

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001>

Untersuchung von Metallionen induzierten Konformationsänderungen in Proteinkinasen mittels Surface Plasmon Resonance

Dr. Bastian Zimmermann* und PD Dr. Friedrich Herberg

Ruhr-Universität Bochum, Institut für Physiologische Chemie, MA 2/40, 44801 Bochum

Tel. 0234 322 4947

Biaffin GbR, MA 2/136, 44801 Bochum

Friedrich.W.Herberg@ruhr-uni-bochum.de

Registriernummer der Online-Anmeldung: 140

Vortrag

Einleitung:

Surface Plasmon Resonance (SPR) kann benutzt werden, um Protein/Protein Wechselwirkungen aber auch Nukleotid/Protein-Wechselwirkungen kinetisch genau zu charakterisieren. Unser Modellsystem für Proteinkinasefunktion ist die cAMP-abhängige Proteinkinase (cAPK), die das γ -Phosphat von ATP auf Serin oder Threoninreste von Substratmolekülen überträgt. Zwei Typen von Inhibitoren der katalytischen Untereinheit (C) der cAPK sind bekannt: die regulatorischen Untereinheiten Typ I und Typ II und die sog. hitzestabilen Proteinkinaseinhibitoren, PKIs. Die Aktivität der cAPK scheint durch die Bindung von ATP, ein oder zwei Metallionen und die Freisetzung von ADP reguliert zu werden. Diese Regulation beruht vermutlich auf der Überführung der C-Untereinheit von einer offenen, thermodynamisch instabilen katalytisch aktiven (?) Form zu einer, geschlossenen, thermodynamisch stabilen, katalytisch inaktiven (?) Form. Die Bindung der physiologischen Inhibitoren PKI und der regulatorischen Untereinheiten hängt von der Konzentration der Nukleotide und der Metallionen ab (1, 2). Mittels SPR wurden die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten der Bindung dieser Inhibitoren an die C-Untereinheit in Abhängigkeit von Metallionen und Nukleotiden analysiert, um den Mechanismus der Bindung mit den aus der Kristallstruktur (3) abgeleiteten Konformationsänderungen zu korrelieren.

Material und Methoden :

PKI α als Glutathion-S-Transferase Fusionsprotein und die C-Untereinheit ohne Fusionsanteil wurden in *E. coli* überexprimiert und gereinigt. Die SPR-Experimente wurden mit einem kommerziellen SPR-Sensor, einer Biacore 2000 in 20mM MOPS, 150mM KCl, 0.005% P20, pH7.0 und 50 μ M EGTA bei 20°C durchgeführt. Dazu wurden 80 to 100 response units (RU) GST-PKI an einen Sensorchip (CM5) mit kovalent gekoppeltem anti-GST Antikörper (Biacore) gebunden und die Assoziation und

Dissoziation verschiedener Konzentrationen der C-Untereinheit wurden bei einem Fluss von 30µl/min gemessen. Die unspezifische Bindung wurde durch nur mit Antikörper beschichtete Oberflächen oder unmodifizierte Oberflächen bestimmt. Die freien Metallionenkonzentrationen wurden mit dem Programm BAD (bound and determined, (4)) bestimmt. Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten wurden durch global fit Analyse mittels nicht-linearer Regression sowie Scatchard-Analyse gewonnen (Biaevaluation 3.1, Biacore). Ein 1:1 Langmuir Bindungsmodell wurde zugrunde gelegt.

Ergebnisse:

Zunächst wurde die Wechselwirkung der C-Untereinheit mit GST-PKI in der Abwesenheit (50µM EGTA) von ATPMg und in der Gegenwart von 1mM ATP und 5mM MgCl₂ gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass durch MgATP die KD fast um einem Faktor 1000 verringert wurde (von 400nM auf 0,5nM) was in erster Linie auf die Verlangsamung der off-rates zurückzuführen ist. In einem zweiten Schritt wurde die Bindung der beiden in der Kristallstruktur beobachteten Metallionen genauer charakterisiert, indem Kinetiken bei verschiedenen Metallionenkonzentrationen aufgenommen wurden. Überraschenderweise konnte gezeigt werden, dass die Kinetiken nicht, wie zuvor angenommen, allein durch die Nukleotide, sondern vor allem durch zweiwertige Metallionen beeinflusst werden. Kristallstrukturen der C-Untereinheit zeigen, dass ein Metallion mit dem α und γ-Phosphat von ATP cheliert wird und ein weiteres mit dem β und γ-Phosphat von ATP interagiert. Diesen beiden Metallbindungsstellen konnten Geschwindigkeitskonstanten zugeordnet werden. Darüber hinaus wurden verschiedene Nukleotide (ATP, ADP, AMP sowie AMP-PNP) und Metallionen (Ca⁺⁺, Mn⁺⁺ und Mg⁺⁺) einzeln, in Kombination miteinander und auch in Konkurrenz zueinander kinetisch analysiert.

Diskussion und Ausblick:

Surface Plasmon Resonance (SPR), appliziert in einem hochentwickelten Sensor, kann benutzt werden, um kleinste Änderungen in den getrennt aufgenommenen Assoziations- und Dissoziationskinetiken zu bestimmen. Ein Vergleich der durch SPR gewonnenen Daten mit enzymkinetischen Daten an der C-Untereinheit (2, 5) und NMR-Daten (unveröffentlicht) unterstützen die Hypothese, dass die geschlossene Konformation der Kinase vermutlich 2 Metallionen gebunden hat und sowohl das Nukleotid als auch den (Pseudosubstrat)-Inhibitor hochaffin bindet (schnelle k_{ass} und langsame k_{diss}). Unsere Messungen deuten darauf hin, dass das Schließen des aktiven Zentrums vieler Proteinkinase durch die Bindung des zweiten Metallions induziert wird und so die Kinaseaktivität direkt reguliert wird. Darüber hinaus stellt der Messansatz eine neue Methode dar, Metallbindungskonstanten kinetisch zu vermessen, und erlaubt das Screening von Faktoren, die auf Grund ihrer geringen Masse einer Massenänderungs-basierten SPR-Analyse nicht zugänglich sind. Die Daten zeigen deutlich, dass transiente Kinetiken, die auf Grund schneller Dissoziationskinetiken durch Proteinchiptechnologie, RIA oder ELISA –Assays, nicht detektiert werden können, akkurat vermessen werden können.

Literatur

1. Herberg, F. W., and Taylor, S. S. (1993) *Biochem.* 32, 14015-14022.
2. Herberg, F. W., Doyle, M. L., Cox, S., and Taylor, S. S. (1999) *Biochemistry* 38, 6352-6360.
3. Knighton, D. R., Zheng, J., Ten Eyck, L. F., Ashford, V. A., Xuong, N.-h., Taylor, S. S., and Sowadski, J. M. (1991) *Science* 253, 407-414.
4. Brooks, S. P. J., and Storey, K. B. (1992) *Anal. Biochem.* 201, 119-126.
5. Shaffer, J., and Adams, J. A. (1999) *Biochemistry* 38, 5572-81.