HOPE, B.T., Michael, G.J., Knigge, K.M., Vincent, S.R. (1991): Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2811-2814.
- HOUDUSSE, A., Cohen, C. (1995): Target sequence recognition by the calmodulin superfamily: Implication from light chain binding to the regulatory domain of scallop myosin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10644-10647.
- HOUDUSSE, A., Silver, M., Cohen, C. (1996): A model of Ca^{2+} -free calmodulin binding to unconventional myosins reveals how calmodulin acts as a regulatory switch, *Structure* **4**, 1475-1490.
- IGNARRO, L.J., Degnan, J.N., Baricos, W.H., Kadowitz, P.J., Wolin, M.S. (1982): Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung, *Biochim. Biophys. Acta* **718**, 49-59.
- IGNARRO, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., Chaudhuri, G. (1987): Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 9265-9269.
- IKURA, M., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Zhu, G., Klee, C.B., Bax, A. (1992): Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR, *Science* **256**, 632-638.
- IKURA, M. (1996): Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins, *TIBS* **21**, 14-17.
- JAFFREY, S.R., Snyder, S.H. (1996): PIN: An associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase, *Science* **274**, 774-777.
- JAFFREY, S.R., Snowman, A.M., Eliasson, M.J.L., Cohen, N.A., Snyder, S.H. (1998): CAPON: A protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95, *Neuron* **20**, 115-124.
- JÖNSSON, U., Fägerstam, F., Ivarsson, B., Johnsson, B., Karlsson, R., Kundh, K., Löfås, S., Persson, B., Roos, H., Rönnerberg, I., Sjölander, S., Stenberg, E., Ståhlberg, R., Urbaniczky, C., Östlin, H., Malmqvist, M. (1991): Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology, *BioTechniques* **11**, 620-627.

-
- JURADO, L.A., Chockalingam, P.S., Jarrett, H.W. (1999): Apocalmodulin, *Physiological Reviews* **79**, 661-682.
- KARLSSON, R., Roos, H., Fagerstam, L., Persson, B. (1994): Kinetic and concentration analysis using BIA technology, *Methods* **6**, 99-110.
- KAWAMURA, S. (1993): Rhodopsin phosphorylation as a mechanism of cyclic GMP phosphodiesterase regulation by S-modulin, *Nature* **362**, 855-857.
- KNOWLES, R.G., Salter, M. (1998): Measurement of NOS activity by conversion of radiolabeled arginine to citrulline using ion-exchange separation, *Methods in Molecular Biology* **100**, Nitric Oxide Protocols (edited by M.A. Thithradge, Humana Press), 67-73.
- KRETSINGER, R.H., Nockolds, C.E. (1973): Carp muscle calcium-binding protein II. Structure determination and general description, *J. Biol. Chem.* **248**, 3313-3326.
- KUBONIWA, H., Tjandra, N., Grzesiek, S., Ren, H., Klee, C.B., Bax, A. (1995): Solution structure of calcium-free calmodulin, *Nat. Struct. Biol.* **2**, 768-776.
- KWON, N.S., Nathan, C.F., Gilker, C., Griffith, O.W., Matthews, D.E., Stuehr, D.J. (1990): L-citrulline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase. The ureido oxygen derives from dioxygen, *J. Biol. Chem.* **265**, 13442-13445.
- KYHSE-ANDERSEN, J. (1984): Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for a rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J. Biochem. Biophys. Meth.* **10**, 203-209.
- LAEMMLI, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685.
- LAPORTE, D.C., Wierman, B.M., Storm, D.R. (1980): Calcium-induced exposure of a hydrophobic surface on calmodulin, *Biochemistry* **19**, 3814-3819.
- LEE, C.M., Robinson, L.J., Michel, T. (1995): Oligomerization of endothelial nitric oxide synthase. Evidence for a dominant negative effect of truncation mutants, *J. Biol. Chem.* **270**, 27403-27406.
- LIU, J., Garcia-Cardena, G., Sessa, W.C. (1995): Biosynthesis and palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase: Mutagenesis of palmitoylation sites, cysteines-15 and/or -26, argues against depalmitoylation-induced translocation of the enzyme, *Biochemistry* **34**, 12333-12340.
- LÖFÄS, S., Johnsson, B. (1990): A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1526-1528.
- LÖFÄS, S., Johnsson, B., Edström, Å., Hansson, A., Lindquist, G., Müller Hillgren, R-M., Stigh, L. (1995): Methods for site controlled coupling to carboxymethyldextran surfaces in surface plasmon resonance sensors, *Biosens. Bioelectron.* **10**, 813-822.
- MAKHATADZE, G.I., Privalov, P.L. (1995): Energetics of protein structure, *Adv. Protein. Chem.* **47**, 307-425.
- MALENCIK, D.A., Anderson, S. (1983): High affinity binding of the mastoparans by calmodulin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **114**, 50-56.
- MANDEL, M. & Higa, A. (1970): Calcium-dependent bacteriophage DNA infection, *J. Mol. Biol.* **53**, 159-162.

-
- MATSUBARA, M., Hayashi, N., Titani, K., Taniguchi, H. (1997): Circular dichroism and ^1H NMR studies on the structures of peptides derived from the calmodulin-binding domains of inducible and endothelial nitric-oxide synthase in solution and in complex with calmodulin, *J. Biol. Chem.* **272**, 23050-23056.
- MAYER, B., John, M., Böhme, E. (1990): Purification of a Ca^{2+} /calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum, *FEBS Lett.* **277**, 215-219.
- MEANS, A.R., Tash, J.S., Chafouleas, J.G. (1982): Physiological implications of the presence, distribution, and regulation of calmodulin in eukaryotic cells, *Physiol. Rev.* **62**, 1-39.
- MEYER, T.S., Lamberts, B.L. (1965): Use of coomassie brilliant blue R 250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips, *Biochem. Biophys. Acta* **107**, 144-145.
- MICHEL, J.B., Feron, O., Sase, K., Prabhakar, P., Michel, T. (1997): Caveolin versus calmodulin, *J. Biol. Chem.* **272**, 25907-25912.
- MIRZOEVA, S., Weigand, S., Lukas, T.J., Shuvalova, L., Anderson, W.F., Watterson, D.M. (1999): Analysis of the functional coupling between calmodulin's calcium binding and peptide recognition properties, *Biochemistry* **38**, 3936-3947.
- MONTIGIANI, S., Neri, G., Neri, P., Neri, D. (1996): Alanine substitutions in calmodulin-binding peptides result in unexpected affinity enhancement, *J. Mol. Biol.* **258**, 6-13.
- MOORTHY, A.K., Gopal, B., Satish, P.R., Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., Murthy, M.R.N., Surolia, A. (1999): Thermodynamics of target peptide recognition by calmodulin and a calmodulin analogue: Implication for the role of the central linker, *FEBS Lett.* **461**, 19-24.
- MULLIS, K.B., Faloona, F.A., Schar, S., Saiki, R., Horn, G., Ehrlich, H. (1986): Specific amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-273.
- MUNSHI, H.G., Burks, D.J., Joyal, J.L., White, M.F., Sacks, D.B. (1996): Ca^{2+} regulates calmodulin binding to IQ-motifs in IRS-1, *Biochemistry* **35**, 15883-15889.
- MYSZKA, D.G. (1997): Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors, *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 50-57.
- MYSZKA, D.G., He, X., Dembo, M., Morton, T.A., Goldstein, B. (1998): Extending the range of rate constants available from BIACORE: Interpreting mass transport-influenced binding data, *Biophys. J.* **75**, 583-594.
- NAKANE, M., Schmidt, H.H.H.W., Pollock, J.S., Förstermann, U., Murad, F. (1993): Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle, *FEBS Lett.* **316**, 175-180.
- NEWBELL, B.J., Anderson, J.T., Jarrett, H.W. (1997): Ca^{2+} -calmodulin binding to mouse $\alpha 1$ syntrophin: syntrophin is also a Ca^{2+} -binding protein, *Biochemistry* **36**, 1295-1305.
- NISHIDA, C.R., Ortiz de Montellano, P.R. (1999): Autoinhibition of endothelial nitric-oxide synthase, *J. Biol. Chem.* **274**, 14692-14698.
- NISHIMURA, J.S., Martasek, P., McMillan, K., Salerno, J.C., Liu, Q., Gross, S.S., Masters, B.S.S. (1995): Modular structure of neuronal nitric oxide synthase: Localization of the arginine binding site and modulation by pterin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**, 288-294.

-
- O'SHANNESY, D.J. (1994): Determination of kinetic rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions: A critique of the surface plasmon resonance literature, *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**, 65-71.
- O'SHANNESY, D.J., Brightam-Burke, M., Soneson, K.K., Hensley, P., Brooks, I. (1994): Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions by surface plasmon resonance, *Meth. Enzymol.* **240**, 323-349.
- PALMER, R.M., Ferrige, A.G., Moncada, S. (1987): Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature* **327**, 524-526.
- PECHERE, J.F., Derancourt, J., Haiech, J. (1977): The participation of parvalbumins in the activation-relaxation cycle of vertebrate fast skeletal-muscle, *FEBS Lett.* **75**, 111-114.
- PERSECHINI, A., Moncrief, N.D., Kretsinger, R.H. (1989): The EF-hand family of calcium-modulated protein, *Trends Neurosci.* **12**, 462-467.
- POZZAN, T., Rizzuto, R., Volpe, P., Meldolesi, J. (1994): Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores, *Physiol. Rev.* **74**, 595-636.
- RADOMSKI, M.W., Palmer, R.M., Monacada, S. (1990): An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5193-5197.
- RATOVITSKI, E.A., Bao, C., Quick, R.A., McMillan, A., Kozlovsky, C., Lowenstein, C.J. (1999): An inducible nitric-oxide synthase (NOS)-associated protein inhibits NOS dimerization and activity, *J. Biol. Chem.* **274**, 30250-30257.
- RHOADS, A.R., Friedberg, F. (1997): Sequence motifs for calmodulin recognition, *FASEB J.* **11**, 331-340.
- RODRIGUEZ-CRESPO, I., Gerber, N.C., Ortiz de Montellano, P.R. (1996): Endothelial nitric-oxide synthase. Expression in *Escherichia coli*, spectroscopic characterization, and role of tetrahydrobiopterin in dimer formation, *J. Biol. Chem.* **271**, 11462-11467.
- RUAN, J., Xie, Q.-W., Hutchinson, N., Cho, H., Wolfe, G.C., Nathan, C. (1996): Inducible nitric oxide synthase requires both the canonical calmodulin-binding domain and additional sequences in order to bind calmodulin and produce nitric oxide in the absence of free Ca^{2+} , *J. Biol. Chem.* **271**, 22679-22686.
- SALERNO, J.C., Harris, D.E., Irizarry, K., Patel, B., Morales, A.J., Smith, S.M.E., Martasek, P., Roman, L.J., Masters, B.S.S., Jones, C.L., Weissman, B.A., Lane, P., Liu, Q., Gross, S.S. (1997): An autoinhibitory control element defines calcium-regulated isoforms of nitric oxide synthase, *J. Biol. Chem.* **272**, 19769-19777.
- SANGER, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- SCHIFFER, M., Edmundson, A.B. (1967): Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential, *Biophys. J.* **7**, 121-135.
- SCHMIDT, H.H.H.W., Murad, F. (1991): Purification and characterization of a human NO synthase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 1372-1377.
- SCHMIDT, H.H.H.W., Pollock, J.S., Nakane, M., Gorsky, L.D., Förstermann, U., Murad, F. (1991b): Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 365-369.

- SCHMIDT, H.H.H.W., Walter, U. (1994): NO at work, *Cell* **78**, 919-925.
- SCHMIDT, H.H.H.W. (1995): Determination of nitric oxide via measurement of nitrite and nitrate in culture media, *Biochemica Information* **96**, 20-21.
- SCHUCK, P., Minton, A.P. (1996): Kinetic analysis of biosensor data: elementary tests for self-consistency, *Trends Biochem. Sci.* **21**, 458-460.
- SCHUCK, P. (1997): Use of surface plasmon resonance to probe the equilibrium and dynamic aspects of interactions between biological macromolecules, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**, 541-566.
- SIDDHANTA, U., Presta, A., Fan, B., Wolan, D., Rousseau, D.L., Stuehr, D.J. (1998): Domain swapping in inducible nitric oxide synthase. Electron transfer occurs between flavin and heme groups located on adjacent subunits in the dimer, *J. Biol. Chem.* **273**, 18950-18958.
- SMITH, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goetze, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
- SNEDDON, J.M., Vane, J.R. (1988): Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2800-2804.
- SOMLYO, A.V., Gonzalez-Serratos, H.G., Shuman, H., McClellan, G., Somlyo, A.P. (1981): Calcium release and ionic changes in the sarcoplasmic reticulum of tetanized muscle: An electron-probe study, *J. Cell. Biol.* **90**, 577-594.
- SONG, Y., Zweier, J.L., Xia, Y. (2001): Heat-shock protein 90 augments neuronal nitric oxide synthase activity by enhancing Ca^{2+} /calmodulin binding, *Biochem. J.* **355**, 357-360.
- STEVENS-TRUSS, R., Marletta, M.A. (1995): Interaction of calmodulin with the inducible murine macrophage nitric oxide synthase, *Biochemistry* **34**, 15638-15645.
- STOSCHECK, C.M. (1990): Guide to protein purification, *Meth. Enzym.* **182**, Academic Press, pp. 50.
- STUEHR, D.J., Cho, H.J., Kwon, N.S., Weise, M.F., Nathan, C.F. (1991): Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7773-7777.
- STUEHR, D.J., Kwon, N.S., Nathan, C.F., Griffith, O.W., Feldman, P.L., Wieseman, J. (1991b): N omega-hydroxyl-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine, *J. Biol. Chem.* **266**, 6259-6263.
- SWINDELLS, M.B., Ikura, M. (1996): Pre-formation of the semi-open conformation by the Apocalmodulin C-terminal domain and implications for binding IQ-motifs, *Nat. Struct. Biol.* **3**, 501-504.
- SZABO, A., Stolz, L., Granzow, R. (1995): Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA), *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 699-705.
- TAKANO, E., Hatanaka, M., Maki, M. (1994): Real-time analysis of the calcium-dependent interaction between calmodulin and a synthetic oligopeptide of calcineurin by a surface plasmon resonance biosensor, *FEBS Lett.* **352**, 247-250.

- TEICHERT, A.-M., Karantzoulis-Fegaras, F., Wang, Y., Mawji, I.A., Bei, X., Gnanapandithen, K., Marsden, P.A. (1998): Characterization of the murine endothelial nitric oxide synthase promoter, *Biochim. Biophys. Acta.* **1443**, 352-357.
- TSIEN, R.W., Tsiens, R.Y. (1990): Calcium-channels, stores and oscillations, *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 715-760.
- TSVETKOV, P.O., Protasevich, I.I., Gilli, R., Lafitte, D., Lobachov, V.M., Haiech, J., Briand, C., Makarov, A.A. (1999): Apocalmodulin binds to the myosin light chain kinase calmodulin target site, *J. Biol. Chem.* **274**, 18161-18164.
- TWELKER, P. (1998): Charakterisierung von punktmutierten Calmodulin-Bindungsdomänen in Stickoxidsynthasen, *Diplomarbeit, IBI-1, Forschungszentrum Jülich*.
- URBAUER, J.L., Short, J.H., Dow, L.K., Wand, A.J. (1995): Structural analysis of a novel interaction by calmodulin: High-affinity binding of a peptide in the absence of calcium, *Biochemistry* **34**, 8099-8109.
- VENEMA, R.C., Sayegh, H.S., Kent, J.D., Harrison, D.G. (1996): Identification, characterization, and comparison of the calmodulin-binding domain of the endothelial and inducible nitric oxide synthases, *J. Biol. Chem.* **271**, 6435-6440.
- VORHERR, T., Knöpfel, L., Hofmann, F., Mollner, S., Pfeuffer, T., Carafoli, E. (1993): The calmodulin binding domain of nitric oxide synthase and adenylyl cyclase, *Biochemistry* **32**, 6081-6088.
- WANG, M., Roberts, D.L., Paschke, R., Shea, T.M., Masters, B.S., Kim, J.J. (1997): Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8411-8416.
- WATANABE, Y., Hu, Y., Hidaka, H. (1997): Identification of a specific amino acid cluster in the calmodulin-binding domain of the neuronal nitric oxide synthase, *FEBS Lett.* **403**, 75-78.
- WEINSTEIN, H., Mehler, E.L. (1994): Ca²⁺-binding and structural dynamics in the functions of calmodulin, *Ann. Rev. Physiol.* **56**, 213-236.
- WEITZ, D., Zoche, M., Müller, F., Beyermann, M., Körschen, H.G., Kaupp, U.B., Koch, K.W. (1998): Calmodulin controls the rod photoreceptor CNG channel through an unconventional binding site in the N-terminus of the β -subunit, *EMBO J.* **17**, 2273-2284.
- WINTRODE, P.L., Privalov, P.L. (1997): Energetics of target peptide recognition by calmodulin: A calorimetric study, *J. Mol. Biol.* **266**, 1050-1062.
- WISEMAN, T., Williston, S., Brandts, J.F., Lin, L.-N. (1989): Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter, *Anal. Biochem.* **179**, 131-137.
- XIE, Q.-W., Cho, H.J., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Ding, A., Troso, T., Nathan, C. (1992): Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages, *Science* **256**, 225-228.
- YUAN, T., Vogel, H.J., Sutherland, C., Walsh, M.P. (1998): Characterization of the Ca²⁺-dependent and -independent interactions between calmodulin and its binding domain of inducible nitric oxide synthase, *FEBS Lett.* **431**, 210-214.
- ZHANG, M., Vogel, H.J. (1994): Characterization of the calmodulin-binding domain of rat cerebellar nitric oxide synthase, *J. Biol. Chem.* **269**, 981-985.

-
- ZHANG, M., Li, M., Wang, J.H., Vogel, H.J. (1994): The effect of Met → Leu mutations on calmodulin's ability to activate cyclic nucleotide phosphodiesterase, *J. Biol. Chem.* **269**, 15546-15552.
- ZHANG, M., Tanaka, T., Ikura, M. (1995): Calcium-induced conformational transition revealed by the solution structure of apocalmodulin, *Nat. Struct. Biol.* **2**, 758-767.
- ZHANG, M., Yuan, T. (1998): Molecular mechanisms of calmodulin's functional versatility, *Biochem. Cell. Biol.* **76**, 313-323.
- ZOCHE, M., Bienert, M., Beyermann, M., Koch, K.W. (1996): Distinct molecular recognition of calmodulin-binding sites in the neuronal and macrophage nitric oxide synthase: A surface plasmon resonance study, *Biochemistry* **35**, 8742-8747.
- ZOCHE, M. (1997): Charakterisierung der molekularen Wechselwirkung zwischen Calmodulin und Zieldomänen – eine Oberflächen-Plasmon-Resonanz spektroskopische Studie, *Berichte des Forschungszentrums Jülich* **Jül-3393**.

Danke

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Biologische Informationsverarbeitung, Forschungszentrum Jülich, angefertigt.

Ich danke allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen am Institut für die gute Zusammenarbeit, Diskussion und Unterhaltung. Besonders danken möchte ich:

- Herrn Priv. Doz. Dr. K.-W. Koch für die Überlassung des Themas, für die gute Betreuung und die Korrektur der Arbeit,
 - Herrn Prof. Dr. H.W. Klein für die Übernahme der Beurteilung dieser Arbeit als Gutachter der Universität Köln,
 - Herrn Dr. Beyermann für die Synthese der Peptide,
 - Herrn Prof. Bott und Herrn Prof. Schomburg für die Überlassung des Titrationskalorimeters,
 - Doris Höppner-Heitmann, Christian Lange, Torsten Fischer und Ji-Young Hwang für die gute Zusammenarbeit im Labor,
 - Wolfgang Bönigk für sehr viel Unterstützung in der Molekularbiologie,
 - der AG Baumann für den S1-Arbeitsplatz und viele gute Tips,
 - Mechthilde Bruns für die unentbehrliche Hilfe in der Zellkultur,
 - Herrn Erkens und Daniel Porz für die Unterstützung aus der Werkstatt,
 - Dieter Grammig für die geduldige Computerpflege,
 - Anita Eckert für die verwaltungstechnische Betreuung,
 - Rudi Esser für all seine Hilfe,
- und allen, die an der Korrektur des Manuskripts mitgewirkt haben.

