Kinetischer Mechanismus der menschlichen Thymidylatkinase – der *induced fit* als Grund für die unzureichende Aktivierung des Anti-HIV-Medikaments 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidinmonophosphat (AZTMP)

genehmigte

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
des Fachbereichs Chemie der Universität Dortmund

angefertigt am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund

vorgelegt von

Diplomchemiker Thomas Veit
aus Oberhausen/Rheinland

Dortmund, Juni 2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1997 bis Juni 2000 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund unter der Anleitung von Herrn Dr. Joachim Reinstein in der Abteilung Physikalische Biochemie von Herrn Prof. Dr. Roger S. Goody durchgeführt.

1. Gutachter:	Prof. Dr. Roger S. Goody
2. Gutachter:	Prof. Dr. Wolfgang Kreiser

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, daß ich diese Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund, im Juni 2000

Meiner Familie

1 Einleitung

Phosphoryltransferreaktionen sind in der Natur weit verbreitet. Sie spielen bei vielen Prozessen wie Energie- und Signalübertragung, Regulation des Zellwachstums oder der Aktivierung von Metaboliten eine Rolle [1]. Die chemische Reaktion wird in der Regel von Enzymen vermittelt. Diese Enzyme werden als *Kinasen* bezeichnet. Sie können, entsprechend ihrer Funktion, in verschiedene Gruppen eingeteilt werden: die Phosphohydrolasen, die Proteinkinasen und die Phosphotransferasen.

Phosphohydrolasen übertragen einen Phosphatrest auf Wasser. Sie sind am Abbau und der Synthese von Nukleotiden und Nukleinsäuren [2], an der Signalübertragung und der Regulation des Zellwachstums [3] oder an der Proteinsynthese in der Zelle [4] beteiligt. Proteinkinasen sind ebenfalls für die Signalübertragung in Zellen und die Regulation des Zellwachstums wichtig [5, 6]. Sie phosphorylieren und dephosphorylieren dabei andere Proteine. Die Phosphotransferasen schließlich übertragen einen Phosphatrest von einem hochenergetischen Donormolekül - in der Regel ATP – auf Nukleosid- oder Nukleotidakzeptormoleküle. Die Aktivierung dieser Metabolite [3, 7, 8, 9] zu energiereichen Nukleosid-5’-triphosphaten, die am Ende der Aktivierungskaskade stehen, ist sowohl für die Synthese von DNA als auch von RNA wichtig. Zusätzlich ist Adenosin-5’-triphosphat (ATP) die Hauptenergiequelle für endergone Stoffwechselvorgänge in der Zelle.

Die Phosphotransferasen werden nach ihrer Spezifität für den Phosphorylgruppenakzeptor eingeteilt. Ist der Akzeptor ein Nukleosid, heißt die entsprechende Kinase Nukleosidkinase; bei einem Nukleosidmonophosphat vermittelt eine Nukleosidmonophosphatkinase (NMP-Kinase) und bei einem Nukleosiddiphosphat eine Nukleosiddiphosphatkinase (NDP-Kinase) die Reaktion. Die hohe Spezifität der Nukleosid- und der NMP-Kinasen für den Phosphorylgruppenakzeptor kommt in ihren Namen zum Ausdruck: Der Metabolit, der als Phosphorylgruppenakzeptor dient, wird dem Namen der Kinase als Präfix vorangestellt. Die Kinase, die 2’-Deoxythymidinmonophosphat (dTMP) als Substrat akzeptiert, heißt deswegen dTMP-Kinase oder auch Thymidylatkinase. NDP-Kinasen sind in der Wahl ihrer Substrate weit weniger spezifisch [10, 11].

Im folgenden soll die Bedeutung der Phosphotransferasen am Beispiel einer speziellen NMP-Kinase, der dTMP- bzw. Thymidylatkinase, beschrieben werden. Thymidylatkinase (TmpK) katalysiert die Phosphorylierung von 2'-Deoxythymidinmonophosphat (dTMP) zu 2'-Deoxythymidindiphosphat (dTDP) mit Magnesium-Adenosintriphosphat (MgATP) als bevorzugtem Phosphoryldonor [12] nach der in Abbildung 1 dargestellten Gleichung. Die Phosporyltransferreaktion ist reversibel und erfordert MgATP bzw. MgADP und dTMP bzw. dTDP.

$$\mathrm{MgATP + dTMP} \xrightleftharpoons{\mathrm{TmpK}} \mathrm{MgADP + dTDP}$$

Abb. 1: TmpK katalysiert den reversiblen Phophoryltransfer zwischen MgATP und dTMP.

Für die Adenylatkinase (Myokinase, AmpK) wurde ein Substratbindungsmechanismus abgeleitet [13, 14], der als *random bi-bi* Mechanismus (Abb. 2) bezeichnet wird. Das Enzym muß zwei Bindungsstellen besitzen, weil zwei Substrate gleichzeitig gebunden sind. Die Phosphatgruppe wird direkt zwischen den Nukleotiden übertragen. Die Bindung und Freisetzung der Substrate unterliegt keiner bestimmten Reihenfolge. Ein Phosphoenzymintermediat tritt aufgrund der beobachteten stereochemischen Inversion (*Walden'sche Umkehr*) nicht auf [15]. Auch für Thymidylatkinase ist ein solcher Bindungsmechanismus wahrscheinlich.

Der enzymatischen Reaktion der Thymidylatkinase kommt in der menschlichen Zelle eine besondere Bedeutung zu. Dieses Enzym ist an der Verbindungsstelle der beiden Synthesewege für 2'-Deoxythymidintriphosphat (dTTP) lokalisiert. Die Ausgangspunkte für diese Synthesewege sind 2'-Deoxythymidin (*de novo*) oder 2'-Deoxyuridinmonophosphat (*salvage*). Das erste gemeinsame Intermediat ist dTMP. TmpK ist somit essentiell für die DNA-Synthese [16]. In Zellen mit einer hohen Teilungsrate, wie in Krebszellen, ist die Thymidylatkinaseaktivität hoch, so daß Thymidylatkinaseinhibitoren als Antikrebsmedikamente Anwendung finden könnten [17, 18]. Gesundes Gewebe wird wegen der niemals vollständigen Inhibierung und der generell niedrigen Thymidylatkinaseaktivität weniger beeinflußt.

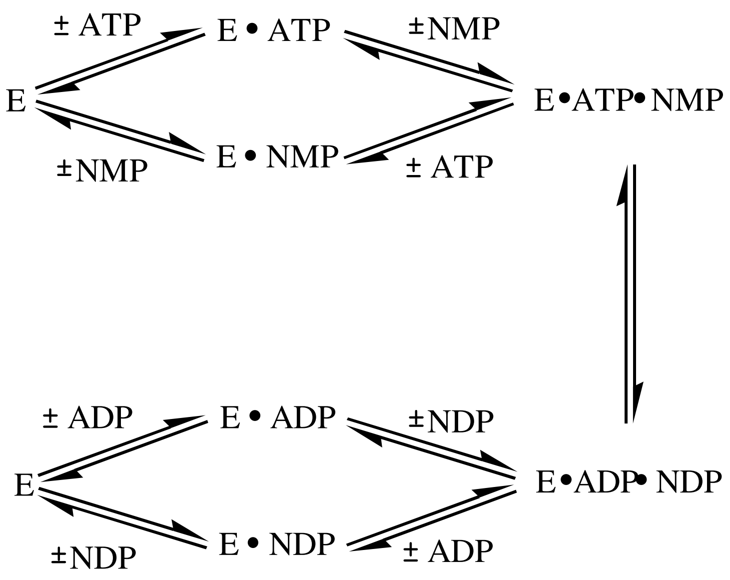
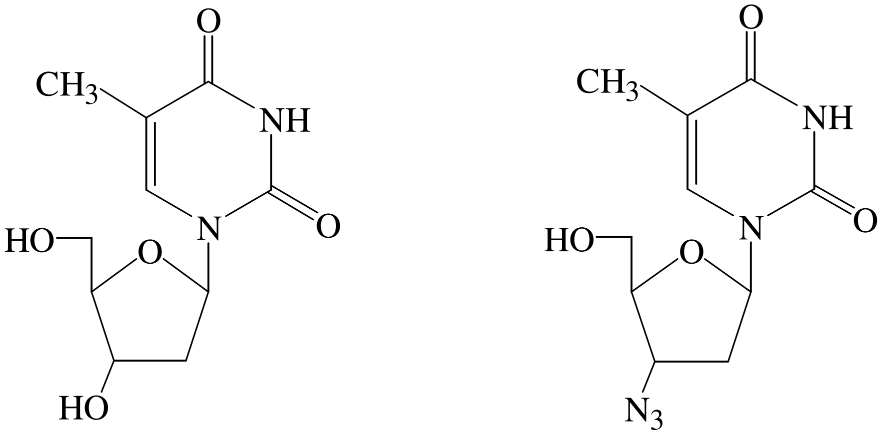


Abb. 2: Schematische Darstellung des *random bi-bi* Mechanismus für ein Enzym E: ATP bzw. ADP und das NMP bzw. NDP binden in beliebiger Reihenfolge an die entsprechenden Bindungsstellen und werden in beliebiger Reihenfolge wieder freigesetzt.

Zusätzlich zu dieser physiologischen Bedeutung spielt menschliche TmpK eine wichtige Rolle bei der antiviralen Chemotherapie gegen AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*). Nach der Beschreibung dieser Krankheit 1981 [19 - 21] und der Entdeckung des Retrovirus HIV (*human immunodeficiency virus*) als Erreger [22 - 25] wurde als eines der ersten wirksamen Medikamente gegen HIV das 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidin (AZT, ZIDOVUDIN, RETROVIR, Abb. 3) beschrieben [26, 27], das ein an der 3'-Position der Ribose modifiziertes Thymidinanalog ist.



2'-Deoxythymidin 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidin (AZT)

Abb. 3: Strukturformeln von 2'-Deoxythymidin und 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidin.

Neben diesem bekanntesten Therapeutikum, dessen erste Synthese schon 1964 durchgeführt wurde [28], gibt es noch eine Reihe anderer Thymidinanaloge, wie 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidin (d4T, STAVUDIN) oder 3'-Fluoro-2',3'-dideoxythymidin (FLT, ALOVUDIN). Sieben von acht Anti-HIV-Medikamenten, die klinisch zur Behandlung der HIV-Infektion angewendet werden, sind Nukleosidanaloga [29]. Dies ist ein eindrucksvoller Beweis für deren Bedeutung.

Die Wirkung aller nukleosidischen Anti-HIV-Medikamente beruht auf ihrer Überführung in die aktive Triphosphatform in der Zelle und den daran anschließenden Einbau in die wachsende DNA-Kette des Virus durch die Reverse Transkriptase des HIV. Die fehlende 3'-OH-Gruppe verhindert die Bildung von für die DNA essentiellen 3',5'-Phosphodiesterbindungen. Anti-HIV-Medikamente sind quasi „trojanische Pferde", die in ihrer aktiven Form als Inhibitor der viralen Replikation durch DNA-Kettenabbruch wirken [30, 31]. Als Ausgangsverbindungen eignen sich nur die Nukleoside, weil die notwendige Diffusion durch die Zellmembran keine Ladung des Moleküls erlaubt. Somit sind alle Anti-HIV-Medikamente im strengen Sinne eigentlich keine Medikamente, sondern nur Medikamentvorstufen (engl.: *prodrug*). Die Aktivierung dieser Medikamentvorstufen geschieht dann durch zelluläre Kinasen [26, 27, 32]. Der Reaktionsweg am Beispiel von AZT ist in der Abbildung 4 verdeutlicht.

$$\mathrm{AZT} \xrightarrow{\text{Thymidinkinase}} \mathrm{AZTMP} \xrightarrow{\text{TmpK}} \mathrm{AZTDP} \xrightarrow{\text{NDP-Kinase}} \mathrm{AZTTP}$$

Abb. 4: Die Medikamentvorstufe AZT wird durch zelluläre Kinasen aktiviert.

AZT ist jedoch weit entfernt von einem idealen Therapeutikum. Obwohl das AZT-Triphosphat ein Substrat für die HIV-1 Reverse Transkriptase ist [33, 34], ist die Behandlung von AIDS mit AZT ineffizient. Der Grund ist die schlechte Aktivierung von AZT durch die zellulären Kinasen, wobei Thymidylatkinase, die den zweiten Phosphorylierungsschritt katalysiert, das ratenlimitierende Enzym in der Aktivierungskaskade ist [27, 30, 35, 36]. Dadurch kommt es zur Akkumulation millimolarer Konzentrationen des toxischen AZTMP [37 - 39], während das aktive Medikament AZTTP nur in geringen Mengen vorhanden ist.

Höhere Konzentrationen des „Prodrug“ AZT in der Zelle führen nun aber nicht zu höheren AZTTP-Konzentrationen. Kinetische Daten, die aus Untersuchungen mit *S. cerevisiae*-Thymidylatkinase (Hefe-Thymidylatkinase) gewonnen wurden, belegen, daß AZTMP durch Bindung auf der Phosphoryldonorseite des Enzyms die Kinaseaktivität inhibiert [40]. Dadurch wird auch die dTTP-Synthese, die für den DNA-Aufbau entscheidend ist, eingeschränkt. Dies könnte ein möglicher Grund für die Toxizität von AZTMP und die damit verbundenen ernsthaften Nebenwirkungen, wie einer Störung der Reifung von Blutstammzellen [41] besonders im späten Stadium der Krankheit, sein.

Außerdem führt das geringe AZTTP-Niveau in der Zelle vermutlich zu einer Resistenz des HIV. Die Inhibierung des viralen Wachstums ist auf DNA-Kettenabbruch durch Einbau von AZTTP durch die Reverse Transkriptase zurückzuführen. AZTTP hat aber keinen kompetitiven Vorteil als Substrat für die Reverse Transkriptase gegenüber dTTP [42]. Die geringe Wahrscheinlichkeit eines Einbaus aufgrund der geringen AZTTP-Konzentration wird jedoch kompensiert durch eine große Anzahl von Einbaumöglichkeiten des AZTTP an beliebigen Stellen der viralen DNA [43]. Bei einer nur marginalen Verringerung der Einbaurate von AZTTP - durch Mutation in der Reversen Transkriptase - wird diese Kompensation eingeschränkt, und die Inhibierung des Wachstums der viralen DNA wird dann bei einer gegebenen AZTTP-Konzentration wesentlich schwächer sein. Die geringe Aktivierungsrate von AZT gibt dem Virus also genügend Zeit, resistente Mutanten zu selektieren.

Ein besseres Verständnis der molekularen Vorgänge der Thymidylatkinasereaktion kann zur Entwicklung von wirksameren Behandlungsmöglichkeiten der HIV-Infektion beitragen. Eine detaillierte kinetische und strukturelle Untersuchung dieses Enzyms aus verschiedenen Organismen kann helfen, die Gründe für die schlechte Aktivierung von Anti-HIV-Medikamenten aufzuklären. Nachfolgend sollen einige ausgewählte kinetische und strukturelle Eigenschaften der Thymidylatkinase beschrieben werden.

Bisher sind nur wenig kinetische Informationen über die Thymidylatkinase bekannt. Sie beschränken sich auf steady-state Kinetiken (Messungen des Fließgleichgewichts) mit der Kinase aus der Leber von Hühnerembryonen wegen der leichten Zugänglichkeit [44, 45], aus *S. cerevisiae* [46] wegen der hohen Aminosäureübereinstimmung zum menschlichen Enyzm, aus *E. coli* [46, 47] und *Yersinia pestis*, dem Pesterreger [47]. Die Phosphorylierung von AZT wurde in menschlichen und Mäusezellinien gemessen [48], und schließlich sind erste Ratenkonstanten für die menschliche Thymidylatkinase veröffentlicht worden [49].

Der Vergleich der steady-state Kinetiken von TmpK aus *E. coli* und *S. cerevisiae* [46] zeigt deutlich, daß die schlechte Aktivierung von AZTMP nicht mit schlechten Bindungseigenschaften des Analogs erklärt werden kann. Die Bindungskonstanten für die ternären Emzym-Substrat-Komplexe werden in steady-state Messungen durch die Michaelis-Konstante in der Einheit $[K_M] = M$ ausgedrückt. Die K_M-Werte für AZTMP und dTMP im Komplex mit *S. cerevisiae*-TmpK sind nahezu gleich (6 µM und 9 µM). Trotzdem ist die Gesamtratenkonstante (k_{cat}) in der Einheit $[k_{cat}] = s^{-1}$ bei Sättigung des Enzyms mit Substrat für AZTMP 200 mal kleiner als für dTMP (0.175 s^{-1} und 35 s^{-1}). Dadurch wird die katalytische Effizienz für AZTMP, die als das Verhältnis $\frac{k_{cat}}{K_M}$ definiert ist, um mehr als zwei Größenordnungen kleiner. Auf der anderen Seite bindet *E. coli*-TmpK AZTMP im ternären Komplex zehnmal schlechter als dTMP (30 µM und 2.7 µM). Trotzdem ist die Gesamtratenkonstante k_{cat} für dTMP und AZTMP fast identisch (6 s^{-1} und 15 s^{-1}), so daß der Unterschied in der katalytischen Effizienz nur eine Größenordnung beträgt.

Die kinetischen Unterschiede können auf struktureller Ebene interpretiert werden. Die simultane Bindung zweier Substrate hat zur Synthese von Bisubstratanalogen geführt [50, 51], mit deren Hilfe die Bindung der Substrate ohne Phosphoryltransfer anhand von Kristallstrukturen analysiert werden kann. Bisher wurden die Strukturen der binären Komplexe aus *S. cerevisiae*-Thymidylatkinase und dTMP bzw. AZTMP [40] sowie mit dem Bisubstratanalog P^1-(5'-Thymidyl)-P^5-(5'-adenosyl)pentaphosphat (TP_5A) [46] aufgeklärt. Die Struktur der Thymidylatkinase aus *E. coli* mit den Bisubstratanalogen P^1-(5'-Thymidyl)-P^5-(5'adenosyl)pentaphosphat (TP_5A) und P^1-[5'-(3'-Azido-2',3'-dideoxythymidyl]-P^5-(5'-adenosyl)pentaphosphat ($AZTP_5A$) [52] ist ebenfalls bekannt. Die Strukturen der Thymidylatkinasen aus *S. cerevisiae* und *E. coli* mit den Bisubstratanalogen und die daraus für dTMP und AZTMP abgeleiteten Unterschiede bei der Aktivierung sollen im folgenden näher beschrieben werden.

Bekannt sind die Kristallstrukturen von Adenylatkinase (AmpK) aus *S. cerevisiae* und *E. coli* mit AP_5A [54, 55] und von Uridylatkinase (UmpK) aus *D. discoideum* mit UP_5A [56]. Im Gegensatz zu diesen Kinasen, die alle Monomere sind, ist Thymidylatkinase ein Homodimer. Es gibt keine Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz zwischen TmpK [46] und den anderen NMP-Kinasen [56], und dennoch zeigt TmpK die gleiche Sekundärstruktur wie die anderen NMP-Kinasen: fünf parallele β-Faltblätter bilden eine Art Höhle, die von α-Helices umgeben wird. Die Bindung zweier Monomere aneinander wird durch eine äußerst hydrophobe Oberfläche (*Interface*), bestehend aus jeweils drei parallelen α-Helices der beiden Monomere, erreicht.

Das Nukleosidmonophosphat wird in einer Art Tasche gebunden, so daß die Nukleobase vollständig von Aminosäuren des Enzyms umgeben ist. Der Phosphoryldonor wird gewöhnlich von einem Enzymteil, dem sogenannten P-Loop (Schleife), gebunden. Dies ist eine Aminosäuresequenz ($GX_1X_2X_3X_4GKS(T)T$), die häufig in ATP- und GTP-bindenden Proteinen vorhanden ist [57]. Die Bindung der Substrate führt zu Konformationsänderungen der Nukleosidmonophosphatkinasen [58], bei denen sich der sogenannte Lid (Deckel) über dem Triphosphat schließt. Dadurch werden in der Regel katalytische Aminosäuren (Arginine) aus dieser Region in das aktive Zentrum gebracht und ermöglichen den Phosphoryltransfer [53]. Gleichzeitig wird durch diesen als *induced fit* bezeichneten Mechanismus die Hydrolyse des Phosphoryldonors verhindert [135].

Die Abbildung 5 zeigt ein Monomer der Thymidylatkinase aus *S. cerevisiae* mit TP_5A als Substrat. Diese TmpK weicht anscheinend von dem im vorherigen Abschnitt beschriebenen Katalysemechanismus [53] ab. Hier ist die Reihenfolge der Aminosäuren im P-Loop (Aminosäuren 12-19) GLDRTGKT. Die Bindung des ATP-Teils von TP_5A erfolgt durch Wechselwirkungen zwischen den Stickstoffatomen des Peptidrückgrats (Thr 16 und Thr 19) und dem α-und β-Phosphat des Nukleotids. Das in allen P-Loops strikt konservierte Lysin (Lys 18) bindet an die Sauerstoffatome des β- und γ-Phosphats und stabilisiert möglicherweise den Übergangszustand [59 - 61]. Weiterhin erfolgt eine Wechselwirkung von Arg 15 mit dem Sauerstoff des γ-Phosphats. Arg 15 spielt eine wichtige Rolle bei der Katalyse durch Bindung der zu übertragenden Phosphorylgruppe, denn dieses Arginin ist die einzige basische Aminosäure in der Nähe des aktiven

Zentrums [53]. In der Lid-Region, die normalerweise die katalytischen Aminosäuren in das aktive Zentrum bringt, befindet sich im *S. cerevisiae*-Enzym kein Arginin.

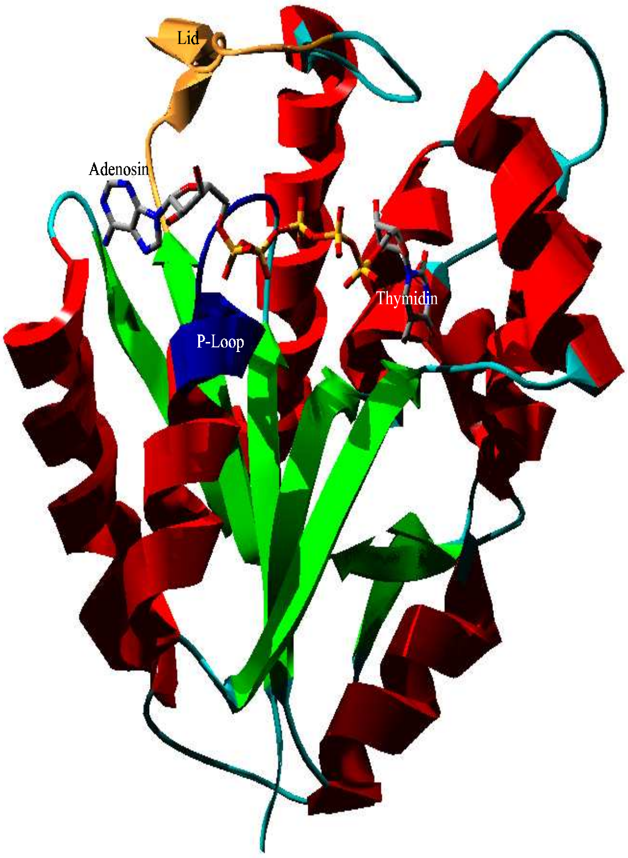


Abb. 5: Tertiärstruktur des monomeren $TmpK_{S.\ cerevisiae}$-TP_5A-Komplexes: Die α-Helices sind rot, die β-Faltblätter grün dargestellt; die die Strukturelemente verbindenden Loops sind cyan. Die Lid-Region (gelb) nimmt durch Bindung von TP_5A (Phosphoratome sind gelb, Sauerstoffatome rot dargestellt) eine helicale Konformation ein, das Enzym befindet sich in einem geschlossenen Zustand. Dadurch wird Wasser aus dem aktiven Zentrum ausgeschlossen und die einfache Hydrolyse des Phosphoryldonors, der vom P-Loop (dunkelblau) gebunden wird, verhindert. Die abgebildete Struktur mit TP_5A stellt entweder den ATP-dTMP oder den ADP-dTDP Zustand dar, denn TP_5A ist kein Analog des Übergangszustands, sondern ein Bisubstrat- bzw. Biprodukt-Analog [56]. Magnesium ist aufgrund der Kristallisationsbedingungen nicht vorhanden.

Zusätzlich bindet ein Magnesiumion im aktiven Zentrum. Dies ist in der Struktur in Abbildung 5 aufgrund der Kristallisationsbedingungen nicht vorhanden, aber für die Aktivität von Kinasen, z. B. Adenylatkinase, absolut notwendig [62]. In Analogie zu anderen Kinasen [57] wird es wahrscheinlich vom β- und γ-Phosphat des ATP und von

Wassermolekülen oktaedrisch koordiniert und so über ein Netzwerk vom Enzym gebunden. Mg^{2+} puffert gewissermaßen die negativen Ladungen des ATP, stabilisiert gleichzeitig die negativen Ladungen im Übergangszustand und sorgt für eine richtige Positionierung der Phosphate des Donors und Akzeptors.

Der Adeninring zeigt hingegen nur zwei schwache Interaktionen mit dem Enzym, beide durch die C6-Aminogruppe: diese wechselwirkt mit der Carbonylgruppe von Lys 187 und über ein Wassermolekül mit Gln 21. Das „Brückenphosphat" (P_δ), welches den ATP- und den dTMP-Teil von TP_5A verbindet, wird von Lys 37 gebunden. Dies könnte auf eine mögliche Beteiligung dieser Aminosäure an der Stabilisierung des Übergangszustands hinweisen. Besonders wichtig für die schlechte Aktivierung von AZTMP scheint die Wechselwirkung des 3'-Substituenten mit dem Aspartat 14 des P-Loops zu sein [52]. Bei dem Substrat dTMP erfolgt die Bindung der 3'-OH-Gruppe *bidental* über eine Wasserstoffbrückenbindung. Der Ersatz von dTMP durch AZTMP führt zu einer Bewegung des kompletten P-Loops (*rigid body movement*). Er entfernt sich um 0.5 Å von der 3'-Azidogruppe des AZTMP durch sterische Wechselwirkung mit dem Aspartat 14 des P-Loops. Das im P-Loop gebundene Triphosphat muß dieser Bewegung folgen. In der Konsequenz ist die Positionierung des Phosphoryldonor-γ-Phosphats und die des α-Phosphats von AZTMP nicht mehr optimal für den Transfer einer Phosphorylgruppe. Durch die Bewegung des P-Loops entsteht eine verzerrte Enzymstruktur, die die Katalysegeschwindigkeit um den Faktor 200 herabsetzt [46]. Die Positionierung von AZTMP in der *S. cerevisiae*-Struktur entspricht bei einer Überlagerung allerdings nahezu perfekt der von dTMP. Die Wechselwirkungen von AZTMP bzw. dTMP mit dem Enzym sind identisch. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit kinetischen Daten, denn die K_M-Werte von dTMP und AZTMP sind nahezu gleich [46].

Im Gegensatz zu der *S. cerevisiae*-TmpK paßt *E. coli*-TmpK in das beschriebene Strukturschema der Kinasen. Die Abbildung 6 zeigt die TmpK aus *E. coli* - wieder ist ein Monomer dargestellt - mit TP_5A als Substrat in der geschlossenen Konformation, die Abbildung 7 stellt den Komplex mit $AZTP_5A$ dar. Die Gesamtstruktur der *E. coli*-TmpK ist der von *S. cerevisiae* sehr ähnlich. Die Bindung der Nukleotide ist ebenfalls vergleichbar. Der *E. coli*-TmpK fehlen allerdings basische Aminosäuren im P-Loop. Anstelle des Arg 15 im P-Loop von *S. cerevisiae* findet sich hier ein Glycin. Dafür gibt es im *E. coli*-Lid gleich vier Arginine [46]. Auffällig ist die nicht eindeutige Positionierung der fünf Phosphate bei den *E. coli*-Strukturen. Dieses Phänomen ist bekannt [54], und möglicherweise auf die Wechselwirkungen der Phosphate mit den Argininen der Lid-Region und das durch die Kristallisationsbedingungen fehlende Magnesium zurückzuführen.

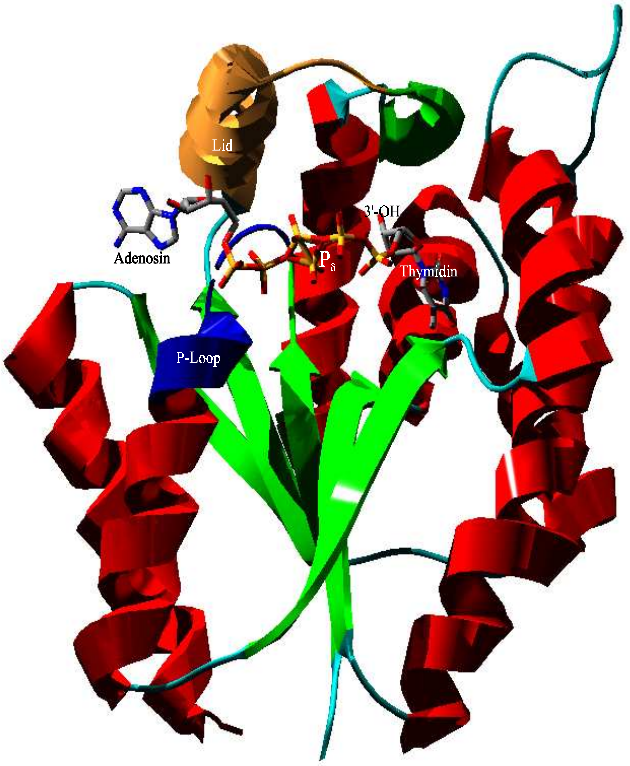


Abb. 6: Tertiärstruktur des monomeren TmpK$_{E. coli}$-TP$_5$A-Komplexes: Die α-Helices sind rot, die β-Faltblätter grün dargestellt; die die Strukturelemente verbindenden Loops sind cyan. Der P-Loop (dunkelblau) bindet den Phosphoryldonor, die LID-Region (gelb) ist in der aktiven Enzymkonformation geschlossen. Im aktiven Zentrum ist TP$_5$A (die Phosphoratome sind gelb, Sauerstoffatome rot und Stickstoffatome blau dargestellt) gebunden. Besonders gekennzeichnet sind die 3'-OH-Gruppe der Ribose und das „ Brückenphosphat“ P_δ. Die 3'-Position ist in AZT modifiziert und das P_δ liegt in zwei Konformationen vor.

Wichtige Erkenntnisse liefert der Vergleich der drei Komplexe untereinander. Die Strukturen der *E. coli*-Komplexe mit TP$_5$A und AZTP$_5$A sind nahezu identisch. Die Bindung von AZTP$_5$A an *E. coli*-TmpK hat keine signifikante Bewegung des P-Loops zur Folge. Die Beherbergung der großen Azidogruppe führt lediglich zu einer leichten

Rotation der kompletten 3'-Azidodeoxyribose und der Seitenkette des Glutamats (Glu 12) im P-Loop. Die Wechselwirkung der Carboxylgruppe des Glutamats mit der 3'-Gruppe ist aber nur *side-on*, also einseitig, und nicht *bidental* wie die von Asp 14 in *S. cerevisiae*. Dadurch kann sich die Seitenkette relativ leicht auf die Bindung von AZTMP einstellen [53]. Der Vergleich von $\text{TmpK}_{\textit{S. cerevisiae}}$ und $\text{TmpK}_{\textit{E. coli}}$. zeigt, daß bei *S. cerevisiae* anscheinend hauptsächlich ein Arginin im P-Loop den Übergangszustand stabilisiert. Basische Reste in der *S. cerevisiae* Lid-Region wechselwirken nicht mit den Phosphaten [46]. Das *E. coli*-Enzym hat gleich vier Arginine im Lid, von denen Arg 153 mit den Phosphaten interagiert. Dieses Lid-Arginin in *E. coli* erfüllt also wahrscheinlich die Aufgabe des P-Loop-Arginins aus *S. cerevisiae.*

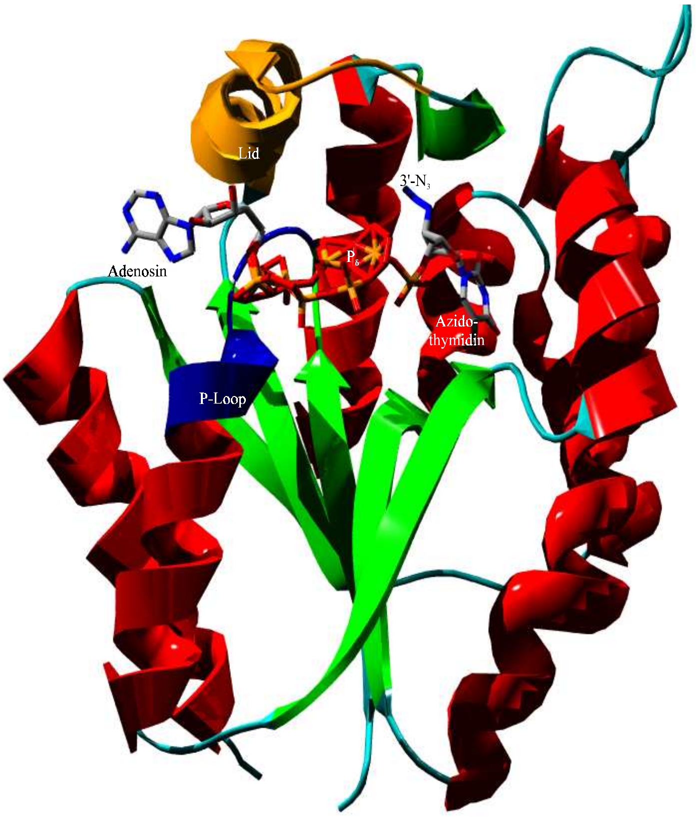


Abb. 7: Tertiärstruktur des monomeren $\text{TmpK}_{\textit{E.coli}}$-$\text{AZTP}_5\text{A}$-Komplexes: Die α-Helices sind rot, die β-Faltblätter grün dargestellt; die die Strukturelemente verbindenen Loops sind cyan. Die Lid-Region (gelb) ist wieder geschlossen, der ATP-Teil des Bisubstratanalogs AZTP_5A (Phosphoratome sind gelb, Sauerstoffatome rot und Stickstoffatome blau dargestellt) wird vom P-Loop (dunkelblau) gebunden. Besonders gekennzeichnet sind die modifizierte 3'-N_3-Gruppe der Ribose und das „Brückenphosphat“ P_δ.

Entscheidend ist, daß der Mechanismus der Katalyse bei beiden Enzymen unterschiedlich ist: die Wechselwirkungen der großen Azidogruppe mit dem P-Loop der *S. cerevisiae*-TmpK führen zu einer kompletten Bewegung des Loops und damit zu einer Verzerrung der Enzymstruktur, so daß zum einen die Position des Phosphoryldonors für den Transfer nicht mehr optimal ist. Zum anderen wird aber auch der Übergangszustand durch das katalytische Arg 15 nicht mehr wie bei der Bindung von dTMP stabilisiert. Bei der *E. coli*-TmpK machen sich dagegen die durchaus vorhandenen Störungen des P-Loops bei Bindung von AZTMP kaum bemerkbar, da die katalytischen Aminosäuren nicht aus dieser Enzymregion, sondern aus dem Lid kommen [53].

Allerdings führen Analogievergleiche und strukturelle Untersuchungen desselben Enzyms aus verschiedenen Organismen (z. B. *S. cerevisiae*, *E. coli*, Maus) nicht zwangsläufig zu befriedigenden Vorhersagen über die katalytischen Eigenschaften dieses Enzyms aus einem dritten Organismus (z. B. Mensch) [47 - 49]. Dies soll kurz am Beispiel der menschlichen TmpK und der aus *S. cerevisiae* verdeutlicht werden. Die menschliche TmpK und die *S. cerevisiae*-TmpK besitzen eine hohe Aminosäureidentität (44%). Sie umfaßt alle für die Katalyse und Bindung wichtigen Aminosäuren [40]. Nach dem aus der *S. cerevisiae*-Struktur abgeleiteten, oben beschriebenen katalytischen Mechanismus sollten alle Enzymmutanten, die kein Arginin im P-Loop haben, eigentlich inaktiv sein, d. h. der Phosphoryltransfer sollte nicht stattfinden können. Es zeigt sich aber, daß der Ersatz des Arginins im P-Loop durch ein Glycin nicht zu einem inaktiven Enzym führt. Diese Mutation führt im *S. cerevisiae*-Enzym zu einer 200-fachen Reduzierung der Phophorylierung von dTMP, während genau dieselbe Mutation im menschlichen Enzym praktisch keinen Einfluß auf die Katalyseaktivität hat: das Wildtyp-Enyzm und die Mutante zeigen dieselbe steady-state-Aktivität [49]. Trotzdem ist es gelungen, durch strukturelle Vergleiche der Thymidylatkinasen aus *E. coli*, *S. cerevisiae* und Mensch Mutationen in menschliche Wildtyp-TmpK so einzuführen, daß AZTMP besser aktiviert wird [49].

In der vorliegenden Arbeit soll nun menschliche Thymidylatkinase als der entscheidende Faktor in der Aktivierungskaskade von Anti-HIV-Medikamenten am Beispiel von dTMP und AZTMP möglichst vollständig kinetisch charakterisiert werden. Für diese Kinase aus verschiedenen Organismen sind bisher nur steady-state Daten und

Dissoziationskonstanten für die Bindung der Bisubstratanaloge bekannt [44 - 49, 53]. Steady-state Daten liefern jedoch nur die Geschwindigkeitskonstante des langsamsten und damit ratenbestimmenden Schritts. Der Reaktionszyklus einer Kinase ist aber wesentlich komplexer; neben der eigentlichen Reaktion, dem Phosphoryltransfer, müssen die Substrate gebunden bzw. freigesetzt werden, und das Enzym muß durch strukturelle Änderungen die aktive Konformation erreichen bzw. verlassen [58].

Aufgrund der beobachteten Phänomene reicht es nicht aus, nur strukturelle Einblicke in ein Enzym zu gewinnen und die Geschwindigkeit des ratenlimitierenden Schritts zu kennen. Führt beispielsweise eine Mutation zur Änderung der Geschwindigkeit eines schnellen, nicht ratenlimitierenden Reaktionsschritts, werden sich die steady-state Ratenkonstanten für das Wildtyp-Enzym und die Mutante nicht signifikant unterscheiden. Dies könnte bei dem Austausch des Arginins gegen ein Glycin im P-Loop der menschlichen Thymidylatkinase der Fall sein. Grundsätzlich ist deshalb die Anwendung transientenkinetischer Meßmethoden neben steady-state kinetischen Untersuchungen zur möglichst vollständigen Aufklärung von kinetischen Reaktionsmechanismen notwendig.

Auch die Kenntnis der Bindungskonstanten für Bisubstratanaloge reicht nicht für ein rationales „Enzymdesign“ aus. Man kann keine Schlüsse für das Bindungsverhalten der Nukleotide im binären Komplex ziehen, da der Einfluß des „Brückenphosphats“ ohne Vergleich mit den Nukleotiden im binären Komplex nicht ermittelt werden kann. Die Bindungskonstanten der Nukleotide liefern, zusammen mit den Affinitäten im ternären Komplex, einen Hinweis auf mögliche synergistische Effekte bei der Bindung der Nukleotide und damit auf die katalytische Effizienz. Bei Anwendung geeigneter kalorimetrischer Methoden lassen sich neben Bindungsdaten für den binären Komplex auch thermodynamische Daten ableiten. Bindungskonstanten sind ebenfalls mit Fluoreszenzmethoden zugänglich, die somit eine gute Kontrollmöglichkeit bieten.

Nur die Kombination von Kinetik und Strukturaufklärung liefert ausreichende Daten zur Aufklärung des enzymatischen Mechanismus der humanen TmpK. Dessen Kenntnis ist eine Voraussetzung für die Entwicklung eines Enzyms mit verbesserten Phosphorylierungseigenschaften für AZTMP zur Gentherapie von AIDS. Die Konstruktion einer menschlichen TmpK ist entscheidend zur Verhinderung von

Immunreaktionen des Patienten. Möglicherweise sind sogar Mutanten denkbar, die nur noch AZTMP aktivieren. In diesem optimalen Fall würde dann „körpereigene“ Wildtyp-TmpK dTMP in ausreichender Menge für die Synthese menschlicher DNA erzeugen, während modifizierte TmpK nur noch AZTMP zur Bekämpfung der viralen Infektion aktiviert. Die Kenntnis des enzymatischen Mechanismus kann ebenfalls die Entwicklung und Synthese eines Bisubstratinhibitors für TmpK zur Behandlung von Krebs unterstützen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen in der höchstmöglichen Reinheit bezogen; die Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 7) erläutert.

Firma	Chemikalie
Angewandte Gentechnik Systeme GmbH (Heidelberg):	Ampicillin
J. T. Baker (Deventer, NL):	Acetonitril (HPLC-grade), $CaSO_4$, HCl (36%), H_3PO_4, KCl, KCH_3COO, KH_2PO_4, KOH, NaOH
Bio-Rad (München):	Bio-Rad Proteinassay Farbstoff Konzentrat
Boehringer (Mannheim):	AP, G6P-DH, HK, LDH, NADH, NADP, PEP, PK
Fluka (Neu-Ulm):	Adenosin, TBAB, TCA, Trimethylphosphat
Gerbu (Gaiberg):	EDTA, Glycerin, IPTG, SDS, DTE, DTT
ICN (Eschwege):	AZT, Thymidin, dTMP, dTDP
Merck (Darmstadt):	D_2O, K_2HPO_4, Methanol
MSD Isotopes (Montreal, CAN):	TSP
Riedel - de Haën (Seelze):	Ethanol, 2-Propanol, $MgCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$
Roth (Karlsruhe):	Acrylamid-Bisacrylamid-Fertiglösung (30% - 8% (w/v)), TRIS
Serva (Heidelberg):	Coomassie Blue R-250, MES, HEPES
Sigma-Aldrich (Taufkirchen):	ADP, ATP, BSA, 1,4-Diaminobutan, 1,6-Diaminohexan, EDC, PMSF, $POCl_3$, Tetrabutylammoniumpyrophosphat wasserfrei, Tributylamin, Thrombin, reduziertes Glutathion

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien und deren Lieferanten.

2.1.2 Bisubstratanaloge und fluoreszierende Bisubstratanaloge

Die Strukturformeln von P^1-(5'-Thymidyl)-P^5-(5'adenosyl)pentaphosphat (TP_5A) und P^1-(5'-Thymidyl)-P^5-(5'-adenosyl-(2'-3'-N-methylanthraniloyl))pentaphosphat (TP_5A-mant) sind in der Abbildung 8 dargestellt; beide Bisubstratanaloge wurden von der Arbeitsgruppe Goody (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) zur Verfügung gestellt. Eine analoge Synthese für AP_5A und AP_5A-mant ist in der Literatur beschrieben [51, 60].

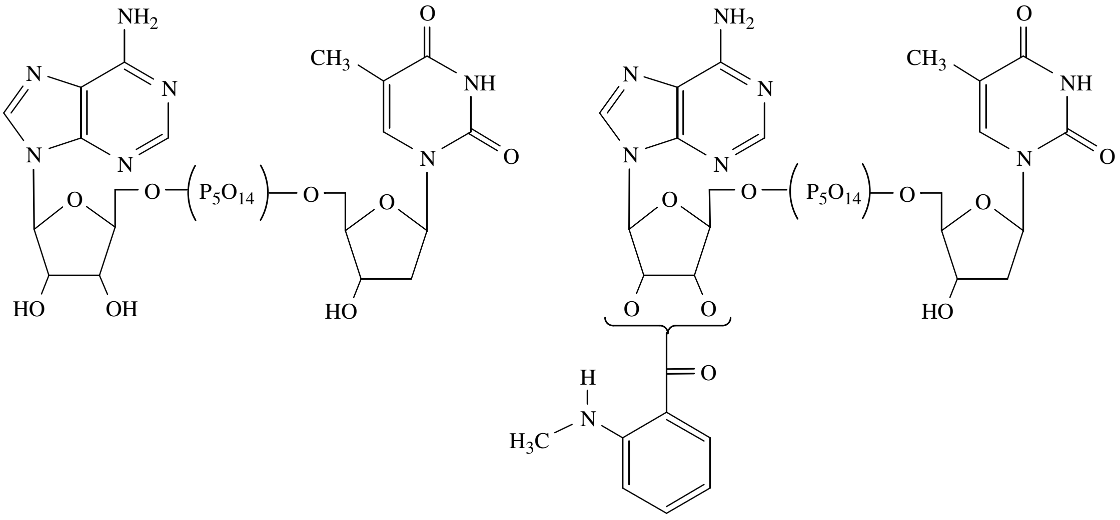


Abb. 8: Molekülstruktur der Bisubstratanaloge TP_5A (links) und TP_5A-mant (rechts).

2.1.3 Expressionsklone

Die Klone für alle untersuchten menschlichen Proteine und wt-TmpK aus der Maus wurden von der Arbeitsgruppe Konrad (MPI für physikalische Chemie, Göttingen) zur Verfügung gestellt. Alle Enzyme wurden in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen überexprimiert. Die Expressionsplasmide sind Derviate des pGEX-2T Vektors (Amersham Pharmacia Biotech), die Expression der verwendeten Enzyme erfolgt als GST-Fusionsprotein (Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein) mit einer Schnittstelle für die Protease Thrombin zwischen der Glutathion-S-Transferase und TmpK [49]. Nach der Proteasereaktion verbleibt eine Gly-Ser-His Extension am N-Terminus der Kinase.

2.1.4 Verwendete Puffer und Säulenmaterialien

Die für Proteinreinigungen, Nukleotidreinigungen und Messungen verwendeten Puffer sind an den entsprechenden Stellen im Methodenteil aufgeführt. Folgende Säulenmaterialen wurden für Reinigungen verwendet:

Glutathion Sepharose 4B (Proteine)	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
S75 (26/60)-Gelfiltration (Proteine)	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Sephadex 25A-Anionentauscher (Nukleotide)	Pharmacia (Uppsala, Schweden)

2.2 Methoden

2.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Proteinproben wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit diskontinuierlichem Puffersystem [63] in BioRad Mini-2D Gelkammern auf ihre Reinheit überprüft. Trenngelpuffer und Sammelgelpuffer wurden durch Zugabe von 50 µl 10% APS-Lösung und 5 µl TEMED pro 10 ml Puffervolumen polymerisiert. Die Proteinproben wurden dann mit denaturierendem Probenpuffer so gemischt, daß die finale Proteinkonzentration ca. 1 mg·ml^{-1} betrug, und 15 min bei 95°C erhitzt. 10 µl der so erhaltenen Proteinprobe wurden auf das Gel aufgetragen und 45 min bei einer konstanten Stomstärke von 40 mA pro Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel 15 min mit Färbelösung behandelt und dann mit Entfärbelösung entfärbt.

Trenngelpuffer:	15% Acrylamid, 0.4% Bisacrylamid, 375 mM TRIS/HCl pH 8.8, 0.1% SDS.
Sammelgelpuffer:	4.5% Acrylamid, 0.1% Bisacrylamid, 125 mM TRIS/HCl pH 6.8, 0.06% SDS.
Probenpuffer:	130 mM TRIS/HCl pH 6.8, 200 mM DTT, 4% SDS, 0.01% Bromphenolblau, 20% Glycerin.
Laufpuffer:	25 mM TRIS, 192 mM Glycin und 0.01% SDS.

Gewichtsstandard: (Pharmacia): Phosphorylase b (94 kDa); Rinderserumalbumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsininhibitor (20.1 kDa) sowie α-Lactalbumin (14.4 kDa).

Gel-Färbelösung: 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 in 50% Methanol, 10% Essigsäure.

Gel-Entfärbelösung: 5% Ethanol, 10% Essigsäure.

2.2.2 NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme aller NMR-Spektren (^{1}H-NMR, ^{31}P-NMR) erfolgte mit dem Spektrometer Avance DRX 500 von Bruker (Rheinstetten, Deutschland) bei Raumtemperatur. Die chemischen Verschiebungen sind in δ-Werten mit Natrium-3-Trimethylsilyl-2,2,3,3-d$_4$-propionat (TSP) als internem Standard für die ^{1}H-NMR-Spektren angegeben. Als interner Standard für die ^{31}P-NMR-Spektren diente K_3PO_4. Die ^{31}P-NMR-Spektren wurden ^{1}H-entkoppelt, um die Zuordnung zu erleichtern. Die Signalmultiplizitäten in den ^{1}H-NMR und ^{31}P-NMR-Spektren sind durch folgende Symbole gekennzeichnet:

Symbol	Signal
s	Singulett
d	Dublett
dd	Dublett von Dubletts
t	Triplett
q	Quartett
m	Multiplett

Tab. 2: Signalmultiplizitäten der NMR-Spektren.

2.2.3 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die Molekülmassen synthetisierter Nukleotide wurden im Elektrospray-Ionisations-LCQ-Massenspektrometer (Finnigan, San Jose, Kalifornien, USA) im negativen Ionenmodus überprüft. Dabei wurden ca. 1 µl einer 15 µM wässrigen Nukleotidlösung aus einer goldbedampften Quarzkapillare von 1 µm Durchmesser verdampft [64]. Die Molmasse des Nukleotids wurde durch den negativen Ionenmodus direkt erhalten.

2.2.4 HPLC-Analysen und -Reinigungen von Nukleotiden

Für alle HPLC-Applikationen wurde ein computergesteuertes System von Waters (Milford, Massachusetts, USA), bestehend aus Pumpe, Autosampler, automatischer Entgasereinheit, 2-Kanal-Absorptionsdetektor, Fluoreszenzdetektor, Fraktionssammler und der Software Millennium^{32} (Version 3.05) benutzt. Die einzelnen Laufprogramme sind bei der jeweiligen Anwendung (quenched-flow, Proteinreinigung, Synthese) beschrieben.

2.2.5 Nukleotidreinigung durch Anionenaustauschchromatographie

Für die Reinigung der Nukleotide und Proteine wurde ein Waters-Chromatographie-System (Milford, Massachusetts, USA), bestehend aus Pumpe, 3-Kanal-Detektor, Schreiber, Fraktionssammler und Wasserbad, benutzt. Die Reinigungsprotokolle sind ebenfalls bei der entsprechenden Anwendung beschrieben.

2.2.6 Spektroskopische Methoden

2.2.6.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Konzentrationen von Proteinlösungen wurden mit der Methode von Bradford [65] bestimmt. Diese Methode nutzt die Bindung von globulären Proteinen an den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 (λ_{max} = 465 nm) und die daraus resultierende Verschiebung des Absorptionsmaximums zu einer Wellenlänge λ = 595 nm aus. Die Absorption der Protein-Farbstoffmischung ist in einem Konzentrationsbereich von 1-10 $\mu g \cdot ml^{-1}$ linear abhängig von der Proteinkonzentration und kann daher nach Erstellung einer Eichgeraden mit einem Protein (BSA, $\varepsilon_{280\ nm}^{10\ mg/ml} = 6.6$) bekannter Konzentration zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen angewendet werden. Nach Zugabe des Proteins zur Bradfordlösung und einer Wartezeit von 10 min wurde die Absorption bei λ = 595 nm gemessen. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen im DU 650 Einstrahlphotometer (Beckman, Palo Alto, USA) durchgeführt. Die Umrechnung der Konzentration von der Einheit [$mg \cdot ml^{-1}$] in die Einheit [M] erfolgte mit der Molmasse eines TmpK-Monomers (23650 Da). Dabei wurde die Gly-Ser-His-

Extension am N-Terminus der Kinase berücksichtigt. Ohne diese Extension beträgt die Molmase eines Monomers 23320 Da. Alle Konzentrationsangaben wurden auf ein Monomer bezogen.

2.2.6.2 Bestimmung von Nukleotidkonzentrationen

Nukleotidkonzentrationen wurden photometrisch (DU 650 Einstrahlphotometer (Beckman, Palo Alto, USA)) bestimmt und mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes nach Gleichung 1 berechnet:

(Gl. 1) $$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \cdot v$$

A:	Absorption
ε:	Extinktionskoeffizient in $\mu M^{-1} \cdot cm^{-1}$
c:	Konzentration des Nukleotids in µM
d:	Schichtdicke der Küvette in cm
ν:	Verdünnungsfaktor

Für die Berechnung der Konzentrationen wurden die in der Tabelle 3 zusammengestellten Extinktionskoeffizienten verwendet:

Nukleotid	**ε [$\mu M^{-1} \cdot cm^{-1}$]**
nichtfluoreszierende Thymidinnukleotide [66]	$\varepsilon_{267\,nm}^{pH\,7.5} = 9.7 \cdot 10^{-3}$
nichtfluoreszierende Adenosinnukleotide [66]	$\varepsilon_{259\,nm}^{pH\,7.5} = 15.4 \cdot 10^{-3}$
TP_5A [67]	$\varepsilon_{262\,nm}^{pH\,7.5} = 22.1 \cdot 10^{-3}$
TP_5A-mant$^{*)}$	$\varepsilon_{257\,nm}^{pH\,7.5} = 31.1 \cdot 10^{-3}$
$P_{(\beta)}$-MAHA-TDP$^{**)}$	$\varepsilon_{325\,nm}^{pH\,7.5} = 2.7 \cdot 10^{-3}$
$P_{(\beta)}$-MABA-ADP$^{**)}$	$\varepsilon_{325\,nm}^{pH\,7.5} = 2.7 \cdot 10^{-3}$
$P_{(\gamma)}$-MABA-ATP$^{**)}$	$\varepsilon_{325\,nm}^{pH\,7.5} = 2.7 \cdot 10^{-3}$
C_8-MABA-AMP [68]	$\varepsilon_{280\,nm}^{pH\,7.5} = 18 \cdot 10^{-3}$

Tab. 3: Übersicht über die Extinktionskoeffizienten der Nukleotide; (*): von Arbeitsgruppe Goody, MPI für molekulare Physiologie, Dortmund; (**) : siehe Anmerkung S. 39)

2.2.7 Enzymkinetik

2.2.7.1 Messung der Thymidylatkinaseaktivität

Die Messung der Thymidylatkinaseaktivität wurde für die Umsetzung von ATP und dTMP (Vorwärtsreaktion) zu ADP und dTDP an die Konvertierung von NADH zu NAD [69] und für die Rückwärtsreaktion, also die Bildung von ATP und dTMP aus ADP und dTDP, an die Generierung von NADPH aus NADP gekoppelt [70]. In beiden Fällen wurde ein Hilfsenzymsystem eingesetzt, die einzelnen Reaktionen sind in Abbildung 9 dargestellt.

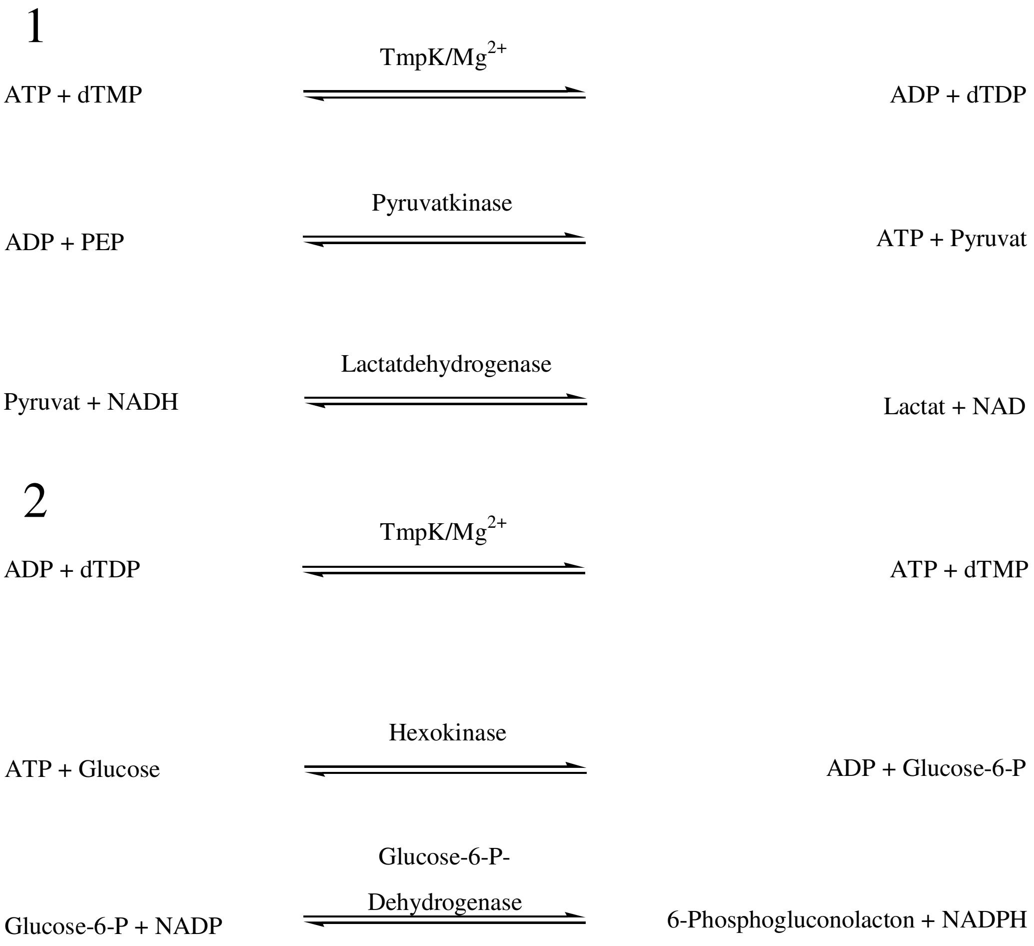


Abb. 9: Schematische Darstellung der Meßsysteme zur Bestimmung der Thymidylatkinaseaktivität: Sowohl bei der Messung der Geschwindigkeit der Vorwärtsreaktion (Teil 1) als auch bei der Rückwärtsreaktion (Teil 2) ist das Meßsignal die Änderung des Absorptionsverhaltens der Nicotinamiddinukleotide bei $\lambda = 340$ nm in der Einheit $[\Delta A] = \text{min}^{-1}$.

Das Absorptionsverhalten oxidierter bzw. reduzierter Nicotinamidadenindinukleotide unterscheidet sich bei einer Wellenlänge von 340 nm stark, so daß diese Redoxreaktion photometrisch gut verfolgt werden konnte. Die Thymidylatkinasereaktion war langsamer als die der Hilfsenzyme, so daß mit diesen Hilfsenzymsystemen die Geschwindigkeit der Thymidylatkinase als ratenlimitierendem Enzym ermittelt werden konnte. Mit dem bekannten Extinktionskoeffizienten für die Nicotinamidadenindinukleotide NADH und NADP ($\varepsilon_{340\ \mathrm{nm}} = 6.22 \cdot 10^{-3}\ \mu\mathrm{M}^{-1} \cdot \mathrm{cm}^{-1}$) berechnete sich die Ratenkonstante für die Aktivität der Thymidylatkinase (Umsatzzahl) nach Gleichung 2 aus der Absorptionsänderung pro Minute:

(Gl. 2)

$$k\left(s^{-1}\right) = \frac{\Delta A\left(\mathrm{min}^{-1}\right)}{60\,\frac{s}{\mathrm{min}} \cdot \varepsilon \cdot [\mathrm{TmpK}] \cdot d}$$

ΔA:	Änderung der Absorption pro min bei $\lambda = 340$ nm
ε:	Extinktionskoeffizient in $\mu\mathrm{M}^{-1} \cdot \mathrm{cm}^{-1}$
[TmpK]:	Konzentration der Thymidylatkinase in der Küvette in µM
d:	Schichtdicke der Küvette in cm
k:	Umsatzzahl in s^{-1}

Die Aktivität wurde in einer Küvette in einem Reaktionsvolumen von 1 ml bei 25 °C gemessen. In der folgenden Zusammenstellung sind die Reagenzien für den NADH-Assay (Vorwärtsreaktion) und den NADP-Assay (Rückwärtsreaktion) aufgeführt:

NADH-Puffer: 50 mM TRIS/HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 0.4 mM PEP, 0.2 mM NADH, 5 mM $MgCl_2$.

Die Hilfsenzyme LDH/PK (c= 10 $\mathrm{mg} \cdot \mathrm{ml}^{-1}$ für jedes Protein) wurden im Verhältnis 2:5 gemischt; zu 1 ml Reaktionsvolumen wurden 10 µl ($c_{\mathrm{final}} = 0.1\ \mathrm{mg} \cdot \mathrm{ml}^{-1}$) dieses Gemisches hinzugefügt.

NADP-Puffer: 100 mM TRIS/HCl pH 7.5, 0.5 mM NADP, 10 mM Glucose, 50 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$.

Das Hilfsenzymsystem HK/G6P-DH wurde als Ammoniumsulfatsuspension ($c = 3\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) eingesetzt; zu 1 ml Reaktionsvolumen wurden 3 µl der Hilfsenzymmischung hinzugegeben ($c_{\text{final}} = 0.009\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

2.2.7.2 Bestimmung von steady-state kinetischen Konstanten

Die beschriebenen Testlösungen konnten zur Bestimmung der enzymatischen Parameter K_M (Michaelis-Konstante) und k_{cat} (Umsatzzahl bei Substratsättigung) unter den Bedingungen des Fließgleichgewichts (steady-state) benutzt werden. Zur Gewährleistung konstanter Konzentrationen bei allen Messungen war folgende experimentelle Durchführung vorteilhaft: Zu 500 µl eines zweifach konzentrierten NADH- bzw. NADP-Assays wurden die Hilfsenzyme und die der gewünschten Nukleotidkonzentration entsprechenden Volumina hinzugegeben. Anschließend wurde mit deionisiertem Wasser auf 1 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. TmpK wurde erst vor der Messung in die Küvette pipettiert, das der gewünschten Konzentration entsprechende Volumen war zu berücksichtigen. Im Photometer (DU 650 Einstrahlphotometer (Beckman, Palo Alto, USA)) wurde zunächst die Blindaktivität der Testlösung, d. h. ohne TmpK, für 3 min gemessen. Dann wurde TmpK hinzupipettiert und das Absorptionssignal insgesamt 30 min verfolgt. Die Blindaktivität wurde bei der Auswertung vom Meßsignal subtrahiert. Die TmpK-Konzentration wurde so gewählt, daß die Absorptionsänderung für die Vorwärts- und Rückwärtsreaktion bei der höchsten Nukleotidkonzentration maximal $\Delta A \approx 0.1\ \text{min}^{-1}$ betrug. Die Auswertung der steady-state Messungen mit der Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 3) erfolgte wie beschrieben (Appendix, Kapitel 8.1.1).

(Gl. 3)
$$k_{app} = k_{cat} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

Anmerkungen:

1.) Bei einigen steady-state-Experimenten ($hsTmpK_{wt}$/MgATP/AZTMP; $hsTmpK_{wt}$/MgADP/AZTDP; $hsTmpK_{R200A/F105Y}$/MgADP/AZTDP; $TmpK_{murin}$/MgADP/AZTDP) waren zur Messung einer signifikanten Absorptionsänderung Enzymkonzentrationen notwendig, die bei niedrigen Nukleotidkonzentrationen eigentlich nicht mit der Michaelis-Menten-Bedingung des Fließgleichgewichts (d. h. [S] » [E]) vereinbar waren. Vielmehr stellten diese Messungen bei niedrigen Nukleotidkonzentrationen eher single turnover Messungen dar (Experimente, bei denen der Kinasezyklus nur einmal durchlaufen wird). Die mit der analytischen Michaelis-Menten-Gleichung und dem Programm GraFit (Version 3.01, Erithacus Software, Staines, GB) erhaltenen Ergebnisse wurden deshalb mit dem zur Michaelis-Menten-Gleichung führenden Differentialgleichungssystem (Gl. 12 - 16, Appendix, Kapitel 8.1.2) und dem Programm Scientist (Version 2.0, MicroMath Incorp., Salt Lake City, Utah, USA) überprüft. In allen Fällen konnten die mit der analytischen Michaelis-Menten-Gleichung erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden, wenn wirklich nur die Anfangssteigung der Absorptionsänderung zur Auswertung herangezogen wurde.

2.) Bei TmpK-Konzentrationen, die kleiner als 1 $mg{\cdot}ml^{-1}$ waren, wurde zur Stabilisierung 1 $mg{\cdot}ml^{-1}$ BSA zugesetzt. Diese TmpK-Verdünnung konnte nicht mehr in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden.

3.) Bei der Bestimmung der katalytischen Ratenkonstanten für die Vorwärtsreaktion mit dTMP mußte die gemessene Absorptionsänderung durch zwei dividiert werden, weil das Hilfsenzymsystem LDH/PK nach eigenen Messungen mit einer NDP-Kinase verunreinigt war, die das entstehende dTDP zum dTTP umsetzte und damit die Absorptionsänderung verdoppelte. Bei allen anderen Nukleosidmonophosphaten war dieser zusätzliche Faktor nicht erforderlich; die entsprechenden Nukleosiddiphosphate wurden entweder nicht oder im betrachteten Zeitfenster der Reaktion (30 min) nicht weiter umgesetzt.

2.2.7.3 pH-Abhängigkeit der Thymidylatkinaseaktivität

Für biochemische Untersuchungen an humaner TmpK war die Kenntnis des optimalen pH-Werts in bezug auf die Aktivität notwendig. Diese wurde für die Vorwärtsreaktion in einem pH-Bereich von 4.2 bis 10.7 mit der Methode der Anfangssteigung ermittelt, weil das Meßsystem (NADH-Assay) aufgrund der Inaktivität der Hilfsenzyme nicht verwendet werden konnte. Bei diesem Experiment wurden jeweils 150 µM MgATP und 100 µM dTMP mit 0.1 µM humaner wt-TmpK inkubiert und der Nukleotidgehalt der Reaktionsmischung mit HPLC zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Danach wurde die Anfangssteigung der einfach exponentiell von der Zeit abhängigen Nukleotidkonzentrationen ermittelt und nach Normalisierung gegen den pH-Wert aufgetragen (Abb. 10). Die maximale Aktivät lag bei pH 7.5.

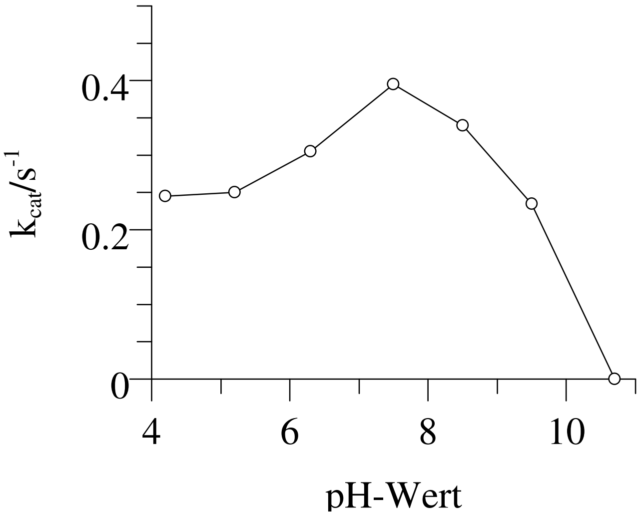


Abb. 10: Aktivitätsprofil hsTmpK$_{wt}$: Alle Messungen wurden bei 25 °C in einem Puffer bestehend aus 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$,und 100 mM TRIS/HCl (pH = 9.5; 8.5; 7.5; 6.3) bzw. 100 mM Kaliumacetat/Essigsäure (pH = 5.2; 4.2) durchgeführt. Der pH-Wert 10.7 wurde durch Zusatz von 2 M KOH eingestellt. Die Kinase war gegenüber basischen pH-Werten wesentlich empfindlicher als gegenüber sauren.

2.2.8 Messung schneller Kinetiken

2.2.8.1 Quantitative Nukleotidanalyse durch HPLC

Die Nukleotidanalysen wurden mit HPLC durchgeführt. Die Bedingungen für die Analysen der quenched-flow Messungen und Gleichgewichtsexperimente sind im folgenden beschrieben. Die HPLC-Säule stammte von Bischoff Analysentechnik und -geräte GmbH, Leonberg, Deutschland.

Säule:	ODS Hypersil Reversed Phase C-18, 5 µm, 120 Å, 250x4.6 mm
Flußrate:	1 ml·min^{-1}
Detektion:	Absorption bei 254 nm
Laufmittel:	100 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 6.5; 10 mM TBAB

Die mittleren Retentionszeiten der einzelnen Nukleotide sind in der Tabelle 4 zusammengefaßt:

Nukleotid	**mittlere Retentionszeit/min**
dTMP	13.3
dTDP	30.3
ADP	45.4
ATP	106.2
AZTMP	85.1
AZTDP	199.6

Tab. 4: Zusammenstellung der mittleren Retentionszeiten der analysierten Nukleotide.

2.2.8.2 Bestimmung der Gleichgewichtskonstante in freier Lösung

TmpK wurde mit der Nukleotidmischung bei 25 °C im quenched-flow Puffer (200 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 50 mM TRIS/HCl pH 7.5) inkubiert. Das Reaktionsvolumen betrug 100 µl, die TmpK-Konzentration 10 µM und die der Nukleotide 1 mM. Nach 8 h Reaktion wurden 50 µl des Überstands wie beschrieben (Material und Methoden, Kapitel 2.2.8.1) analysiert. Die erhaltenen Peakflächen wurden nach Eichung mit den entsprechenden Nukleotiden bekannter Konzentration normalisiert und die Gleichgewichtskonstante in freier Lösung mit Gleichung 4 (Definition der Gleichgewichtskonstante) berechnet:

(Gl. 4)
$$K_{eq} = \frac{[MgATP][NMP]}{[MgADP][NDP]}$$

2.2.8.3 Quenched-flow Messungen

Single turnover Experimente wurden an einem Kintek RQF-3 quenched-flow Gerät (Abb. 11, Kintek Corporation, Althouse, Pennsylvania, USA) durchgeführt, die Volumina der Reaktions-, Proben- und Austrittsschleifen waren geeicht. Bei einer konstanten Reaktionstemperatur von 25 °C wurden TmpK (600 µM, 19.6 µl, Schleife A) und die Nukleotide (400 µM, 17.7 µl, Schleife B) gemischt. Dabei wurden folgende Nukleotidkombinationen verwendet: MgATP/dTMP, MgADP/dTDP, MgATP/AZTMP und MgADP/AZTDP. Die Reaktion wurde nach verschiedenen Zeiten durch Hinzufügen von 141.4 µl einer 100 mM Trichloressigsäurelösung (TCA) gestoppt (*quenchen*). Das Protein denaturierte und fiel aus. Nach 15 min bei 0°C wurde die Lösung mit 21.3 µl einer kalten, 2 M Kaliumacetat-Lösung neutralisiert. Das ausgefallene Protein wurde durch Zentrifugation pelletiert und 150 µl des Überstands wurden mit HPLC analysiert (Material und Methoden, Kapitel 2.2.8.1). Die erhaltenen Peakflächen wurden nach Eichung in eine Konzentration umgerechnet. Die Datenpunkte konnten mit einer einfach exponentiellen Gleichung (Appendix, Kapitel 8.2) beschrieben werden.

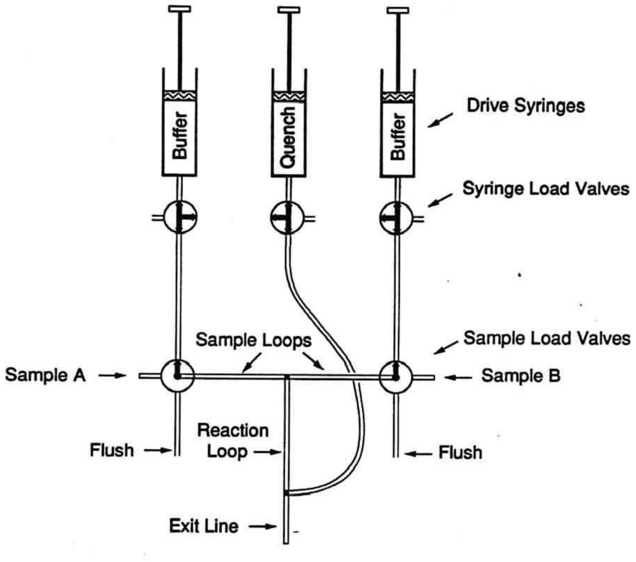


Abb. 11: Schematische Darstellung des quenched-flow Geräts: In der linken und rechten Spritze (*drive syringes*) befanden sich Puffer, in der Mitte war Quench-Lösung. Das Enzym wurde in die Probenschleife A (*Sample A*), das Nukleotidgemisch in die Probenschleife B (*Sample B*) gefüllt. Enzym und Nukleotidgemisch wurden in der Reaktionsschleife (*Reaction Loop*) vereinigt. Die Reaktion wurde dann nach verschiedenen Reaktionszeiten durch Hinzufügen von Quench-Lösung gestoppt.

Quenched-flow Puffer: 200 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 50 mM TRIS/HCl pH 7.5.

Anmerkung: Die Bestimmung der enzymatischen Gleichgewichtskonstanten aus den quenched-flow Experimenten war schwierig. Für die Berechnung dieser

Gleichgewichtskonstanten waren absolute Peakflächen notwendig, die wegen der starken Verdünnung der Probelösung im quenched-flow Gerät ($c_{\text{Nukleotide, final}} \approx 20\ \mu M$) und einer nicht immer vollständigen Grundlinientrennung der Peaks teilweise nicht eindeutig bestimmt werden konnten. Eindeutig meßbar waren lediglich die relativen Flächenänderungen. Deshalb wurden Gleichgewichtskonstanten am Enzym folgendermaßen bestimmt: TmpK wurde mit der Nukleotidmischung bei 25 °C im quenched-flow Puffer inkubiert. Das Reaktionsvolumen betrug 100 µl, die TmpK-Konzentration 1.2 mM und die der Nukleotide 1 mM. Die drastische Erhöhung der Konzentrationen führte zu einer Verminderung des relativen Fehlers bei der Gleichgewichtsnukleotidbestimmung. Das Protein wurde mit 5 µl einer 3 M Trichloressigsäurelösung 15 min bei 0 °C gefällt. Anschließend wurde mit 15 µl einer eiskalten 2 M Kaliumacetatlösung neutralisiert. Nach Zentrifugation wurden 50 µl des Überstands wie beschrieben mittels HPLC analysiert (Material und Methoden, Kapitel 2.2.8.1) und die enzymatische Gleichgewichtskonstante nach Gleichung 4 (Material und Methoden, Kapitel 2.2.8.2) berechnet.

2.2.8.4 Stopped-flow Messungen

Stopped-flow Messungen wurden bei 25 °C mit einem SF-61 SX *Single Mixing* oder einem SF-61 DX2 *Double Mixing* Apparat (HiTech Scientific, Salisbury, GB) durchgeführt. Das Meßsignal war die Fluoreszenz von TP_5A-mant (Excitation 360 nm; *Cut-off* 418 nm) bzw. die von $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP (Excitation 335 nm; *Cut-off* 418 nm). *Cut-off* Filter schneiden das Emissionsspektrum unterhalb der angegebenen Wellenlänge ab, um Streulicht- und Anregungslichteinflüsse zu minimieren. Dabei wurde ein Standardfluoreszenzpuffer verwendet. Die Auswertung der Messungen ist im Appendix, Kapitel 8.3 beschrieben. Im Ergebnisteil werden sowohl die Spritzenkonzentration als auch die Meßzellenkonzentration des Substrats, die aufgrund der verwendeten Geräteeinstellung nur die Hälfte der Spritzenkonzentration betrug, angegeben. Dabei wird eine Schreibweise verwendet, bei der die Zahl vor der Klammer der Spritzenkonzentration und die in der Klammer der Meßzellenkonzentration des Substrats entspricht. So bedeutet beispielsweise die Angabe 4(2) µM, daß die Konzentration des Substrats in der Spritze 4 µM und die entsprechende Konzentration in der Meßzelle 2 µM war.

Standardfluoreszenzpuffer: 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA, 2 mM DTE, 100 mM KCl, 50 mM TRIS/HCl pH 7.5.

2.2.9 Gleichgewichtsfluoreszenzmessungen

Alle Gleichgewichtsfluoreszenzmessungen wurden bei 25 °C mit einem Aminco Bowman Series 2 Fluorimeter oder einem Aminco Bowman 8100 (SLM, Urbana, Illinois, USA) in einem Standardfluoreszenzpuffer durchgeführt. Für Fluoreszenzemissionsspektren wurde der Fluorophor im Absorptionsmaximum angeregt und die Emission mit einer Detektionsrate von 1 $nm \cdot s^{-1}$ bei einer Integrationszeit von 0.1 s gemessen. Für die Aufnahme von Fluoreszenzanregungsspektren wurde die Excitationswellenlänge mit 1 $nm \cdot s^{-1}$ variiert und die Fluoreszenzemission im Emissionsmaximum bei einer Integrationszeit von 0.1 s gemessen. Für zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen wurde die N-Methylanthraniloylfluoreszenz angeregt (bei TP_5A-mant war die Exciationswellenlänge 360 nm, bei $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP 335 nm) und die Emission bei 440 nm gemessen. Die Photomultiplier-Spannung lag je nach Stärke der Fluoreszenzemission zwischen 600 und 1100 V.

Standardfluoreszenzpuffer: 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA, 2 mM DTE, 100 mM KCl, 50 mM TRIS/HCl pH 7.5.

2.2.9.1 Bestimmung der Dissoziationskonstanten für Fluorophore

Bei der Bindung eines fluoreszierenden Liganden an TmpK wurde eine Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet. Dieses Signal kann zur Bestimmung der Dissoziationskonstante für dieses System mit Hilfe der quadratischen Gleichung verwendet werden [60]. Nach einer Volumenkorrektur für das gemessene Fluoreszensignal gemäß Gleichung 5 (F bedeutet Fluoreszenzintensität, V steht für das Volumen)

(Gl. 5) $$F_{korrigiert} = \frac{F_{gemessen} \cdot V_{Gesamt}}{V_{Anfang}}$$

kann unter Berücksichtigung der Massenerhaltung und der Definition der Gleichgewichtskonstante das gemessene Fluoreszenzsignal wie in Gleichung 6 beschrieben werden (Appendix, Kapitel 8.3):

$$\text{(Gl. 6)}\quad F=F_0+\left(F_{max}-F_0\right)\cdot\frac{\frac{[E]_0+[L]_0+K_d}{2}-\sqrt{\frac{\left([E]_0+[L]_0+K_d\right)^2}{4}-[E]_0\cdot[L]_0}}{[L]_0}$$

Die verwendeten Symbole bedeuten:

F:	gemessene Fluoreszenz bei einer bestimmten Proteinkonzentration
F_{max}:	Sättigungsfluoreszenz
F_0:	Grundfluoreszenz des freien Fluorophors
$[E]_0$:	Gesamtkonzentration des Enzyms in µM
$[L]_0$:	Gesamtkonzentration des Fluorophors in µM
K_d:	Dissoziationskonstante des Komplexes in µM

Die freien Parameter dieser Gleichung (K_d, F_{max}, und F_0) wurden mit dem Programm GraFit (Version 3.01, Erithacus Software, Staines, Middlesex, GB) iterativ an die Daten der Fluoreszenzmessung angepaßt. F_0 konnte auch fest vorgegeben werden, die iterative Anpassung an die Daten der Messung war eine Kontrolle für ihre Richtigkeit.

2.2.9.2 Bestimmung der Dissoziationskonstanten für Nichtfluorophore

Die Kenntnis der Gleichgewichtsdissoziationskonstante für einen fluoreszierenden Liganden erlaubt die Bestimmung der K_d für einen nichtfluoreszierenden Liganden, der mit derselben Bindungsstelle kompetitiv wechselwirkt. Dazu wurde der Fluorophor-TmpK-Komplex in einer Küvette vorgelegt. Es wurde solange nichtfluoreszierender Ligand hinzugegeben, bis die Fluoreszenzintensität nach Volumenkorrektur (Gl. 5, Material und Methoden, Kapitel 2.2.9.1) praktisch nicht mehr abnahm. Die Herleitung der Gleichung, die die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Konzentration des Kompetitors beschreibt, erfordert die Lösung eines Polynoms dritten Grades (kubische Gleichung [71]) und ist im Appendix (Kapitel 8.4.2) dargestellt. Die entsprechenden Gleichungen waren in einem TurboPascal-Programm zusammengefaßt (Jochen Reinstein, MPI für molekulare Physiologie, Dortmund, unveröffentlicht). Dieses

Programm ermöglichte mit Hilfe eines nichtlinearen Nelder-Mead Minimierungsalgorithmus [72] die Berechnung der Dissoziationskonstante für das Nichtfluorophor mit Hilfe der bekannten K_d des Fluorophors.

2.2.10 Kalorimetrische Messungen

2.2.10.1 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Kalorimetrische Messungen wurden mit einem Microcal MCS ITC Titrationskalorimeter (MicroCal, Northhamptom, Massachusetts, USA) durchgeführt. In der Meßzelle wurden ungefähr 150 µM TmpK in ITC-Puffer vorgelegt. Danach wurde das Nukleotid (10-fach höhere Konzentration als das Enzym) im ITC-Puffer aus der Titrationsspritze automatisch mit 1 $\mu l \cdot s^{-1}$ bei einer zeitlichen Auflösung von 2 s und einer Rührergeschwindigkeit von 400 rpm in die Meßzelle pipettiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Origin für ITC (Version 2.9, MicroCal Software Incorp., Northhampton, Massachusetts, USA). Die Anpassung der freien Parameter (n, K_a, ΔH_B) an die Daten der Messung geschah mit Gleichung 7, deren Ableitung im Appendix (Kapitel 8.5.1) beschrieben ist.

(Gl. 7) $$Q=\frac{n\cdot[E]\cdot\Delta H_B\cdot V}{2}\cdot\left(1+\frac{[L]}{n\cdot[E]}+\frac{1}{n\cdot K_a\cdot[E]}-\sqrt{\left(1+\frac{[L]}{n\cdot[E]}+\frac{1}{n\cdot K_a\cdot[E]}\right)^2-\frac{4\cdot[L]}{n\cdot[E]}}\right)$$

Q: Wärmemenge in J

[E]: Gesamtkonzentration des Proteins in M

[L]: Gesamtkonzentration des Liganden in M

V: Meßvolumen der Zelle in l

ΔH_B: molare Enthalpie der Ligandenbindung in $J\cdot mol^{-1}$

n: Anzahl der aktiven Bindungsstellen des Proteins

K_a: Assoziationsgleichgewichtskonstante in M^{-1}

ITC-Puffer: 200 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 50 mM TRIS/HCl pH 7.5, 10 Vol-% Glycerin.

2.2.10.2 Differential scanning calorimetry (DSC)

Thermisch induzierte Entfaltung von TmpK wurde mit einem Microcal VP-DSC Mikrokalorimeter (MicroCal, Northhamptom, Massachusetts, USA) gemessen. Dabei wurden ca. 40 µM TmpK in der Meßzelle im DSC-Puffer mit einer Heizrate von 60 $°C \cdot h^{-1}$ von 20 °C auf 100 °C erhitzt. Die Referenzzelle enthielt nur DSC-Puffer. Die erhaltene Schmelzkurve wurde nach der Korrektur um die Referenzmessung (Puffer in beiden Zellen) mit dem Programm MicroCal Origin für DSC (Version 4.1, MicroCal Software Incorp., Northhampton, Massachusetts, USA) unter der Annahme ausgewertet, daß sich die Wärmekapazität des Enzyms bei konstantem Druck im nativen und denaturierten Zustand nicht unterscheidet ($\Delta_d c_p = 0$). Dabei wurde ein „Mehrübergangsmodell“ (*non-two-state transition* Modell), das durch die folgenden Gleichungen 8 und 9 iterativ beschrieben werden kann (Appendix, Kapitel 8.5.2), zugrundegelegt:

(Gl. 8)
$$c_p(T) = \sum_{i=A}^{Z} \frac{K_{m,i}(T)\Delta H^{v}_{m,i}\, H^{c}_{m,i}}{\left(1+K_{m,i}(T)\right)^2 RT^2}$$

(Gl. 9)
$$K_{m,i}(T) = e^{\left(\frac{-\Delta H^{v}_{m,i}}{RT}\left(1-\frac{T}{T_m}\right)\right)}$$

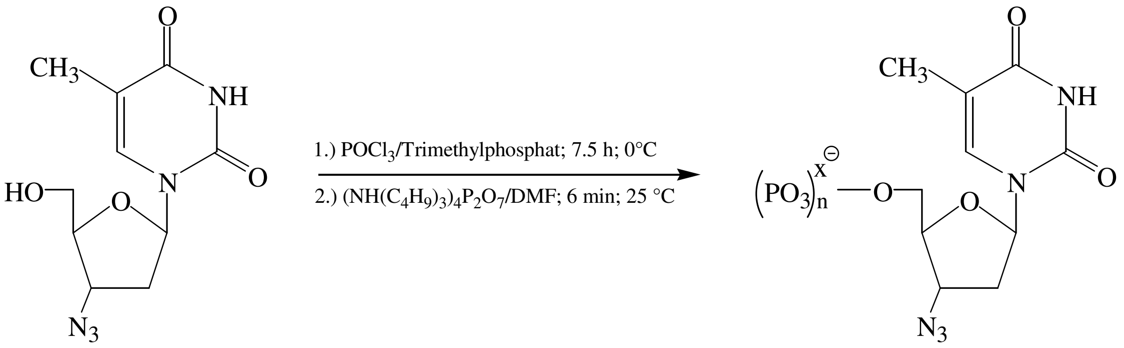
i:	Anzahl der strukturellen Domänen eines Proteins
$c_p(T)$:	Wärmekapazität bei konstantem Druck in $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$
$K_{m,i}(T)$:	Gleichgewichtskonstante des Schmelzprozesses für die i-te strukturelle Einheit in $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$
$\Delta H^{v}_{m,i}$:	van’t Hoff’sche Schmelzenthalpie für die i-te strukturelle Einheit in $J \cdot mol^{-1}$
$H^{c}_{m,i}$:	kalorimetrische Schmelzenthalpie für die i-te strukturelle Einheit in $J \cdot mol^{-1}$
R:	universelle Gaskonstante in $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$
T:	aktuelle Meßtemperatur in K
T_m:	Schmelztemperatur des Enzyms in K

DSC-Puffer: 100 mM KCl, 20 mM HEPES/NaOH pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$.

2.2.11 Synthesen

Feststoffe wurden, wenn nötig, wie in den Synthesevorschriften beschrieben getrocknet. Die notwendigen Lösungsmittel wurden nach Standardmethoden [73] absolutiert. Die Phosphorylierung von AZT wurde ebenfalls in Anlehnung an eine Standardmethode [74] durchgeführt.

2.2.11.1 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidin-5'-mono- und 5'-triphosphat



Triphosphat: n=3 und x=4
Monophosphat: n=1 und x=2

Abb 12: Phosphorylierung von AZT zum Mono- und triphosphat.

In einem ausgeglühten Zweihalskolben mit Schwanzhahn und Septum wurden unter Argonatmosphäre 450 mg (1.7 mmol) über P_2O_5 getrocknetes 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidin in 4.5 ml trockenem Trimethylphosphat vorgelegt. Nach Abkühlen auf 0 °C wurden 2 g (1.2 ml / 12.76 mmol) Phosphorylchlorid durch das Septum hinzugefügt. Die Lösung wurde 7.5 h bei 0 °C gerührt und überschüssiges Phosphorylchlorid bei 0 °C und 0.1 mbar innerhalb von 2 h abdestilliert. Danach wurde die Reaktionsmischung auf 25 °C erwärmt und eine Lösung von 4 g (9.6 mmol) über P_2O_5 getrocknetem Tributylammoniumpyrophosphat und 600 mg (285 µl / 3.2 mmol) trockenem Tributylamin in 10 ml trockenem N,N-Dimethylformamid hinzugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 6 min bei 25 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml einer 250 mM Triethylammoniumhydrogencarbonat-Lösung gestoppt. Nach 12 h Hydrolyse bei 4 °C wurden zur Kontrolle 2 µl der Reaktionsmischung auf die HPLC-Säule aufgetragen. Danach wurde der Reaktionsansatz durch Anionenaustauschchromatographie bei 4 °C gereinigt (l = 20 cm, d = 2.5, 100 g

Sephadex A 25; 0-1 M Gradient Triethylammoniumhydrogencarbonat). Die Eluate zwischen 180 mM und 300 mM Triethylammoniumhydrogencarbonat (AZTMP) bzw. 400 mM und 560 mM (AZTTP) wurden i. Vak. bei 30 °C am Rotationsverdampfer konzentriert und anschließend lyophylisiert; Ausb. 212 mg (390 µmol ≙ 22 %) Monophosphat und 532 mg (582.5 µmol ≙ 33 %) Triphosphat.

Monophosphat: $C_{22}H_{40}N_7O_7P$ (545) **Triphosphat: $C_{34}H_{76}N_9O_{13}P_3$ (913)**

$^{31}P\{^1H\}$-NMR (Monophosphat): δ = -0.62 (s; α-Phosphat).

$^{31}P\{^1H\}$-NMR (Triphosphat): δ = -9.73 (t; β-Phosphat); -12.45 (d; α-Phosphat); -22.4 (d; γ-Phosphat).

2.2.11.2 3’-Azido-2’,3’-dideoxythymidin-5’-diphosphat

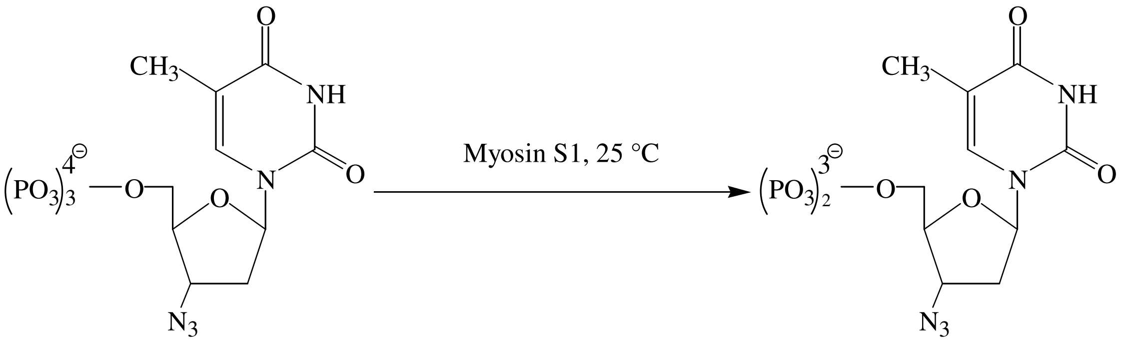


Abb. 13: Hydrolyse von AZTTP durch das Muskelenzym Myosin S1 bei 25 °C.

Zu einer Lösung von 425 mg (466 µmol) 3’-Azido-2’,3’-dideoxythymidintriphosphat in 24 ml Reaktionspuffer (50 mM TRIS/HCl pH 7.5; 100 mM KCl, 60 mM $CaCl_2$) wurden insgesamt 5 ml einer 44 µM Myosin S1-Lösung im Reaktionspuffer in 1 ml- Portionen nach 0h, 8h, 24h, 32h und 48h zugegeben. Myosin S1 wurde von der Arbeitsgruppe Geeves (Universität Canterbury) zur Verfügung gestellt. Nach insgesamt 120 h bei 25 °C ohne Rühren im Wasserbad wurden 10 g (167 mmol) Harnstoff hinzugefügt. Das während der Reaktion ausgefallene Calciumphosphat wurde pelletiert und der Überstand zur Abtrennung des denaturierten Myosins bei 4 °C mit einem Vivaspin-Konzentrator (10 kDa MWCO, Vivascience Limited, Binbrook Hill, GB) bis zur Trockene zentrifugiert. Danach wurde der Reaktionsansatz durch Anionenaustauschchromatographie gereinigt (l = 20 cm, d = 2.5, 100 g Sephadex A 25;

0-1 M Gradient Triethylammoniumhydrogencarbonat). Das Eluat zwischen 310 mM und 450 mM Triethylammoniumhydrogencarbonat wurde i. Vak. bei 30 °C am Rotationsverdampfer konzentriert und anschließend lyophylisiert; Ausb. 142.5 mg (196.5 µmol ≙ 42 %) hellgelber Feststoff.

$C_{28}H_{56}N_8O_{10}P_2$ (726)

$^{31}P\{^1H\}$-NMR: δ = -9.30 (d; α-Phosphat); -12.62 (d; β-Phosphat).

2.2.11.3 Reinigung und HPLC-Kontrolle der AZT-Phosphate

Reinigung:

Säule:	Säule (Ø = 2.5 cm) mit 100g Anionentauscher Sephadex A-25
Flußrate:	3 ml·min^{-1}
Detektion:	254 nm
Laufmittel:	Puffer A: deionisiertes Wasser pH 7.5 Puffer B: 1 M Triethylammoniumhydrogencarbonat pH 7.5

Zeit(min)	Fluß(ml·min^{-1})	A(%)	B(%)
Start	3	95	5
60	3	95	5
420	3	20	80
430	3	0	100
460	3	0	100
465	3	95	5
500	3	95	5

Tab. 5: Reinigungsprotokoll für die AZT-Derivate.

HPLC-Bedingungen:

Säule:	ODS Hypersil Reversed Phase C-18, 5 µm, 120 Å, 250x4.6 mm
Flußrate:	1.5 ml·min^{-1}
Detektion:	254 nm
Retentionszeiten	AZTMP: 14.2 min AZTDP: 16.0 min AZTTP: 17.4 min
Laufmittel:	A: 100 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 6.5; 10 mM TBAB B: 100 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 6.5; 10 mM TBAB; 50 % CH_3CN

Zeit(min)	Fluß(ml·min^{-1})	A(%)	B(%)
Start	1.5	100	0
3	1.5	100	0
33	1.5	0	100
34	1.5	100	0
40	1.5	100	0

Tab. 6: HPLC-Programm für die Reaktionskontrolle der AZT-Phosphatsynthesen.

2.2.11.4 P$_{(\beta)}$-MAHA-Thymidin-5'-diphosphat

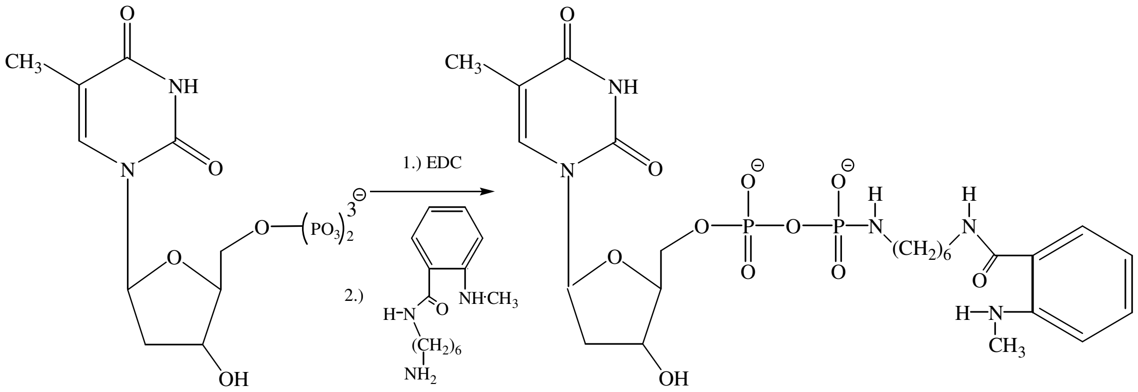


Abb 14: Fluoreszenzmarkierung von dTDP an der β-Phosphatgruppe.

Zu einer Lösung von 10 mg (23 µmol) dTDP in 1 ml 100 mM MES/NaOH pH 6.7 wurden bei 50 °C 10 mg (52 µmol) 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid und 100 µl einer 100 mM Suspension von N-(6'-Aminohexyl)-2-(methylamino)benzoylamid in Acetonitril hinzugefügt (zur Synthesestrategie fluoreszierender Benzoylamide siehe [75-77]). Nach 3 h Reaktionszeit wurden weitere 10 mg (52 µmol) 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid hinzugegeben. Nach insgesamt 5 h Reaktionsdauer (HPLC-Kontrolle!) wurde der Reaktionsansatz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nach dem Auftauen durch HPLC gereinigt und anschließend lyophylisiert; Ausb. 8.6 mg (10.4 µmol ≙ 45%) farbloser Feststoff.

$C_{35}H_{67}N_7O_{11}P_2$ (823)

^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz; TSP): δ = 1.29 (t; 18H; CH_3; $(CH_3CH_2)_3NH^+$-Gegenion); 1.55 (m; 2H; 2'-H); 1.90 (m; 8H; $(CH_2)_4$); 1.99 (s; 3H; 5-CH_3); 2.83 (s; 3H; Aryl-NCH_3); 3.21 (q; 12H; CH_2; $(CH_3CH_2)_3NH^+$-Gegenion); 3.33 (m; 4H; $N(CH_2)$); 3.52 (m; 1H; 3'-H); 3.75 (m; 1H; 4'-H); 4.13 (m; 2H; 5'-H); 6.29 (t; 1H; 1'-H); 6.85 (m; 1H; Aryl-4-H); 6.91 (d; 1H; Aryl-6-H); 7.43 (d; 1H; Aryl-3-H); 7.45 (m; 1H; Aryl-5-H); 7.72 (s; 1H; H-6).

^{31}P-NMR (D_2O; 500 MHz, PO_4^{3-}): δ = -1.23 (d; α -Phosphat); -11.32 (d; β -Phosphat).

ESI-MS (negativer Ionenmodus): 632.1 g·mol^{-1}, erwartet wurden 631.5 g·mol^{-1}.

2.2.11.5 $P_{(\beta)}$-MABA-Adenosin-5'-diphosphat

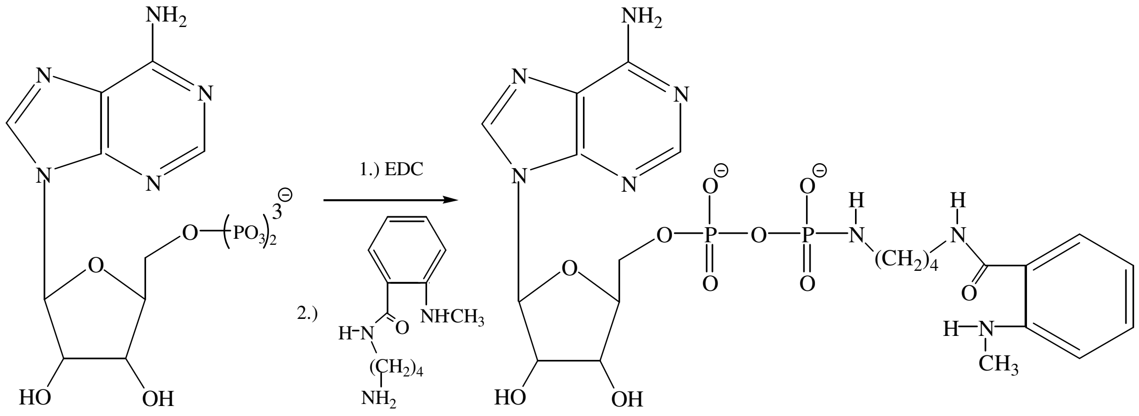


Abb. 15: Fluoreszenzmarkierung von ADP an der β-Phosphatgruppe.

Zu einer Lösung von 100 mg (234 µmol) ADP in 1 ml 100 mM MES/NaOH pH 6.7 wurden bei 50 °C 179.4 mg (936 µmol) 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid und 99.5 mg (450 µmol) N-(4'-Aminobutyl)-2-(methylamino)benzoylamid hinzugefügt (zur Synthesestrategie fluoreszierender Benzoylamide siehe [75-77]). Nach 35 min Reaktionszeit (HPLC-Kontrolle!) wurde der Reaktionsansatz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nach dem Auftauen durch HPLC gereinigt und anschließend lyophylisiert; Ausb. 60 mg (72.1 µmol ≙ 31%) farbloser Feststoff.

$C_{34}H_{62}N_{10}O_{10}P_2$ (834)

^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz; TSP): δ = 1.29 (t; 18H; CH_3; $(CH_3CH_2)_3NH^+$-Gegenion); 1.93 (m; 4H; $(CH_2)_2$); 2.78 (s; 3H; Aryl-NCH_3); 2.91 (m; 4H; $N(CH)_2$); 3.21 (q; 12H; CH_2; $(CH_3CH_2)_3NH^+$-Gegenion); 3.74 (m; 1H; 4'-H); 4.23 (m; 2H; 5'-H); 4.37 (m; 1H; 3'-H); 4.49 (m; 1H; 2'-H); 6.08 (d; 1H; 1'-H); 6.72 (m; 1H; Aryl-4-H); 6.79 (d; 1H; Aryl-6-H); 7.30 (d; 1H; Aryl-3-H); 7.37 (m; 1H; Aryl-5-H); 8.16 (s; 1H; H-2); 8.47 (s; 1H; H-8).

^{31}P-NMR (D_2O; 500 MHz, PO_4^{3-}): δ = -1.24 (d; α -Phosphat); -11.29 (d; β -Phosphat).

ESI-MS (negativer Ionenmodus): 629.1 g·mol^{-1}, erwartet wurden 629.4 g·mol^{-1}.

2.2.11.6 $P_{(\gamma)}$-MABA-Adenosin-5'-triphosphat

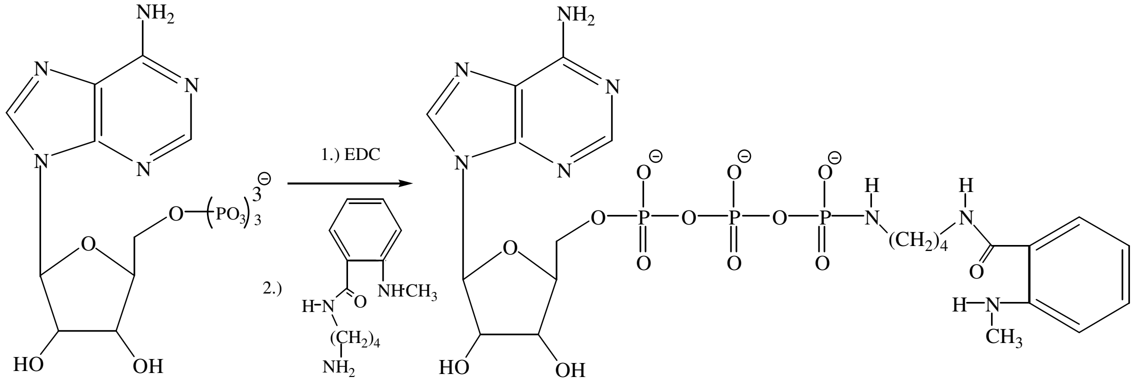


Abb. 16: Fluoreszenzmarkierung von ATP an der γ-Phosphatgruppe.

Zu einer Lösung von 100 mg (184 µmol) ATP in 1 ml 100 mM MES/NaOH pH 6.7 wurden bei 50 °C 139 mg (724 µmol) (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid und 88.4 mg (400 µmol) N-(4'-Aminobutyl)-2-(methylamino)benzoylamid hinzugefügt (zur Synthesestrategie fluoreszierender Benzoylamide siehe [75-77]). Nach 35 min Reaktionszeit (HPLC-Kontrolle!) wurde der Reaktionsansatz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nach dem Auftauen durch HPLC (ODS Hypersil Reversed Phase C-18, 5 µM, 120 Å, 250x8 mm) gereinigt und anschließend lyophylisiert; Ausb. 42.8 mg (42.3 µmol ≙ 23%) farbloser Feststoff.

$C_{40}H_{78}N_{11}O_{13}P_3$ (1013)

^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz; TSP): δ = 1.29 (t; 27H; CH_3; $(CH_3CH_2)_3NH^+$-Gegenion); 1.92 (m; 4H; $(CH_2)_2$); 2.78 (s; 3H; Aryl-NCH_3); 2.91 (m; 4H; $N(CH)_2$); 3.21 (q; 18H; CH_2; $(CH_3CH_2)_3NH^+$-Gegenion); 3.78 (m; 1H; 4'-H); 4.26 (m; 2H; 5'-H); 4.38 (m; 1H; 3'-H); 4.53 (m; 1H; 2'-H); 6.08 (d; 1H; 1'-H); 6.71 (m; 1H; Aryl-4-H); 6.78 (d; 1H; Aryl-6-H); 7.31 (d; 1H; Aryl-3-H); 7.35 (m; 1H; Aryl-5-H); 8.16 (s; 1H; H-2); 8.45 (s; 1H; H-8).

^{31}P-NMR (D_2O; 500 MHz, PO_4^{3-}): δ = -2.83 (d; α -Phosphat); -13.35 (d; γ -Phosphat); -24.73 (t; β-Phosphat)

ESI-MS (negativer Ionenmodus): 709.1 g·mol^{-1}, erwartet wurden 708.4 g·mol^{-1}.

Anmerkung: Die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der phosphatmodifizierten Fluoreszenzverbindungen erfolgte wie beschrieben [76]. Die Extinktionskoeffizienten für verschiedene fluoreszierende Nukleotidanaloge sind in Tabelle 5 (Kapitel 2.2.6.2; Bestimmung von Nukleotidkonzentrationen) zusammengestellt.

2.2.11.7 HPLC-Reinigung und-Kontrolle der Fluorophore

HPLC-Bedingungen:

Säule:	ODS Hypersil Reversed Phase C-18, 5 µm, 120 Å, 250x8 mm
Flußrate:	2 ml·min^{-1}
Detektion:	Absorption bei 254 nm und 325 nm; Fluoreszenzsexcitation/emission: 335 nm/ 440nm
Laufmittel:	A: 100 mM Triethylammoniumacetat pH 7.0 B: 100 mM Triethylammoniumacetat pH 7.0; 70 % CH_3CN

Zeit(min)	Fluß(ml·min^{-1})	A(%)	B(%)
Start	2	70	30
7	2	70	30
7.1	2	0	100
12	2	0	100
12.1	2	70	30
20	2	70	30

Tab. 7: HPLC-Programm für die präparative Reinigung der phosphatmodifizierten Fluorophore.

Nukleotid	**mittlere Retentionszeit/min**
dTDP	3.8
$P_{(\beta)}$-MAHA-TDP	7.5
ADP	3.8
$P_{(\beta)}$-MABA-ADP	7.6
ATP	3.8
$P_{(\gamma)}$-MABA-ATP	5.7
N-(4'-Aminobutyl)-2-(methylamino)benzoylamid	11.0
N-(6'-Aminohexyl)-2-(methylamino)benzoylamid	11.2

Tab. 8: Übersicht über die mittleren Retentionszeiten der Substrate für das zur präparativen HPLC-Reinigung verwendete Protokoll.

2.2.12 Proteinexpression und Proteinreinigung

In diesem Abschnitt wird die Expression und Reinigung von GST-TmpK beschrieben. Die Reinigung von Proteinen erfolgte mit der in Abschnitt 2.2.5 beschriebenen Waters-Chromatographie-Anlage. Die Nukleoside Adenosin und Thymidin wurden zur Stabilisierung der Enzyme den Puffern zugesetzt. Die Nukleoside wurden vor Verwendung des Enzyms in Messungen mit einer NAP^{TM}-5 Gelfiltrationssäule (Pharmacia, Uppsala, Schweden) entfernt. Alle verwendeten Laufmittel wurden vor Benutzung filtriert und im Wasserstrahlvakuum entgast.

Schritt 1: Zellzucht

Bakterien wurden in LB-Medium (10 $g \cdot l^{-1}$ Trypton, 5 $g \cdot l^{-1}$ Hefe-Extrakt, 5 $g \cdot l^{-1}$ NaCl) gezogen, dem das Antibiotikum Ampicillin (100 $mg \cdot l^{-1}$) zugesetzt wurde. Die Zellzucht erfolgte in einem Schüttelinkubator. Dabei wurde von einer Nährplatte zunächst eine 2.5 ml Vorkultur (Vorkultur 1) angeimpft. Nach Erreichen einer $OD_{600nm} \approx 3$ (9h bei 37 °C) wurden die Bakterien in 250 ml Medium (Vorkultur 2) kultiviert. Nach weiteren 12h bei 37 °C und Erreichen einer $OD_{600\ nm} \approx 3$ wurden sechs 2.5 l Kulturen mit ca. 25 ml der Vorkultur 2 angeimpft ($OD_{600\ nm,\ Anfang} \approx 0.03$). Nach Erreichen einer $OD_{600nm} \approx 0.6$ bei 37 °C wurde die Temperatur für die Proteinsynthese rechtzeitig auf 20 °C vermindert. Vor der Induktion mit 1 mM IPTG wurden erneut 100 $mg \cdot l^{-1}$ Ampicillin zugesetzt. Die Proteinsynthese wurde dann 18 h bei 20 °C durchgeführt. Die

Bakterien wurden anschließend zentrifugiert (Sorvall RC-3B plus-Zentrifuge, H6000A-Rotor, 5000 rpm, 4 °C; 20 min), durch Resuspension in ca. 10 ml 50 mM TRIS/HCl pH 7.5 pro Liter Zellkultur und erneute Zentrifugation (Sorvall RC-3B plus-Zentrifuge, H6000A-Rotor, 5000 rpm, 4 °C; 20 min) gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C aufbewahrt (Ausbeute ca. 80 g Zellen).

Schritt 2: Zellaufschluß

Die Bakterienzellen wurden im Aufschlußpuffer (150 mM KCl, 50 mM TRIS/HCl pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM EDTA, 2 mM PMSF, 10 Vol-% Glycerin) aufgetaut und homogenisiert (Homogenisator von Novodirect GmbH, Kehl, Deutschland). Es wurden ca. 3 ml Puffer pro Gramm Zellen verwendet. Der Zellaufschluß erfolgte zweimal unter Eiskühlung im Microfluidizer (Microfluidics, Newton, Massachusetts, USA) bei einem Druck von 600 kPa. Zelltrümmer wurden durch Ultrazentrifugation (Beckman-Ti-45 Rotor; 40000 rpm, 4 °C, 60 min) pelletiert und der Überstand weiterverarbeitet (Proteinausbeute: ca. 5000 mg).

Schritt 3: Ammoniumsulfatfällung

Die exprimierten GST-Fusionsproteine konnten nach eigenen experimentellen Befunden nicht in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Zur Lagerung wurde jeweils eine Ammoniumsulfatfällung bis zur 90 %-igen Sättigung durchgeführt. Dazu wurde die entsprechende Menge Ammoniumsulfat unter vorsichtigem Rühren bei Raumtemperatur zur Proteinlösung hinzugegeben. Zur Vervollständigung der Fällung wurde noch 30 min bei 4 °C nachgerührt und das gefällte Protein durch Ultrazentrifugation (Beckman Ti-45-Rotor, 40000 rpm, 4 °C, 45 min) pelletiert.

Schritt 4: Glutathion-Sepharose 4B-Säule (40 ml Säulenvolumen)

Die Reinigung mit der Glutathion-Sepharose 4B erfolgte bei 4 °C. Das Ammoniumsulfatpellet (Zahl der Pellets war abhängig von der Menge des verwendeten Säulenmaterials und der abgeschätzen Konzentration des GST-Fusionsproteins) wurde in Puffer A gelöst, zentrifugiert (Beckman Ti-45-Rotor, 40000 rpm, 4 °C, 45 min) und auf die Säule aufgetragen. Die Nukleotidbefreiung von TmpK (4 °C) wurde mit alkalischer Phosphatase in einem geschlossenen Pufferkreislauf erreicht. Für die Stabilisierung des nukleotidfreien Proteins wurden Adenosin und Thymidin verwendet. Die Proteinpeaks konnten deshalb nicht mit Hilfe des Absorptionsdetektors aufgezeichnet werden. Die Elution des Proteins mußte mit der Bradford-Färbemethode verfolgt werden. Die Zeit für die Reaktion mit Thrombin (während der Reaktion wurde wiederum ein geschlossener Pufferkreislauf innerhalb der Säule aufrechterhalten) variierte in Abhängigkeit von der Mutante. In der Tabelle ist deshalb eine durchschnittliche Reaktionszeit angegeben. Für die Reinigung mit der Glutathion Sepharose 4B wurden folgende Puffer und das in der Tabelle 9 beschriebene Reinigungsprotokoll verwendet:

Puffer A: 150 mM KCl, 50 mM TRIS/HCl pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM EDTA, 2 mM PMSF, 10 Vol-% Glycerin.

Puffer B: 5 mM Thymidin, 5 mM Adenosin, 150 mM KCl, 50 mM TRIS/HCl pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM EDTA, 10 Vol-% Glycerin.

Puffer C: 50 mM TRIS/HCl pH 7.5, 10 mM reduziertes Glutathion.

Puffer D: 50 mM TRIS/HCl pH 7.5, 3 M KCl.

Schritt	**Zeit (h)**	**Flußrate ($ml \cdot min^{-1}$)**	**A (%)**	**B (%)**	**C (%)**	**D (%)**	**Anmerkung**
Start	0	3	100	0	0	0	
Laden	0.5	3	100	0	0	0	$V_{Auftrag}$=75 ml
Waschen 1	3	3	0	100	0	0	Bradford-Test
Nkt.-befreiung	15	1	0	100	0	0	10U AP ü. N.
Waschen 2	17	3	0	100	0	0	AP-Befreiung
Schneiden	21	2	0	100	0	0	50U Thrombin 4h
TmpK-Elution	21.5	3	0	100	0	0	Bradford-Test
GST-Elution	22.5	3	0	0	100	0	
Hochsalz	24	3	0	0	0	100	

Tab. 9: Reinigungsprotokoll für die Glutathion-Sepharose 4B.

Das konzentrierte TmpK-Eluat, das jetzt in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden konnte, wurde zur Abtrennung von Thrombin noch einer S75-Gelfiltration unterzogen. Eine Benzamidin-Sepharose 6B-Säule für die spezifische Entfernung der Serin-Protease Thrombin war wegen des im Puffer enthaltenen Glycerins nach eigenen experimentellen Befunden wirkungslos (Ausbeute nach der Glutathion-Sepharose 4B-Säule: ca. 900 mg).

Schritt 5: S75-Gelfiltration

Das Eluat der Glutathion-Sepharose 4B wurde nach dem Programm in Tabelle 10 mit einer S75-Gelfiltrationssäule bei Raumtemperatur gereinigt (Ausbeute ca. 850 mg). Dazu wurde folgender Puffer verwendet:

Puffer A: 200 mM KCl, 50 mM TRIS/HCl pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA, 5 mM Thymidin, 5 mM Adenosin, 10 Vol-% Glycerin.

Schritt	**Zeit (min)**	**Flußrate ($ml\cdot min^{-1}$)**	**A (%)**	**Anmerkung**
Start	0	2	100	
Lauf	120	2	100	Probenkollektion: 3 min pro Fraktion; Pool: Fraktionen 25 - 28

Tab. 10: Reinigungsprotokoll für die S75-Gelfiltration.

Schritt 6: Dialyse gegen Lagerpuffer

Die TmpK-Fraktion der Gelfiltration wurde zweimal mindestens 4 h gegen jeweils 2 l Lagerpuffer bei 4 °C unter Rühren des Lagerpuffers dialysiert. Die Ausschlußgröße des verwendeten Dialyseschlauches war 12 kDa (Sigma, Taufkirchen, Deutschland).

Lagerpuffer: 25 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 20 mM TRIS/HCl pH 7.5, 5 mM Thymidin, 5 mM Adenosin, 10 Vol-% Glycerin.

Schritt 7: Konzentration des Enzyms

TmpK wurde bei 4°C mit Vivaspin-Konzentratoren (10 kDa MWCO, Vivascience Limited, Binbrook Hill, Großbritanien) bei 4000 rpm auf 20 bis 30 $mg \cdot ml^{-1}$ Protein konzentriert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots wurden bei –80 °C gelagert (Ausbeute: ca. 800 mg).

Schritt 8: Aktivitätstest

Die Aktivität der einzelnen Enzyme wurde bei jeweils einer bestimmten Konzentrationskombination von MgATP und dTMP im gekoppelten Enzymtest (Kapitel 2.2.7.1) überprüft. Es ergaben sich die in der Tabelle 11 zusammengestellten Aktivitäten:

TmpK	**[MgATP]/µM**	**[dTMP]/µM**	**k_{app}/s^{-1}**
hs, wt	50	50	0.46
hs, R200A	50	50	0.45
[a)]hs, R200A/R16G/*E. coli* small lid	100	100	0.44
[b)]hs, R200A/R16G/*E. coli* large lid	50	50	0.88
hs, R200A/F105Y	100	100	0.16
murin, wt	50	50	1.24

Tab. 11: Zusammenstellung der apparenten Umsatzzahlen verschiedener TmpK bei definierten Nukleotidkonzentrationen. [a)]: Die Aminosäuren ^{145}AFGH^{148} der humanen TmpK wurden ersetzt durch ^{151}RARGEL^{156} der *E. coli*-TmpK; [b)]: Die Aminosäuren ^{136}QLADAAKRGAFGH^{148} der humanen TmpK wurden ersetzt durch ^{142}TPEVGLKRARARGEL^{156} der *E. coli*-TmpK.

3 Ergebnisse

3.1 Präparative Reinigung von GST-Thymidylatkinasen

GST-Thymidylatkinasen wurden bisher lediglich im Batch-Verfahren gereinigt [78]. Für die große Menge einer nukleotidfreien Thymidylatkinase, die für die meisten kinetischen Untersuchungen (quenched-flow, ITC, stopped-flow, Gleichgewichtsfluoreszenzmessungen) erforderlich war, mußte zunächst eine geeignete präparative Reinigungsmethode entwickelt werden. Es zeigte sich, daß die Standardreinigung für GST-Fusionsproteine (Ammoniumsulfatfällung, Glutatathion-Sepharose 4B-Affinitätssäule und Größenausschlußchromatographie) nicht zu einem nukleotidfreien Enzym führte. Schwach gebundenes Nukleotid sollte durch die Denaturierung mit Ammoniumsulfat entfernt werden können. Trotzdem lag der Nukleotidgehalt noch zwischen 15 % und 60 %. Auch eine Größenausschlußchromatographie ohne Mg^{2+} zur Schwächung der Enzym-Nukleotid-Wechselwirkung zeigte nur bei der menschlichen wt-TmpK Erfolg. Der Nukleotidgehalt konnte hier auf unter 5 % gesenkt werden.

Zum vollständigen Nukleotidabbau wurde deswegen alkalische Phosphatase verwendet. Die Molekulargewichte von alkalischer Phosphatase und TmpK sind aber nahezu identisch, so daß die Nukleotidbefreiung auf der Glutathion-Sepharose 4B-Säule vor Abspaltung des GST-Proteins durch Thrombin erfolgen mußte. In diesem Fall war TmpK noch über das GST-Protein mit der Säule verbunden, so daß die alkalische Phosphatase ohne TmpK-Verlust eluiert werden konnte. Die Nukleotidfreiheit der mit alkalischer Phosphatase behandelten Thymidylatkinasen wurde mit HPLC nachgewiesen (Material und Methoden, Kapitel 2.2.8.1). Die nukleotidfreie TmpK verlor jedoch pro Stunde ca. 5 % ihrer Aktivität bei angenommener linearer Abhängigkeit der Aktivitätsabnahme von der Zeit. Sie mußte daher durch den Zusatz von 10 Vol-% Glycerin sowie Adenosin und Thymidin auf eine Konzentration von jeweils 5 mM zu allen bei der Reinigung verwendeten Puffern stabilisiert werden. Danach war die nukleotidfreie TmpK bei –80 °C lagerfähig.

TmpK und das GST-Fusionsprotein sind durch eine Aminosäurekette, die die Erkennungssequenz für die Serinprotease Thrombin darstellt [49], verbunden. Die Reaktionszeit mit Thrombin zur Trennung der Proteine variierte in Abhängigkeit von der Mutante. Bei den wt-Thymidylatkinasen aus Maus und Mensch hatte die Reaktionszeit nur geringe Bedeutung. Sowohl 4 h als auch 18 h Proteasereaktion führten nicht zu einem Abbau der Kinase. Die Mutanten der menschlichen Thymidylatkinase waren anfälliger gegenüber Sekundärschnitten durch Thrombin. Dies war ein Hinweis auf eine höhere Flexibilität bestimmter Regionen der Mutantenproteine, die so für die Protease zugänglicher wurden. Bei langen Reaktionszeiten konnte Thrombin dann auch unspezifische Schnitte verursachen. Bei den im Rahmen dieser Arbeit gereinigten Mutanten ($\text{hsTmpK}_{\text{R200A/F105Y}}$ und $\text{hsTmpK}_{\text{R200A/R16G/}E\text{ .coli small lid}}$) wurden nach 4 h Reaktionszeit ausreichende Ausbeuten ohne durch Thrombin verursachte Sekundärschnitte auch für Messungen erhalten, für die sehr viel Protein benötigt wurde (quenched-flow, ITC). So konnten beispielsweise aus 80 g Zellen ca. 800 mg nukleotidfreie $\text{hsTmpK}_{\text{wt}}$ gewonnen werden.

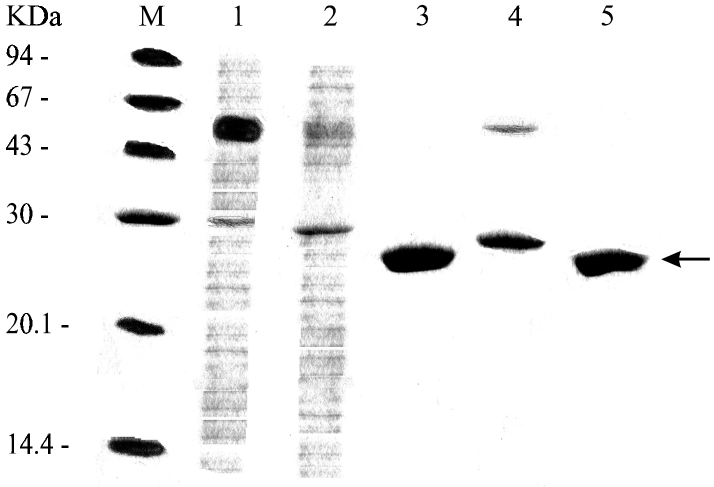


Abb. 17: SDS-PAGE zur $\text{hsTmpK}_{\text{wt}}$-Reinigung: (M) Marker (Material und Methoden, Kapitel 2.2.1); (1) Rohextrakt (GST-TmpK-Fusionsprotein, ca. 50 kDa); (2) Durchlauf Glutathion Sepharose 4B, (3) TmpK nach Glutathion Sepharose 4B, (4) GST-Protein nach Glutathion Sepharose 4B; (5) TmpK (Pfeil) nach Größenausschlußchromatographie (S75). Erkennbar ist, daß die Abtrennung der TmpK vom GST-Protein durch Thrombin (Spur 4) nicht vollständig war. Die TmpK-Fraktion (Spur 5) stellte sich nach der Gelfiltration als eine einzelne Bande dar, es waren keine Verunreinigungen durch Thrombin oder alkalische Phosphatase zu erkennen. Aufgetragen wurden ca. 10 µg pro Spur.

3.2 Synthesen

3.2.1 Synthese der 3’-Azido-2’,3’-dideoxythymidin-5’-phosphate

3’-Azido-2’,3’-dideoxythymidin-5’-monophosphat und 3’-Azido-2’,3’-dideoxythymidin-5’-triphosphat waren aus dem Nukleosid nach der Methode von Ludwig [74] sehr einfach zugänglich. Die Reaktionszeiten für die Bildung des Phosphorodichloridats (Abbildung 18) als Intermediat [79] und die anschließende Phosphorylierung mit Tributylammoniumpyrophosphat in trockenem DMF waren außergewöhnlich lang. Die Bildung des Phosphorodichloridats benötigte 7.5 h und die Phosphorylierung 6 min bei 25 °C. Als Vergleich sei beispielsweise die Phosphorylierung von C_8-(N’-Methylanthraniloylaminobutyl)aminoadenosin [75] genannt. Das Phosphorodichloridat bildete sich hier innerhalb 1 h, die Phosphorlyierung geschah in ca. 1 min bei 0 °C. Auch die Ausbeuten dieser Reaktionen (22 % Mono- und 33 % Triphosphat) waren deutlich geringer als bei C_8-(N’-Methylanthraniloylaminobutyl)aminoadenosin.

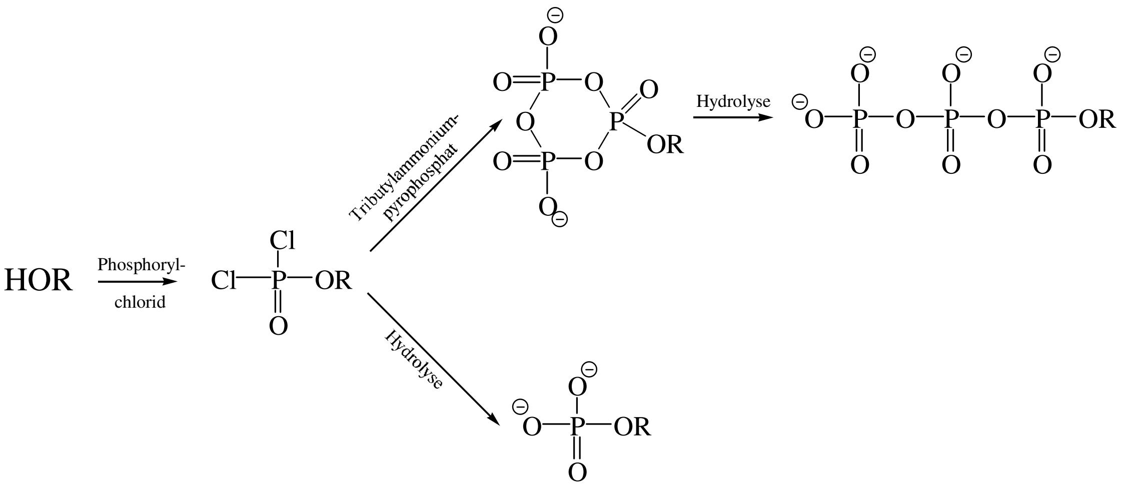


Abb. 18: Phosphorylierung von AZT: Die Hydrolyse des Phosphorodichloridats hat als Reaktionsprodukt das Monophosphat, die Hydrolyse des sechsgliedrigen Übergangszustands [75] ergibt das Triphosphat.

Offensichtlich verminderte die 3’-Azidogruppe die Nukleophilie der 5’-Hydroxyl-Gruppe. Eine mögliche Erklärung ist ein negativer I-Effekt der Azidogruppe, der die Elektronendichte an der 5’-Position beeinflußt. Zusätzlich kann die nukleophile

Substitutionsreaktion noch durch die unterschiedlichen Konformationen einer Ribose und einer 2’-Deoxyribose (sog. *sugar pucker*) [80] sterisch beeinträchtigt werden.

Ein Nachteil dieser Reaktionführung war die nur indirekte Zugänglichkeit des 3’-Azido-2’,3’-dideoxythymidin-5’-diphosphats. Da die Phosphorylierung einen sechsgliedrigen Übergangszustand durchläuft [74], kann nur das Pyrophosphation $P_2O_7^{4-}$ als Nukleophil fungieren. Mit dem Phosphation PO_4^{3-} als notwendigem reaktiven Teilchen zur Bildung des Diphosphats müßte ein viergliedriger Übergangszustand durchlaufen werden, der aber wahrscheinlich aufgrund der entstehenden hohen Baeyer-Spannung nicht gebildet wird. Der Versuch, das Diphosphat trotzdem auf diesem Weg zu erzeugen, führte entsprechend einer HPLC-Analyse zu einem komplexen Produktgemisch, das nicht näher untersucht wurde. Als Möglichkeiten zur Synthese des Diphosphats standen ein enzymatischer Abbau des Triphosphats oder eine Phosphorylierung des Monophosphats, die literaturbekannt ist [81], zur Verfügung. Wegen der schwierigen Reaktionsführung bei der Phosphorylierung eines Monophosphats wurde die erste Syntheseroute, der enzymatische Abbau des 3’-Azido-2’,3’-dideoxythymidin-5’-triphosphats, gewählt. Mit dem Fragment S1 des Muskelenzyms Myosin (zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Geeves, Universität Canterbury) konnte das Triphosphat selektiv zum Diphosphat hydrolysiert werden. Der Zusatz von $CaCl_2$ zur Reaktionslösung erwies sich als außerordentlich wichtig. Die Bildung von schwerlöslichem $Ca_3(PO_4)_2$, das die Entfernung eines Reaktionsprodukts (PO_4^{3-}) aus dem Gleichgewicht zur Folge hatte, trieb die Reaktion mit befriedigender Ausbeute (44 %) in die gewünschte Richtung. Die Reinigung der Azidothymidinderivate gelang mit dem Anionenaustauscher Sephadex A-25 in einem linearen Gradienten bis 1 M Triethylammoniumhydrogencarbonat.

3.2.2 Phosphatmodifizierte fluoreszierende Nukleotidanaloge

NMP-Kinasen haben eine sehr hohe durch die Nukleobase und die Ribose vermittelte Spezifität für das Nukleosidmonophosphat [76]. Die Einführung eines fluoreszierenden Substituenten zur Synthese einer spektroskopischen Sonde ist daher weder an der Ribose noch an der Base möglich. Die einzig verbleibende Position für eine Fluoreszenzmarkierung ist die Phosphatgruppe. Um den Fluorophor in der Nukleotidbindungstasche für ATP bzw. ADP zur Vermeidung sterischer

Wechselwirkungen plazieren zu können, ist die Einführung einer Kohlenwasserstoffkette als Verbindung (sog. *linker*) zwischen dem fluoreszierenden Substituenten und der Phosphatgruppe notwendig. Die Synthese eines solchen Fluorophors für UmpK, basierend auf Cytidin-5'-diphosphat, wurde in unserer Arbeitsgruppe erfolgreich durchgeführt [76]. Auch für TmpK konnte im Rahmen dieser Arbeit ein phosphatmodifiziertes fluoreszierendes Thymidin-5'-diphosphatanalog sowie entsprechende Adenosin-5'-diphosphat und -5'-triphosphatanaloge synthetisiert werden (Material und Methoden, Kapitel 2.2.11).

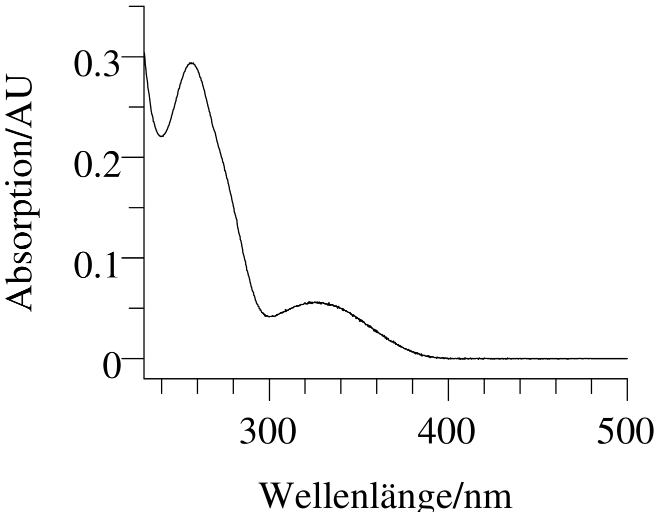


Abb. 19: Absorptionsspektrum von $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP bei 25 °C und pH 7.5 (TRIS/HCl-Puffer): Deutlich sind zwei Absorptionsmaxima (λ_{max1} = 335 nm; λ_{max2} =256 nm) zu erkennen. Das Maximum bei λ = 335 nm trat bei allen phosphatmodifizierten fluoreszierenden Nukleotiden auf, während die Wellenlänge für das zweite Absorptionsmaximum vom Nukleotid abhing.

Die Kopplung des fluoreszierenden Benzoylamids an die Nukleotide durch eine P-N-Bindung gelang sehr einfach bei pH 6.7 mit EDC, einer Kopplungsmethode, die für Arylamine und GTP bekannt ist [82]. Das einzige synthetische Problem war die hohe Reversibilität der Reaktion bei der Reaktionstemperatur von 50 °C, so daß per HPLC der richtige Moment zum Reaktionsabbruch durch Schockfrieren in flüssigem Stickstoff gefunden werden mußte. Die niedrigen Ausbeuten der Kopplungsreaktionen (20 –40 %) liegen wahrscheinlich in dieser hohen Reversibilität begründet. Fluorophore wurden in Messungen jedoch immer in relativ geringen Konzentrationen eingesetzt, so daß die Synthesen und Reinigungen aus Zeitgründen nicht weiter optimiert wurden. Alle phosphatmodifizierten fluoreszierenden Nukleotide waren nach chromatographischer

Aufarbeitung bei Raumtemperatur und neutralem pH-Wert stabil. Die Konstitution konnte durch NMR-Analysen und Massenspektren bewiesen werden. Alle synthetisierten Nukleotide zeigten ein charakteristisches Absorptionsspektrum mit zwei Absorptionsmaxima (Abb. 19). Die Absorption bei $\lambda = 325$ nm und pH = 7.5 bei einem Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon = 2.7 \cdot 10^{-3}$ $\mu M^{-1} \cdot cm^{-1}$ wurde zur präzisen Konzentrationsbestimmung verwendet.

3.3 Gleichgewichtsbindungsanalyse der Fluorophore

Zur kinetischen Charakterisierung von Fluorophoren gehörten die Überprüfung der Spezifität der Bindung durch Aufnahme von Emissions- und Excitationsspektren, die Bestimmung der Dissoziationskonstanten durch Gleichgewichtsmessungen sowie die Messung der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten mittels stopped-flow Technik. Das Excitations- und Emissionsverhalten fluoreszierender Chromophore hängt stark von der lokalen Umgebung des Chromophors ab. Die Wechselwirkung einer fluoreszierenden chromophoren Gruppe eines Liganden mit der enzymatischen Umgebung kann daher als sensitives Signal für die Bindung dienen [83]. Die Fluoreszenzausbeute steigt bei der Bindung des Signalgebers an ein Enzym, weil der Fluorophor mit einem hydrophoben Teil des Enzyms wechselwirkt. Das Quenchen der Fluoreszenz durch den im Wasser gelösten Sauerstoff wird dadurch verringert und die Quantenausbeute steigt [84]. Der in dieser Arbeit verwendete Fluorophor, die N-Methylanthraniloylgruppe (mant-Gruppe), wurde häufig für kinetische Untersuchungen benutzt [68, 87, 88]. Die Kopplung dieser signalgebenden Gruppe an Substrate (dTDP, ADP, ATP) bzw. Bisubstratanaloge (TP_5A) ließ eine spezifische Bindung dieser Fluorophore an TmpK erwarten. Bei einer Kompetition des nativen Substrats und des Fluorophors um die gleiche Bindungsstelle könnte eine damit in Verbindung stehende Signaländerung zur Ermittlung der Affinität des Liganden und der Ratenkonstanten der Bindung verwendet werden.

3.3.1 TP_5A-mant

3.3.1.1 Emissions- und Excitationsspektren

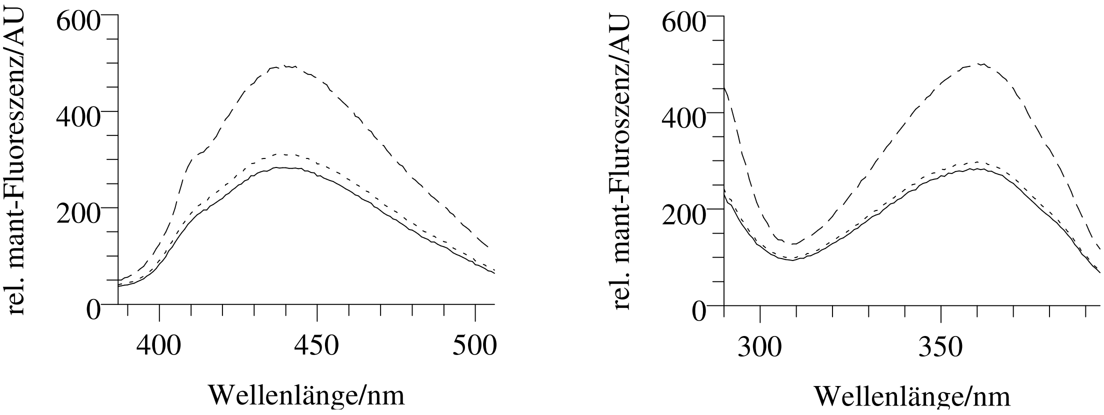


Abb. 20: Emissionsspektrum (links) und Excitationsspektrum (rechts) von 0.48 µM TP_5A-mant (—), 0.48 µM TP_5A-mant und 1µM $hsTmpK_{wt}$(--) sowie 0.48 µM TP_5A-mant, 1µM $hsTmpK_{wt}$ und 35 µM TP_5A (····) in Standardfluoreszenzpuffer bei 25 °C: Die Datenpunkte wurden jeweils mit Gl. 5 (Material und Methoden, Kapitel 2.2.9.1) volumenkorrigiert.

Zur Überprüfung der spezifischen Bindung von TP_5A-mant an menschliche wt-TmpK wurden Emissions- und Excitationsspektren aufgenommen (Abb. 20). Die durch die Bindung des Fluorophors an das Enzym verursachte Fluoreszenzerhöhung ließ sich durch einen Überschuß TP_5A vollständig aufheben. Die gemessene Fluoreszenzerhöhung war damit spezifisch und konnte für eine Bindungsanalyse verwendet werden. Eine leichte Verschiebung des Emissionsmaximums um 4 nm zu einer kürzeren Wellenlänge („Blauverschiebung“) ließ auf eine hydrophobe Umgebung des Fluorophors schließen [84]. Unter den gewählten Bedingungen (0.48 µM TP_5A-mant, 1 µM $hsTmpK_{wt}$) war der Fluorophor zu ca. 70 % mit Enzym gesättigt, so daß bei einem vollständig gesättigten Fluorophor eine Fluoreszenzzunahme um den Faktor 3 zu erwarten war.

3.3.1.2 Dissoziationskonstante $hsTmpK_{wt}$/TP_5A-mant

Danach konnte die Bestimmung der Dissoziationskonstante für dieses System durch eine Equilibriumsfluoreszenztitration erfolgen. Die Anwendung der quadratischen Gleichung [60] (Appendix, Kapitel 8.4.1) lieferte $K_{d,\,hsTmpK_{wt}}^{TP_5A-mant} = 336 \pm 38$ nM, der angegebenen Fehler ergab sich aus der Datenanalyse mit dem Programm GraFit (Version 3.01, Erithacus Software, Staines, GB). Dieser K_d-Wert lag im Bereich der Affinität fluoreszierender Bisubstratanaloge für AmpK [85] und UmpK [86].

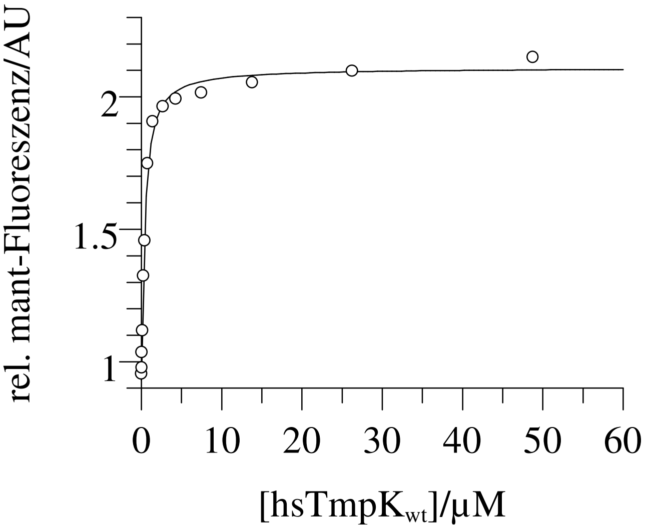


Abb. 21: Fluoreszenztitration zur Bestimmung $K_{d,\ hsTmpK_{wt}}^{TP_5A-mant}$ in Standardfluoreszenzpuffer bei 25 °C: Die Messung der mant-Fluoreszenz erfolgte bei [mant-TP_5A] = 0.2 µM. Die Konzentration des Fluorophors war nur halb so groß wie die Dissoziationskonstante, so daß diese gut bestimmt war.

3.3.1.3 Ermittlung der Bindungsstöchiometrie für TP_5A-mant

Die Bestimmung der Bindungsstöchiometrie gelang nach der Ermittlung der Dissoziationskonstante mit einer *active site* Titration. Dadurch konnte die Anzahl aktiver Bindungsstellen für den Fluorophor gemessen werden. Die Anfangskonzentration von TP_5A-mant betrug ungefähr das 20-fache des K_d-Werts, so daß nach jeder Enzymzugabe eine nahezu vollständige Bindung des Enzyms gewährleistet wurde. Die *active site* Titration von hsTmpK$_{wt}$ ist in der Abbildung 22 gezeigt, das Enzym war 100% bindungsaktiv bei einer Bindungsstöchiometrie von 1:1.

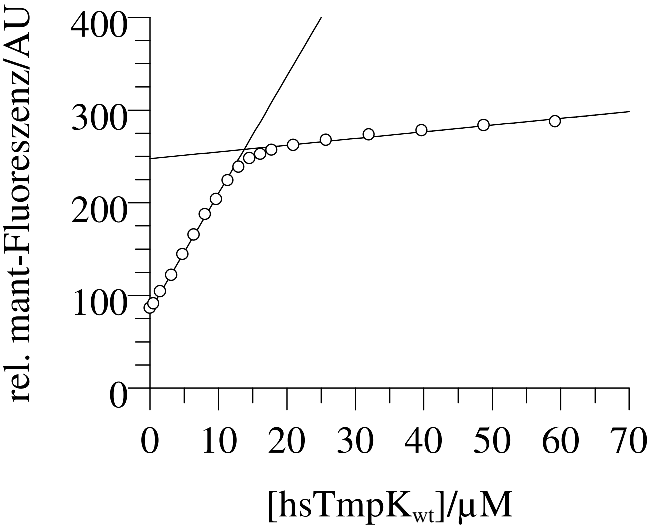


Abb. 22: *Active site* Titration von hsTmpK$_{wt}$: Die Zugabe des Enzyms erfolgte bei 25°C und 6 µM TP$_5$A-mant in Standardfluoreszenzpuffer. Die Extrapolation der beiden Geraden ergab einen Schnittpunkt bei [hsTmpK$_{wt}$] = 13.8 µM. Die Konzentration des Fluorophors an diesem Schnittpunkt betrug 5.9 µM, so daß zwei Monomere (= ein Dimer) TmpK ein Molekül TP$_5$A-mant gebunden hatten.

3.3.2 P$_{(\beta)}$-MAHA-TDP

3.3.2.1 Emissions- und Excitationsspektren

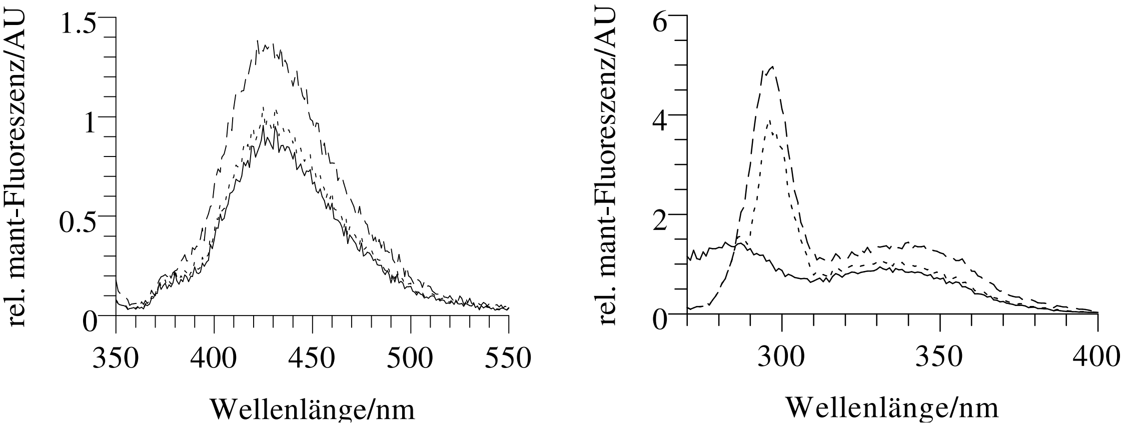


Abb. 23: Emissionsspektrum (links) und Excitationsspektrum (rechts) von 0.52 µM P$_{(\beta)}$-MAHA-TDP (—), 0.52 µM P$_{(\beta)}$-MAHA-TDP und 74 µM hsTmpK$_{wt}$(--) sowie 0.52 µM P$_{(\beta)}$-MAHA-TDP, 74 µM hsTmpK$_{wt}$ und 123 µM TP$_5$A (····) in Standardfluoreszenzpuffer: Unter diesen Bedingungen war der Fluorophor zu 60 % mit Enzym gesättigt, die Datenpunkte wurden mit Gl. 5 (Material und Methoden, Kapitel 2.2.9.1) volumenkorrigiert.

Die spezifische Bindung von P$_{(\beta)}$-MAHA-TDP an die menschliche wt-TmpK wurde ebenfalls durch Emissions- und Excitationsspektren überprüft (Abb. 23). Die durch die Bindung des Fluorophors an das Enzym verursachte Fluoreszenzerhöhung ließ sich durch einen Überschuß TP$_5$A aufheben. Eine leichte Verschiebung des Emissionsmaximums um 4 nm zu einer kürzeren Wellenlänge („Blauverschiebung“) ließ wiederum auf eine hydrophobe Umgebung des Fluorophors schließen [84]. Die 1.5-fache Fluoreszenzerhöhung bei einer 60 %-igen Sättigung des Fluorophors mit Enzym ließ auf eine ca. 3-fache Fluoreszenzzunahme bei vollständiger Sättigung schließen.

3.3.2.2 Dissoziationskonstante hsTmpK$_{wt}$/P$_{(\beta)}$-MAHA-TDP

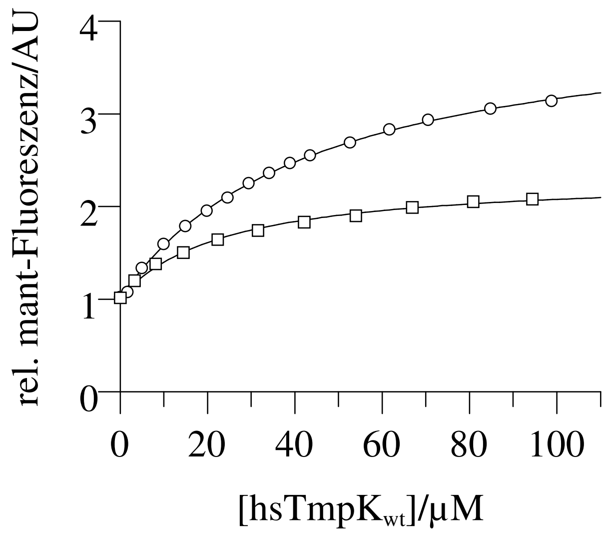


Abb. 24: Fluoreszenztitration zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten für P$_{(\beta)}$-MAHA-TDP bei der Bindung an hsTmpK$_{wt}$ in Standardfluoreszenzpuffer mit Mg^{2+} (○) und ohne Mg^{2+} (□): Die Messung der mant-Fluoreszenz erfolgte bei [P$_{(\beta)}$-MAHA-TDP] = 1.03 μM und 25 °C. In Anwesenheit von Mg^{2+} war die Fluoreszenzausbeute höher, es wurde eine maximal 4-fache Fluoreszenzerhöhung beobachtet, während die maximale Fluoreszenzerhöhung ohne Mg^{2+} nur das 2.3-Fache betrug.

Die Dissoziationskonstante für P$_{(\beta)}$-MAHA-TDP wurde sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Mg^{2+} bestimmt. Die mit der quadratischen Gleichung (Appendix, Kapitel 8.4.1) bestimmten Dissoziationskonstanten waren für die Bindung unter Beteiligung von Mg^{2+} $K^{P_{(\beta)}-\text{MAHA-TDP}}_{d,\,\text{hsTmpK}_{wt}+\text{Mg}^{2+}}$ = 44 ± 1 μM, ohne Mg^{2+} ergab sich $K^{P_{(\beta)}-\text{MAHA-TDP}}_{d,\,\text{hsTmpK}_{wt}-\text{Mg}^{2+}}$ = 26 ± 2 μM. Die großen Dissoziationskonstanten für P$_{(\beta)}$-MAHA-TDP, die mit Dissoziationskonstanten für ein analoges fluoreszierendes CDP-Derivat für UmpK übereinstimmten (K_d = 42 µM [76]), ließen keine *active site* Titration zu.

3.3.3 $P_{(\beta)}$-MABA-ADP und $P_{(\gamma)}$-MABA-ATP

Die Zugabe von $hsTmpK_{wt}$ zu $P_{(\beta)}$-MABA-ADP führte zu keiner Signaländerung. Offensichtlich ist die Butylkette des Linkers zu kurz für eine günstige Positionierung des Fluoreszenzlabels in der NMP/NDP Bindungstasche. Für $P_{(\gamma)}$-MABA-ATP konnte eine schwache Affinität ($K_{d,\mathrm{hsTmpK_{wt}}}^{P_{(\gamma)}-\mathrm{MABA-ATP}} \approx 300$ µM) abgeschätzt werden (Daten nicht gezeigt). Beide Fluorophore erwiesen sich somit für die Untersuchung der A-Bindestelle von TmpK als eher unbrauchbar im Vergleich zu TP_5A-mant. Mit $P_{(\gamma)}$-MABA-ATP konnte jedoch der ATPase-Zyklus des molekularen Chaperons Hsp90 aus *S. cerevisiae* analysiert werden [89].

3.3.4 Wechselwirkung von C8-MABA-AMP mit $hsTmpK_{wt}$

Bei den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen fiel auf, daß die Fluoreszenzausbeute des freien Fluorophors zu Beginn einer Messung stets etwas niedriger war als die Fluoreszenz nach der Verdrängung des Fluorophors durch einen Kompetitor. Bei einer kompetitiven Verdrängung hätten diese beiden Werte nach einer Volumenkorrektur gleich sein müssen, denn nach Beendigung der Verdrängung läge wiederum freier Fluorophor vor. Als Kontrollexperiment wurde deshalb die Bindung von C8-MABA-AMP [75] untersucht. Bei diesem Fluorophor ist die signalgebende mant-Gruppe über einen Butyllinker mit der C8-Position von Adenosin-5'-Monophosphat verbunden. Dieses Derivat sollte kein Signal zeigen, weil für eine fluoreszierende Gruppe an der C8-Position von AMP in der ADP/ATP Bindungstasche kein Platz vorhanden ist. Außerdem ist das Monophosphat aufgrund fehlender negativer Ladungen das falsche Substrat für TmpK. Trotzdem zeigten die Emissions- und Excitationsspektren (Abb. 25) einen Anstieg der Fluoreszenzausbeute bei der Mischung von C8-MABA-AMP und $hsTmpK_{wt}$. Diese Signalerhöhung war jedoch irreversibel, selbst ein 400-facher Überschuß an MgATP führte zu keiner Signalverminderung. Dieses Phänomen entstand wahrscheinlich durch eine unspezifische Wechselwirkung der hydrophoben mant-Gruppe mit dem äußerst hydrophoben Interface eines TmpK-

Dimers. Die mant-Gruppe ist über einen sehr flexiblen Diaminoalkyl-Linker mit dem Nukleotid verbunden, so daß es hier keine sterischen Hinderungen für eine unspezifische Wechselwirkung gab. Die Analyse der Bindung nichtfluoreszierender Nukleotide wurde durch dieses Phänomen, das in einem signifikanten Ausmaß nur bei $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP vorhanden war, außerordentlich erschwert.

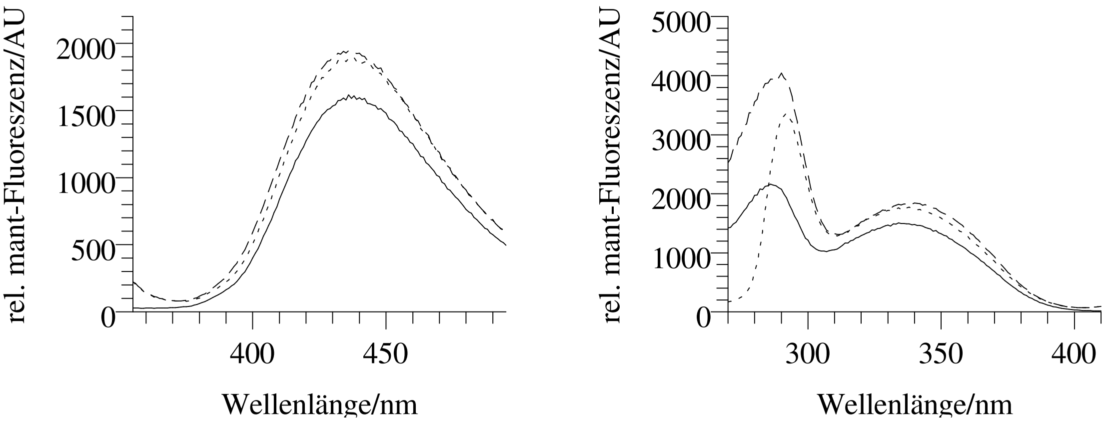


Abb. 25: Emissionsspektrum (links) und Excitationsspektrum (rechts) von 5 µM C8-MABA-AMP (—), 5 µM C8-MABA-AMP und 70 µM $hsTmpK_{wt}$(--) sowie 5 µM C8-MABA-AMP, 70 µM $hsTmpK_{wt}$ und 2 mM MgATP (····) in Standardfluoreszenzpuffer: Die unspezifische Bindung von C8-MABA-AMP verursachte eine 20 %ige irreversible Fluoreszenzerhöhung. Die Datenpunkte wurden jeweils nach Gl. 5 (Kapitel 2.2.9.1) volumenkorrigiert.

3.4 Kinetische Analyse der Fluorophore

Nach der Ermittlung von Gleichgewichtsdaten war für eine vollständige kinetische Charakterisierung der Fluorophore die Kenntnis der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten wichtig. Diese kinetischen Parameter konnten in stopped-flow Experimenten für die humane wt-TmpK bestimmt werden. Aus diesen Experimenten konnte dann eine Aussage über den Bindungsmechanismus des Fluorophors abgeleitet werden.

3.4.1 TP₅A-mant

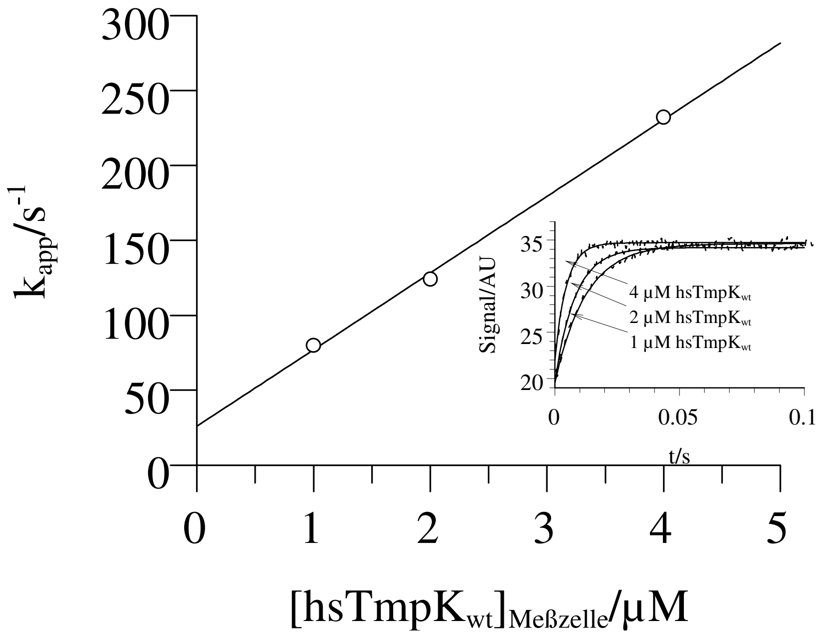


Abb. 26: Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante für die Bindung von TP_5A-mant an menschliche wt-TmpK: Bei diesem Experiment wurden 0.4(0.2) µM TP_5A-mant mit 2(1) µM, 4(2) µM und 8(4) µM $hsTmpK_{wt}$ gemischt. Die einzelnen Meßkurven (siehe innere Abbildung) konnten mit einer einfach exponentiellen Gleichung analysiert werden.

Für die kinetische Analyse der TP_5A-mant Bindung an $hsTmpK_{wt}$ wurden bei 25 °C in Standardfluoreszenzpuffer steigende Enzymkonzentrationen mit einer konstanten Fluorophorkonzentration im stopped-flow Gerät gemischt. Die zeitliche Änderung des Signals konnte für jede Enzymkonzentration mit einer einfach exponentiellen Gleichung beschrieben werden. Aus der Steigung der Auftragung der erhaltenen apparenten Ratenkonstanten über der Enzymkonzentration wurde die Assoziationsratenkonstante berechnet, der Achsenabschnitt lieferte die Dissoziationsratenkonstante (Abb. 26). Die Ableitung der entsprechenden Geradengleichung ist im Appendix, Kapitel 8.3 beschrieben. Die lineare Abhängigkeit der apparenten Ratenkonstanten von der Enzymkonzentration belegte einen einfachen Einschrittbindungsmechanismus für TP_5A-mant. Die Assoziationsratenkonstante war $k_{ass,\,TP_5A-mant} = 51 \pm 2\ \mu M^{-1}s^{-1}$, die Dissoziationsratenkonstante $k_{diss,\,TP_5A-mant} = 26 \pm 6\ s^{-1}$. Aus dem Quotienten $K_{d,\,hsTmpK_{wt}}^{TP_5A-mant} = \frac{k_{ass,\,TP_5A-mant}}{k_{diss,\,TP_5A-mant}} = 0.50 \pm 0.14\ \mu M$ erhielt man die Dissoziationskonstante für die

Bindung. Diese stimmte gut mit der in einer Gleichgewichtsmessung bestimmten Dissoziationskonstante überein.

3.4.2 $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP

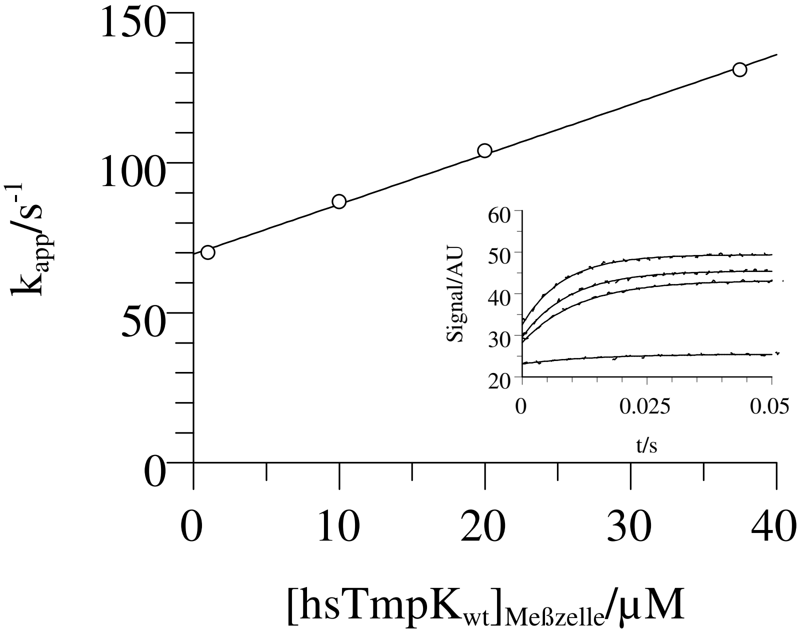


Abb. 27: Bestimmung der kinetischen Konstanten der Bindung von $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP an $hsTmpK_{wt}$: Im stopped-flow Gerät wurden 0.5(0.25) µM $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP mit 2(1), 20(10), 40(20) und 65(37.5) µM Enzym gemischt und der zeitliche Fluoreszenzverlauf verfolgt (kleiner Graph, von unten nach oben). Dieser konnte für jedes Experiment mit einer einfach exponentiellen Gleichung beschrieben werden.

Die kinetische Analyse der Bindung von $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP an $hsTmpK_{wt}$ wurde wie die für TP_5A-mant durchgeführt. Die Messung der apparenten Ratenkonstanten für die Bindung wurde bei 25 °C in einem Standardfluoreszenzpuffer in Anwesenheit von Mg^{2+} durchgeführt. Die Auftragung der für verschiedene Enzymkonzentrationen erhaltenen apparenten Ratenkonstanten über der TmpK-Konzentration ergab wiederum eine Gerade (Abb. 27). Aus der Steigung wurde die Assoziationsratenkonstante $k_{ass,\ P_{(\beta)}-MAHA\ -TDP} = 1.66 \pm 0.05\ \mu M^{-1}s^{-1}$ bestimmt, die Dissoziationsratenkonstante $k_{diss,\ P_{(\beta)}-MAHA\ -TDP} = 70 \pm 1\ s^{-1}$ ergab sich aus dem Ordinatenabschnitt. Die berechnete Dissoziationskonstante für $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP war $K_{d,\ hsTmpK_{wt}}^{P_{(\beta)}-MAHA\ -TDP} = 42 \pm 2\ \mu M$ und stimmte hervorragend mit der durch Equilibriumstitration erhaltenen überein. Die transientenkinetische Analyse bewies auch für diesen Fluorophor einen Einschrittbindungsmechanismus.

3.5 Ligandenbindungsanalyse

3.5.1 Fluoreszenzsspektroskopische Analyse

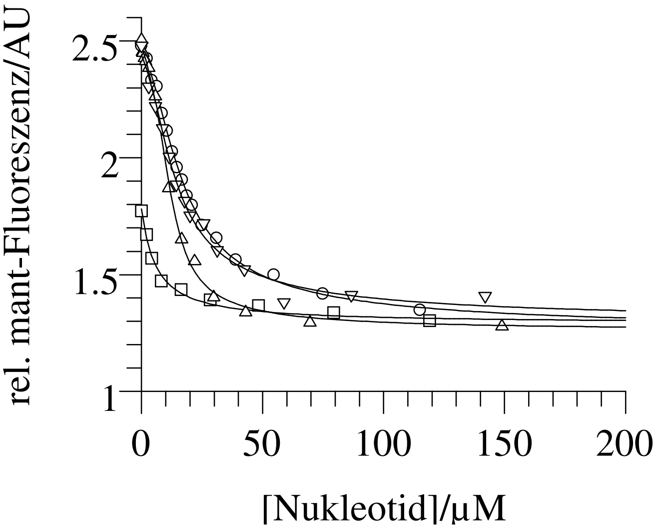


Abb. 28: Verdrängung von $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP durch dTMP (○), dTDP (□), AZTMP (Δ) und AZTDP (∇) bei 25 °C: Die Konzentration des Fluorophors betrug bei jeder Messung 0.52 µM. Bei dTDP wurde weniger Enzym verwendet (55 µM gegenüber 90 µM bei den drei anderen Verdrängungen), so daß die Fluoreszenzintensität des TmpK. $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP-Komplexes zu Beginn der Messung nicht das Niveau der anderen Experimente erreichte.

Mit den beiden Fluorophoren $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP und TP_5A-mant standen nun zwei spezifisch verdrängbare Fluorophore einmal für den NMP/NDP-Bindungsplatz ($P_{(\beta)}$-MAHA-TDP) und einmal für den ATP/ADP-Bindungsplatz (TP_5A-mant) zur Verfügung. TP_5A-mant eignete sich nicht für eine fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der NMP/NDP-Bindestelle, denn durch T-Nukleotide wäre nur der Thymidinteil des Bisubstratanalogs aus seiner Bindungstasche verdrängt worden und nicht der signalgebende Adenosinanteil. Eine mögliche Änderung des Fluoreszenzsignals wäre somit durch die Bildung eines ternären Komplexes zustandegekommen und nur äußerst schwer mit Hilfe einer *global fit* Analyse interpretierbar gewesen.

Für menschliche wt-TmpK waren in erster Linie die Dissoziationskonstanten für die natürlichen Substrate dTMP bzw. dTDP und die für AZTMP bzw. AZTDP als Anti-HIV-*Prodrug* von Bedeutung. Die Dissoziationskonstanten für dTMP und AZTMP wurden in Standardfluoreszenzpuffer in Anwesenheit von Mg^{2+} bestimmt, die für dTDP und AZTDP in Abwesenheit von Mg^{2+}. Die Anwesenheit von Magnesium hätte für die Diphosphate zum einen wegen der Bildung von MgNDP zu einer falschen Dissoziationskonstante geführt, zum anderen fand zwischen den Diphosphaten in Anwesenheit von Mg^{2+} eine Reaktion gemäß der Gleichung $\mathrm{NDP+NDP} \xleftrightarrow{\mathrm{Mg^{2+}/TmpK}} \mathrm{NMP+NTP}$ statt. Dadurch entstand ein Produktgemisch aus Mono-, Di- und Triphosphaten, das die Ermittlung einer sinnvollen Dissoziationskonstante unmöglich machte. Die Gleichgewichtsverdrängungstitrationen wurden mit der kubischen Gleichung für eine kompetitive Verdrängung [71] (Appendix, Kapitel 8.4.2) und den bekannten Dissoziationskonstanten für $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP ausgewertet. Bei allen Verdrängungsexperimenten bestand das Problem, daß die Fluoreszenz nach der Verdrängung des Signalgebers wahrscheinlich aufgrund der unspezifischen Wechselwirkungen des Fluorophors mit dem hydrophoben Dimerinterface nicht vollständig auf die Ausgangsfluoreszenz zurückging. Obwohl dieser Fluoreszenzunterschied nur klein war (ca. 5%), mußte für die Auswertung der Verdrängungsexperimente (Abb. 28) ein weiterer freier Parameter, die Stöchiometrie des Nichtfluorophors, eingeführt werden. Die erhaltenen Dissoziationskonstanten K_d und die stöchiometrischen Faktoren n für die Mono- und Diphosphate der NMP/NDP-Bindestelle sind in der Tabelle 12 zusammengefaßt.

Enzym	*$hsTmpK_{wt}$*			
Nukleotid	*dTMP*	*dTDP*	*AZTMP*	*AZTDP*
K_d/µM	27±3	20±1	8±3	19±1
n	8.2±0.5	7.7±0.8	8.3±0.4	9.3±0.2

Tab. 12: Zusammenstellung der durch Fluoreszenzspektroskopie erhaltenen Dissoziationskonstanten und stöchiometrischen Faktoren. Die angegebenen Standardabweichungen ergaben sich als Fehler der Kurvenanpassung an die Meßdaten.

Der notwendige stöchiometrische Faktor n, der die Anzahl der gebundenen Nukleotidmoleküle pro TmpK-Monomer widerspiegelt, ist für eine sinnvolle Stöchiometrie zu groß. Unter Berücksichtigung der für die Auswertungen verwendeten

TmpK-Monomerkonzentrationen und der zusätzlichen Annahme, daß die Mono- und Diphosphate sowohl in der T- als auch in der A-Bindungsstelle Platz finden können, hätte ein maximaler stöchiometrischer Faktor 2 erwartet werden können. Zur Überprüfung der stöchiometrischen Faktoren wurde deshalb die Auswertung der Verdrängungsexperimente aufgrund der folgenden Überlegung geändert. Wenn tatsächlich acht Nukleotidmoleküle pro TmpK-Monomer binden würden, müßte TmpK acht aktive Nukleotidbindestellen haben. Somit hätte die Verminderung der aktiven Nukleotidbindestellen gerade um diesen Faktor 8, der dann bei der Datenanalyse konstant gehalten wurde, zu den in Tabelle 12 zusammengestellten Dissoziationskonstanten führen müssen. Dies war nicht der Fall, man erhielt aber - im Rahmen des Fehlers - diese Dissoziationskonstanten, wenn anstelle der Anzahl der bindenden Nukleotidmoleküle pro TmpK-Monomer die Anzahl der aktiven Nukleotidbindestellen als Variable in die Auswertung eingeführt wurde. Der Wert dieser Variablen betrug nie 1/8, sondern war immer deutlich kleiner (Größenordung 10^{-3}). Wahrscheinlich erforderte die vermutete unspezifische Wechselwirkung des Fluorophors mit dem in hoher Konzentration vorliegenden Enzym die Einführung eines beliebigen zusätzlichen Korrekturfaktors ohne biochemische Bedeutung.

Die Dissoziationskonstante für MgATP wurde mit Hilfe einer Verdrängung von TP_5A-mant gemessen. Für MgATP ergab sich nach der Datenanalyse mit der kubischen Gleichung $K_{d,\,hsTmpK_{wt}}^{MgATP} = 15 \pm 3\ \mu M$ (Abb. 29). Bei der Verdrängung von TP_5A-mant mit MgATP wurde nicht ganz das Grundsignal des freien Fluorophors erreicht (Differenz ≈ 5%), allerdings mußte zur Auswertung kein stöchiometrischer Faktor einbezogen werden. Der Grund ist möglicherweise die deutlich geringere Enzymkonzentration bei diesem Versuch. Die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Wechselwirkung zwischen Fluorophor und Enzym war somit wesentlich geringer. Eine analoge Bestimmung der Dissoziationskonstante für MgADP war ungenauer, weil unerwarteterweise MgADP und ADP zu AMP und MgATP reagierten. Diese Reaktion fand jedoch aufgrund der verwendeten geringen TmpK-Konzentration ($[hsTmpK_{wt}] = 0.3\ \mu M$) im Fluoreszenzexperiment laut HPLC-Analyse kaum statt, so daß der erhaltene Wert $K_{d,\,hsTmpK_{wt}}^{MgADP} = 27 \pm 2\ \mu M$ zumindest als guter Anhaltspunkt dienen konnte.

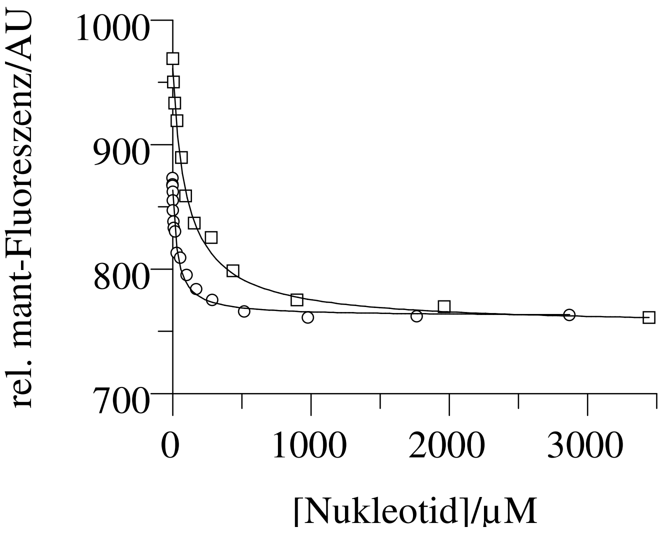


Abb. 29: Verdrängung von TP_5A-mant durch MgATP (○) und MgADP (□): In einer Fluoreszenzküvette wurde ein Komplex aus jeweils 0.3 µM TP_5A-mant und 0.3 µM $hsTmpK_{wt}$ (bei MgATP) bzw. 0.5 µM $hsTmpK_{wt}$ (bei MgADP) in Standardfluoreszenzpuffer bei 25 °C vorgelegt und bis zum Erreichen eines konstanten Signals nach Volumenkorrektur mit beiden Nukleotiden titriert.

Die Gleichgewichtsanalyse der Verdrängung von TP_5A-mant durch TP_5A schließlich führte zu der Dissoziationskonstante für das nichtfluoreszierende Bisubstratanalog (Abb. 30). Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante dieser Bindung nach der Datenanalyse mit der kubischen Gleichung wurde zu $K_{d,\ hsTmpK_{wt}}^{TP_5A} = 210 \pm 30$ nM bestimmt. Die vergleichbare Dissoziationskonstante für die Bindung von TP_5A an $TmpK_{E.\ coli}$ (K_d = 20 nM [53]) ist deutlich kleiner. Die Affinität von TP_5A an $TmpK_{S.\ cerevisiae}$ (K_d = 95 nM [46]) ist eher im Bereich der für das menschliche Enzym gemessenen Dissoziationskonstante. Diese Unterschiede beruhen wahrscheinlich auf der schon in der Einleitung erwähnten, voneinander abweichenden Aminosäurestruktur der Lid-Region von eukariontischer und prokariontischer TmpK. Grundsätzlich war die Bindung von TP_5A an das menschliche Enzym für ein Bisubstratanalog eher schwach. AP_5A hat beispielsweise eine Affinität zu $AmpK_{E.\ coli}$ von 15 nM [60] und für UP_5A ist der K_d-Wert für die Bindung an $UmpK_{D.\ discoideum}$ 40 nM [76], obwohl die Dissoziationskonstanten für die einzelnen Nukleotide bei $UmpK_{D.\ discoideum}$ wesentlich größer sind als bei $hsTmpK_{wt}$ [76].

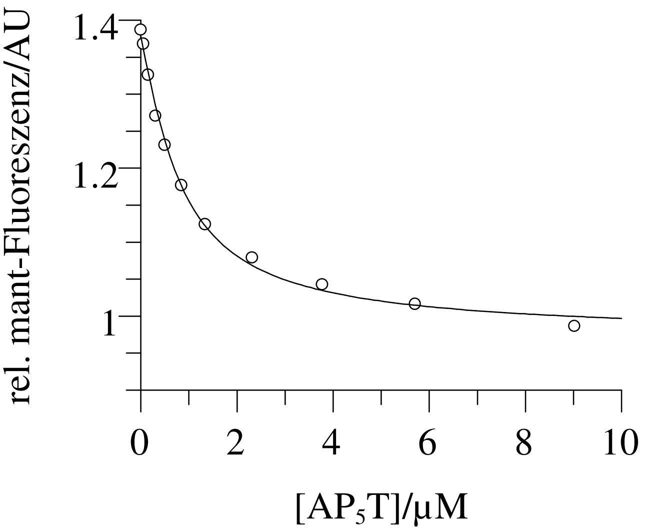


Abb. 30: Bestimmung der Dissoziationskonstante für das System TP_5A/hsTmpK$_{wt}$: In einer Fluoreszenzküvette wurde in Standardfluoreszenzpuffer bei 25 °C ein Komplex aus jeweils 0.5 µM TP_5A-mant und hsTmpK$_{wt}$ vorgelegt und bis zum Erreichen eines konstanten Fluoreszenzsignals nach Volumenkorrektur mit dem Kompetitor TP_5A titriert.

3.5.2 Kalorimetrische Analyse

Sowohl die notwendigen stöchiometrischen Faktoren als auch der Unterschied zwischen dem Grundsignal des freien Fluorophors vor und nach der Verdrängung machten eine unabhängige Überprüfung der Bindungskonstanten für den binären Komplex mit isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) notwendig. Dabei wird die bei der Bindung freiwerdende Wärme, die direkt proportional zu der Menge des gebildeten Komplexes (d. h. zur Assoziationskonstante) ist, gemessen. Möglicherweise hatten die stöchiometrischen Faktoren doch eine biologische Bedeutung und waren nicht ausschließlich auf Artefakte zurückzuführen. Zusätzlich zu den Assoziationskonstanten und stöchiometrischen Faktoren liefert die ITC [90] auch die Bindungsenthalpie ΔH_B für die Bindung der einzelnen Nukleotide, so daß die thermodynamischen Größen Bindungsentropie und Bindungsenergie berechnet werden können. Diese Methode wurde auf viele Makromoleküle wie Muskelproteine [91, 92] und GTP-bindende Proteine [93] ebenso angewendet wie auf den Prozeß der Proteinfaltung [94] und auf Protein-Protein-Wechselwirkungen [95]. Der einzige Nachteil dieser Methode bestand in dem sehr hohen Proteinverbrauch, der für gute Daten im Sinne eines Signal-Rauschverhältnisses für TmpK bei ca. 10 mg pro Messung lag.

In der Abbildung 31 ist exemplarisch das kalorimetrische Signal der Zugabe von dTMP zu einer hsTmpK$_{wt}$-Lösung dargestellt. Die pro Titrationsschritt freiwerdende Wärme nahm mit zunehmender Sättigung des Enzyms ab. Nach der Berechnung der bei jedem Schritt freiwerdenden Bindungsenthalpie durch Integration der Fläche und Normierung auf die Stoffmenge konnten die Daten mit einem einfachen Bindungsmodell, das die Identität aller Bindungsstellen für das entsprechende Substrat voraussetzt, ausgewertet werden (Appendix, Kapitel 8.5.1).

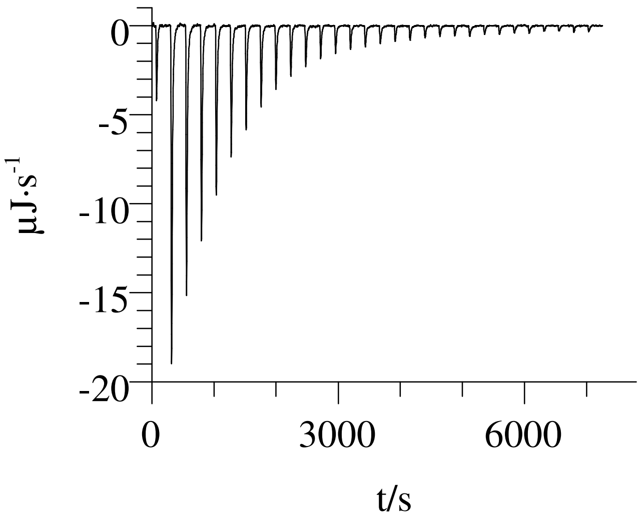


Abb. 31: Darstellung der Originaldaten einer ITC-Messung: Das Kalorimeter mißt den pro Sekunde erforderlichen Strom, der notwendig ist, um die Temperatur in der Meßzelle konstant zu halten. In diesem Experiment wurde eine dTMP-Lösung mit einer Konzentration von 1.775 mM bei 25 °C zu einer 166.2 μM hsTmpK$_{wt}$-Lösung in 30 Schritten zu jeweils 8 μl hinzugegeben.

Die beschriebene kalorimetrische Bindungsanalyse wurde für die vier wichtigsten Substrate der NMP/NDP-Bindestelle (dTMP, dTDP, AZTMP, AZTDP) sowie für MgATP und TP$_5$A durchgeführt (Abb. 32). Aus der Assoziationskonstante erhielt man mit Gleichung 67 (Appendix, Kapitel 8.5.1) die Gibbs'sche Bindungsenergie. Mit Hilfe der Bindungsenthalpie ΔH_B konnte dann die Bindungsentropie nach Gleichung 68 (Appendix, Kapitel 8.5.1) berechnet werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengefaßt.

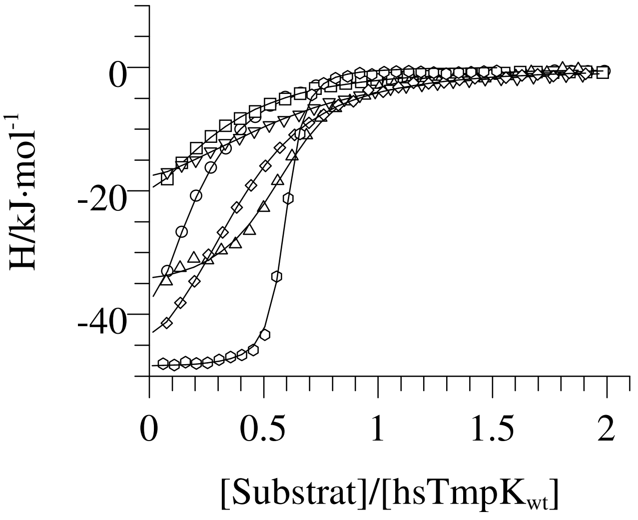


Abb. 32: Kalorimetrische Analyse der Bindung von dTMP (○), dTDP (□), AZTMP (Δ), AZTDP (∇), MgATP (◊) und TP_5A (⬡) an $hsTmpK_{wt}$. bei 25 °C in ITC-Puffer: Aufgetragen wurde die Bindungsenthalpie pro Titrationsschritt über dem molaren Verhältnis [Nukleotid]/[$hsTmpK_{wt}$-Monomer] in der Meßzelle. Die in der Meßzelle (V = 1.3656 ml) vorgelegte Enzymkonzentration betrug bei jeder Titration ca. 150 µM, die Konzentration in der Spritze war 10-fach höher.

Enzym	*$hsTmpK_{wt}$*					
Substrat	*dTMP* *$+Mg^{2+}$*	*dTDP* *$-Mg^{2+}$*	*AZTMP* *$+Mg^{2+}$*	*AZTDP* *$-Mg^{2}$*	*MgATP* *$+Mg^{2+}$*	*TP_5A* *$+Mg^{2+}$*
K_d/µM	24±1	26±1	5.6±0.4	23±1	17.9±0.5	0.39±0.03
[Nkt.]/[TmpK]	0.23±0.01	0.27±0.01	0.58±0.01	0.55±0.01	0.39±0.01	0.58±0.01
ΔH_B/kJ·mol^{-1}	-(67±3)	-(36±2)	-(36.6±0.5)	-(25.1±0.5)	-(55.9±0.7)	-(48.5±0.2)
ΔG_B/kJ·mol^{-1}	-(26.4±0.1)	-(26.2±0.1)	-(30.0±0.2)	-(26.5±0.2)	-(27.0±0.1)	-(36.6±0.2)
ΔS_B/J·mol^{-1}K^{-1}	-(136±10)	-(33±7)	-(21±4)	+(5±2)	-(97±3)	-(40±2)

Tab. 13: Zusammenfassung der kalorimetrisch bestimmten Bindungsdaten. Die angegebenen Fehler für die Meßgrößen K_d, [Nkt.]/[TmpK] und ΔH_B ergaben sich aus der Kurvenanpassung an die Meßdaten, die übrigen durch Gauß'sche Fehlerfortpflanzung.

Die kalorimetrisch bestimmten Dissoziationskonstanten stimmten sehr gut mit denen aus den fluoreszenzspektroskopischen Experimenten überein. Bei dieser direkt durchgeführten Bindungsanalyse ergab sich eine andere Bindungsstöchiometrie als mit Hilfe der fluoreszenzspektroskopischen Methoden. Auf zwei Dimere TmpK kamen jeweils ein Molekül dTMP und dTDP, bei AZTMP/AZTDP war das Verhältnis, wie bei MgATP, jeweils ein Substratmolekül pro Dimer. Die zwischen MgADP und ADP stattfindende Reaktion machte eine kalorimetrische Bestimmung dieser Dissoziationskonstante unmöglich, weil diese Reaktion aufgrund der gegenüber der Fluoreszenzmessung 300-fach höheren TmpK-Konzentration wesentlich schneller war und zudem das ITC-Experiment ungefähr 3 mal länger dauerte als das Fluoreszenzexperiment. Die Nukleotidpaare dTMP/dTDP und AZTMP/AZTDP zeigten bei den kalorimetrischen Experimenten ein konsistentes Bild. Die Anzahl der gebundenen Eduktmoleküle entsprach der der Produktmoleküle. In diesem Zusammenhang stellte sich natürlich die Frage, ob die Abweichungen von einer 1:1-Bindungsstöchiometrie durch die Anwesenheit von inaktivem Protein hervorgerufen wurde. Alle hier gezeigten Titrationen wurden aber mit Enzym aus derselben Präparation durchgeführt. Vorhandenes inaktives Enzym wäre in dieser Präparation statistisch verteilt gewesen, und somit hätten die gemessenen Stöchiometrien für alle Nukleotide dann gleich sein müssen. Außerdem hatten alle Enzympräparationen in Rahmen des durch die Konzentrationsbestimmungsmethode (Bradford) verursachten Fehlers gleiche steady-state Aktivität, und auch eine *active site* Titration belegte 100 %-ige Bindungsaktivität. Bei keiner Enzympräparation (insgesamt vier) wurde ein Hinweis darauf erhalten, daß ein Teil des Proteins inaktiv war, es sei denn, daß in allen Präparationen durch einen Zufall der Anteil inaktiven Enzyms immer gleich groß war.

Die kalorimetrische Analyse ergab ferner, daß die Bindung der einzelnen Substrate eindeutig enthalpisch begünstig war. Die nahezu doppelt so große Bindungsenthalpie für dTMP im Vergleich zu den anderen Substraten belegte eine größere Anzahl von Wechselwirkungen dieses Substrats mit TmpK. Bis auf die Bindung von AZTDP waren alle Bindungsprozesse entropisch nicht favorisiert, wie es für Bindungsvorgänge zu erwarten ist. Die neu entstehenden Protein-Substrat-Wechselwirkungen verringern die Flexibilität des Enzyms, das System erreicht einen Zustand höherer Ordnung und damit geringerer Entropie. Unerwartet war der positive entropische Beitrag für die Bindung von AZTDP. Dieser generelle Effekt wurde jedoch in einigen Veröffentlichungen beschrieben [93, 96]. Als mögliche Gründe wurden strukturelle Umlagerungen des Enzyms [93], eine große - durch die Bindung induzierte - Änderung der Wärmekapazität des Enzyms [96] oder auch eine erhöhte Flexibilität bestimmter Regionen des Liganden innerhalb des Komplexes [97] genannt. Zusätzlich sind auch unterschiedliche Interaktionen der Substrate mit den Wassermolekülen in der Bindungstasche denkbar. AZTDP verdrängt möglicherweise Wassermoleküle, was eine positive Entropieänderung zur Folge hätte. Die Konformationsänderung, die durch die Bindung verursacht wird, hätte in diesem Fall einen geringeren Entropieverlust bewirkt, der durch die beschriebene positive Entropieänderung nicht ausgeglichen werden konnte. Die Kristallstruktur könnte hier möglicherweise zur Aufklärung beitragen.

Die kalorimetrische Analyse zeigte auch, daß TP_5A ein sehr schlechtes Bisubstratanalog darstellt. Die Abschätzung der Dissoziationskonstante für TP_5A ergab $K_d \approx 1$ nM (Appendix, Kapitel 8.7). Die experimentell ermittelte Bindungsaffinität aus der Fluoreszenz- und der kalorimetrischen Messung (Mittelwert: $K_d = 300 \pm 90$ nM) war 300-fach geringer. Offensichtlich reicht der mit einer kovalenten Verbindung zweier Substrate durch eine künstliche Phosphatkette geschaffene entropische Vorteil für das Bisubstratanalog [98] nicht aus, um den enthalpischen Nachteil im Vergleich mit MgATP bzw. dTMP zu kompensieren. Möglicherweise passen zwar der ATP- und der dTMP-Teil des Analogs gut in die jeweilige Bindungstasche, die Phosphatkette kann dann jedoch nur mit Mühe von der Lid-Region aufgenommen werden. Durch die zusätzliche, negativ geladene Phosphatgruppe entstehen weitere nichtbindende elektrostatische Wechselwirkungen, die zu Lasten der Bindungsenthalpie gehen.

3.6 Steady-state Kinetik

3.6.1 Vergleich verschiedener Datenanalysemethoden

Im folgenden sollen die Ergebnisse der steady-state Experimente verschiedener TmpK mit verschiedenen Substraten beschrieben werden. Alle angegebenen k_{cat}- und K_M-Werte wurden mit der analytischen Michaelis-Menten-Gleichung und der „Replot“-Methode (Appendix, Kapitel 8.1.1 und 8.1.2) gewonnen. Die Datenanalyse mit der Michaelis-Menten-Gleichung für ein bireaktantes Enzym (Gl. 19, Appendix, Kapitel 8.1.2) lieferte keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Die erhaltenen Michaelis-Konstanten waren schlecht reproduzierbar und hingen sehr stark von den Startwerten für die Kurvenanpassung ab. Die drei experimentellem Parameter k_{app}, $[S_1]$ und $[S_2]$ spannten eine dreidimensionale Oberfläche auf (Abb. 33), auf der es offensichtlich mehrere lokale Minima gab. Der Minimierungsalgorithmus des Programms Scientist (Version 2.0, MicroMath Incorp., Salt Lake City, USA) erlaubte kein Verlassen eines einmal erreichten lokalen Minimums, so daß diese Auswertemethode unbrauchbar war.

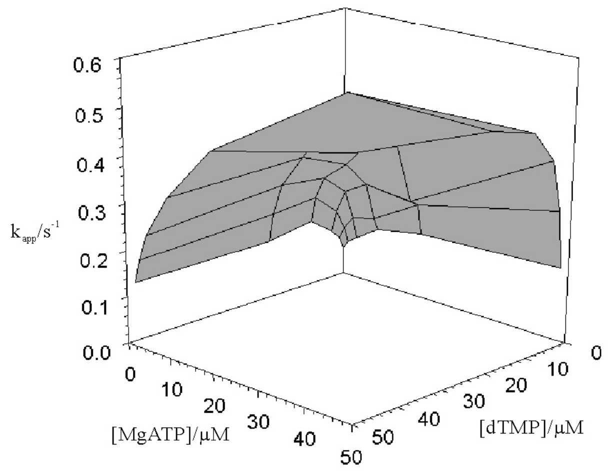


Abb. 33: Dreidimensionale Darstellung der steady-state Parameter k_{app}, $[S_1]$ und $[S_2]$: Die Abbildung zeigt die Meßergebnisse mit 232 nM $hsTmpK_{wt}$ und MgATP/dTMP (2 µM bis 50 µM) bei 25 °C im NADH-Assay. Die Bestimmung der steady-state Konstanten k_{cat} gelang in Übereinstimmung mit den Daten der „Replot“-Methode. Die K_M-Werte für die Substrate variierten allerdings stark in Abhängigkeit von den gewählten Anfangswerten.

Auch die Datenanalyse mit der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 36, Appendix, Kapitel 8.1.6) zur Kontrolle der „Replot“-Daten für das Substrat, dessen Konzentration sich zeitlich ändert, war nicht in allen Fällen möglich, obwohl die Absorptionsmessungen (Abb. 34) prinzipiell alle Informationen über die steady-state kinetischen Parameter k_{cat} und K_M enthalten. Eine typische Meßkurve, auf die die integrierte Michaelis-Menten-Gleichung angewendet werden konnte, ist in Abbildung 34 dargestellt. Eine zufriedenstellende Auswertung gelang nur, wenn genügend Punkte im Knick gemessen wurden und vor allem die Kurven für $t \rightarrow \infty$ einen konstanten Wert für die optische Dichte erreichten. Genügend Punkte im Knick sind wichtig, weil hier der K_M-Wert definiert ist. Der steile Anfangsbereich beschreibt die katalytische Ratenkonstante k_{cat} und die Amplitude die Endkonzentration des Produkts. Die Probleme dieser Auswertemethode lagen in der Blindaktivität des Assays. Für viele Messungen wurde die optische Dichte für $t \rightarrow \infty$ kleiner als sie es für die eingesetzte Nukleotidkonzentration hätte werden dürfen. Zusätzlich verhinderte die angewendete Meßmethode die Aufnahme einer größeren Datenmenge im Knick. Es wurden immer sechs verschiedene Kombinationen von Substratkonzentrationen gleichzeitig gemessen, so daß die Zeitspanne zwischen den einzelnen Messungen ca. 13 s betrug. Dadurch war der Knick oft nicht ausreichend für die Datenanpassung mit der integrierten Michaelis-

Menten-Gleichung bestimmt, was in einer großen Schwankung der K_M-Werte für ein Substrat zum Ausdruck kam. Dies hätte geändert werden können, wenn jede Probe einzeln gemessen worden wäre. Der Aufwand war im Verhältnis zum neuen Informationsgehalt jedoch zu hoch, so daß diese Experimente nicht mehr durchgeführt wurden. Am besten reproduzierbar war immer die maximale katalytische Ratenkonstante, offensichtlich reichten die wenigen Punkte im Bereich der maximalen Steigung für eine gute Berechnung aus.

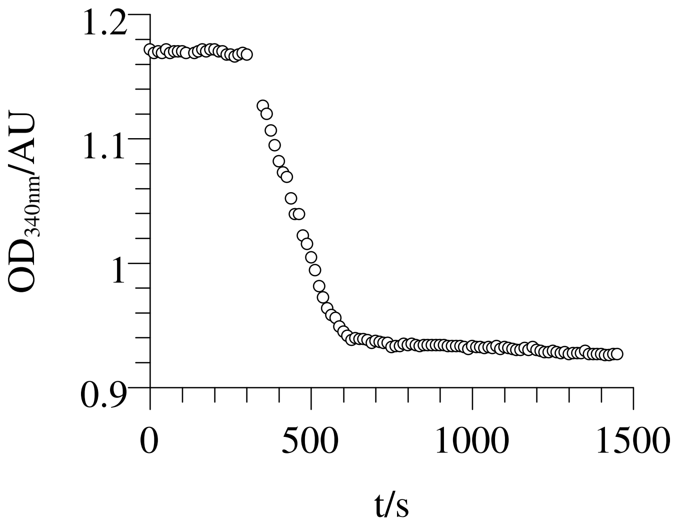


Abb 34: Darstellung der photometrischen Absorptionsabnahme bei der Umsetzung von 20 µM MgATP und 10 µM dTMP mit 232 nM hsTmpK_{wt} bei 25 °C im NADH-Assay: Die Zeitspanne zwischen den einzelnen Punkten der Kurve betrug aufgrund der angewendeten Meßmethode 13 s. Da in jeweils 6 Küvetten die Reaktionsgeschwindigkeit gleichzeitig gemessen wurde, konnte diese Zeitspanne nicht verkleinert und damit die Anzahl der gemessenen Datenpunkte in diesem Experiment nicht vergrößert werden.

Die mit der analytischen Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 3, Appendix, Kapitel 8.1.2) gewonnenen steady-state Konstanten bei Enzym-Nukleotid-Konzentrationen, für die die Bedingungen des Fließgleichgewichts bei kleinen Nukleotidkonzentrationen nicht erfüllt waren (Material und Methoden, Kapitel 2.2.7.2, Anmerkung 1), wurden mit dem Differentialgleichungssystem (Gl. 12-16, Appendix, Kapitel 8.1.2) überprüft. Mit der Gleichung 17 (Appendix, Kapitel 8.1.2) wurde die katalytische Ratenkonstante (k_{cat}) und mit Gleichung 18 (Appendix, Kapitel 8.1.2) der K_M-Wert für das entsprechende Thymidinderivat berechnet. In allen Fällen konnten die mit der analytischen Michaelis-Menten-Gleichung erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden. Der Grund hierfür ist möglicherweise die Linearität der Anfangssteigung der erhaltenen exponentiellen Kurvenverläufe (Abb. 35).

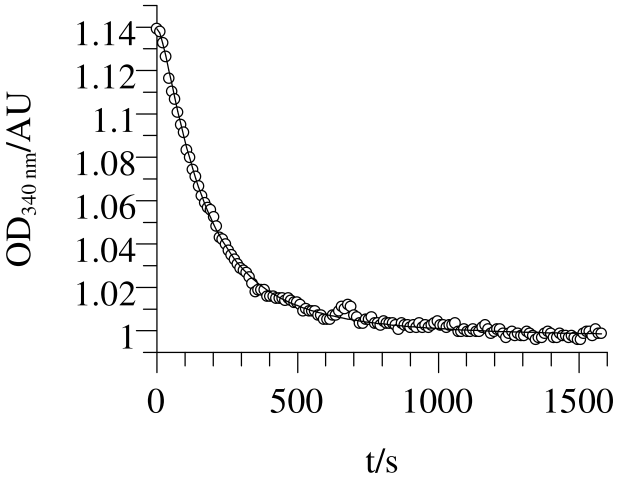
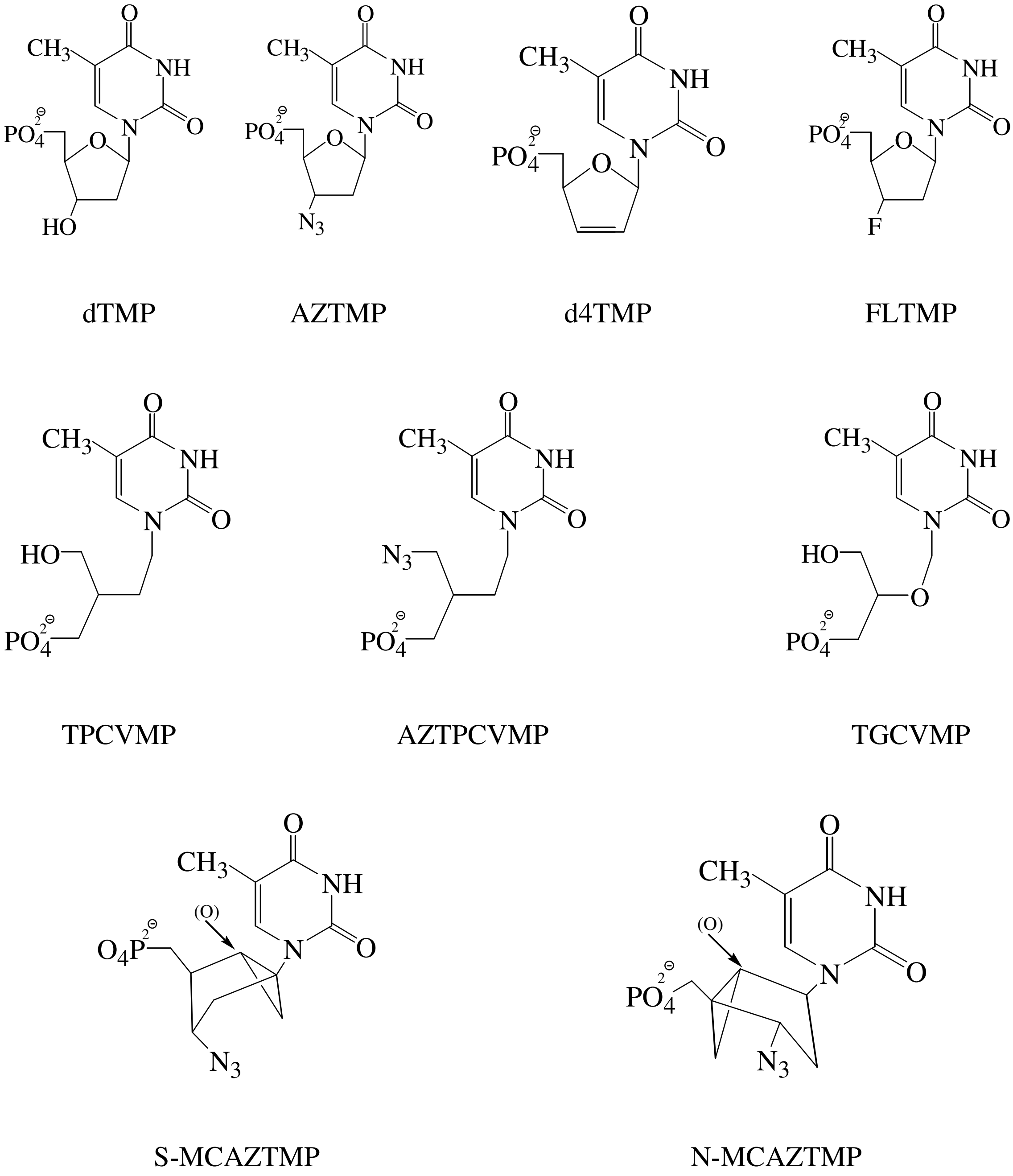


Abb. 35: Gemessene Datenpunkte (o) der Umsetzung von 18.75 µM AZTMP und 50 µM MgATP durch 23.18 µM $hsTmpK_{wt}$ bei 25 °C im NADH-Puffer und Datenanalyse mit dem DGS (durchgezogene Linie): Der mit Gleichung 17 berechnete k_{cat}-Wert war 0.009 ± 0.002 s^{-1}, der K_M-Wert für AZTMP war 6 ±2 µM. Die „Replot"-Analyse ergab k_{cat} = 0.012 ± 0.001 s^{-1} und $K_{M,AZTMP}$ = 12 ± 3 µM. Im Rahmen des Fehlers war die Übereinstimmung der Daten mit den beiden Analysenmethoden ausreichend.

3.6.2 Steady-state Kinetik verschiedener Enzyme und Substrate

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sehr detaillierte steady-state Untersuchungen der Vor- und Rückwärtsreaktion mit verschiedenen TmpK und Substraten durchgeführt. Alle steady-state Messungen erfolgten bei 25 °C. Für die Vorwärtsreaktion wurden folgende Thymidinderivate eingesetzt (Abb. 36): 2'-Deoxythymidinmonophosphat (dTMP), 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidinmonophosphat (AZTMP), 2',3'-Didehydro-2',3'-dideoxythymidinmonophosphat (d4TMP), 3'-Fluoro-2',3'-dideoxythymidinmonophosphat (FLTMP), Thymidinpenciclovirmonophosphat (TPCVMP), Azidothymidinpenciclovirmonophosphat (AZTPCVMP), Thymidinganciclovirmonophosphat (TGCVMP), 2'-Endo-3'-exo-methanocarba-AZTMP (sog. *southern*-Konformation; S-MCAZTMP) und 2'-Exo-3'-endo-methanocarba-AZTMP (sog. *northern*-Konformation; N-MCAZTMP). Phosphoryldonor war jeweils MgATP. Die Gründe für die Untersuchung der steady-state Kinetik mit diesen Substraten sind bei der

Darstellung der jeweiligen Ergebnisse beschrieben. Die Rückwärtsreaktion wurde nur mit dTDP bzw. AZTDP mit MgADP als zweitem Substrat untersucht.



dTMP AZTMP d4TMP FLTMP

TPCVMP AZTPCVMP TGCVMP

S-MCAZTMP N-MCAZTMP

Abb. 36: Strukturformeln der in der Vorwärtsreaktion eingesetzten Nukleosidmonophosphate: Bei beiden bicyclischen Thymidinderivaten (S-MCAZTMP und N-MCAZTMP) wurde die Position der Ribose, an der normalerweise ein Sauerstoffatom positioniert ist, durch (O) markiert.

3.6.2.1 Steady-state verschiedener wt-TmpK mit dTMP, AZTMP, d4TMP, FLTMP

In diesem Abschnitt sollen die steady-state Kinetiken der Substrate dTMP, AZTMP, d4TMP und FLTMP mit wt-Thymidylatkinasen aus Mensch, Maus, *S. cerevisiae* und *E. coli* beschrieben werden. Bisher wurden diese Kinetiken nur mit $\mathrm{TmpK}_{S.\ cerevisiae}$, $\mathrm{TmpK}_{E.\ coli}$ und dTMP bzw. AZTMP gemessen [46]. Die Substrate d4TMP und FLTMP sind interessante Verbindungen, weil ihre Nukleoside ebenfalls, wie AZT, zur klinischen Behandlung der HIV-Infektion eingesetzt werden. Der kinetische Vergleich verschiedener Thymidylatkinasen untereinander könnte, auf lange Sicht gesehen, Erkenntnisse zur Verbesserung der menschlichen Thymidylatkinase im Hinblick auf die Aktivierung von Anti-HIV-Medikamenten bringen.

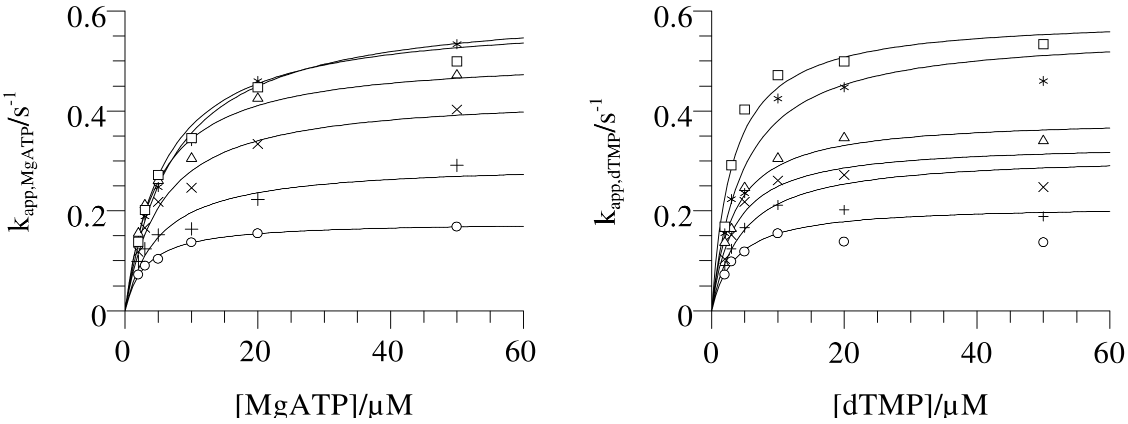


Abb. 37: Auftragung der bei 25 °C im NADH-Assay ermittelten apparenten k-Werte gegen die Nukleotidkonzentration: Im linken Graph war die dTMP-Konzentration bei jeder Meßkurve konstant, im rechten Graph die MgATP-Konzentration. Die Nukleotidkonzentrationen des variablen Substrats waren 2 µM (○), 3 µM (+), 5 µM (x), 10 µM (Δ), 20 µM (□) und 50 µM (*). Die hsTmpK_{wt}-Konzentration betrug 232 nM. Im rechten Graph war bei geringen MgATP-Konzentrationen (2 µM, 3 µM und 5 µM) und hohen dTMP-Konzentrationen (20 µM und 50 µM) deutlich eine Substratinhibierung durch dTMP zu erkennen. Die apparente Ratenkonstante wurde hier bei höheren dTMP-Konzentrationen kleiner. Mit steigenden MgATP-Konzentrationen verlor sich dieser Einfluß von dTMP.

Die Anwendung der analytischen Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 3, Appendix, Kapitel 8.1.2) auf ein Enzym, das zwei Substrate simultan bindet, erfordert, daß die Konzentration eines Substrats bei jeder Meßreihe konstant gehalten wird. Die Affinitäten der einzelnen Substrate waren unterschiedlich, so daß günstige

Konzentrationsbereiche für die Nukleotide in Vorversuchen ermittelt werden mußten. Zusätzlich mußten die Verdünnungen der TmpK, die eine Konzentration unter 1 mg·ml^{-1} (ca. 50 µM) aufwiesen, durch die Zugabe von 1 mg·ml^{-1} BSA stabilisiert werden. Ohne diese Stabilisierung trat ein Aktivitätsverlust auf, der wahrscheinlich auf Adsorptionseffekte an Glas- und Plastikoberflächen zurückzuführen ist [99]. Die erhaltenen Datenpunkte aller Messungen konnten mit der analytischen Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden. In Abbildung 37 wurden exemplarisch die erhaltenen Meßergebnisse für die Reaktion von dTMP mit MgATP und hsTmpK$_{wt}$ dargestellt.

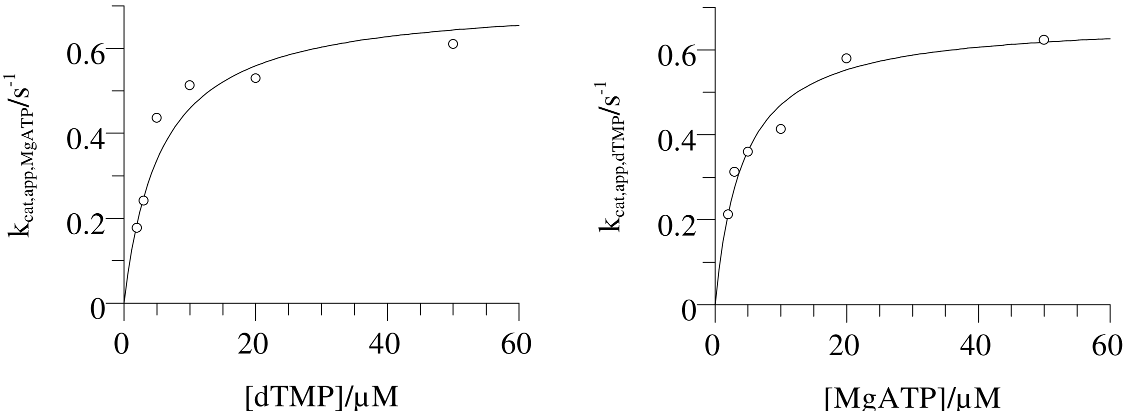


Abb. 38: Analyse der apparenten $k_{cat,app}$-Werte mit der „Replot“-Methode: Bei 25 °C war $k_{cat,MgATP} = 0.72 \pm 0.06\ s^{-1}$ (linker Graph) und $k_{cat,dTMP} = 0.68 \pm 0.04\ s^{-1}$ (rechter Graph). Die extrapolierten maximalen katalytischen Ratenkonstanten für MgATP und dTMP stimmten sehr gut überein, als Mittelwert berechnete sich $k_{cat} = 0.70 \pm 0.02\ s^{-1}$. Die K_M-Werte waren $K_{M,dTMP} = 6 \pm 1$ µM und $K_{M,MgATP} = 4.3 \pm 0.8$ µM. Die angegebenen Fehler ergaben sich aus der Datenanalyse mit dem Programm GraFit.

Die Abbildung 38 zeigt die Replot-Analyse (Appendix, Kapitel 8.1.1) der $k_{cat,app}$-Werte aus Abbildung 37. Der Mittelwert der für MgATP bzw. dTMP berechneten katalytischen Ratenkonstante war $k_{cat} = 0.70 \pm 0.02\ s^{-1}$, der angegebene Fehler errechnete sich aus der Standardabweichung des Mittelwerts. In Abbildung 39 ist der Replot der apparenten K_M-Werte aus Abbildung 37 für MgATP (linker Graph) und dTMP (rechter Graph) dargestellt. Die mit der „Replot“-Methode für die vier Enzyme und Nukleotide ermittelten katalytischen Ratenkonstanten, die K_M-Werte

(Bindungskonstanten im ternären Komplex) und die daraus erhaltenen katalytischen Effizienzen $\frac{k_{cat}}{K_M}$ sind in Tabelle 14 zusammengefaßt.

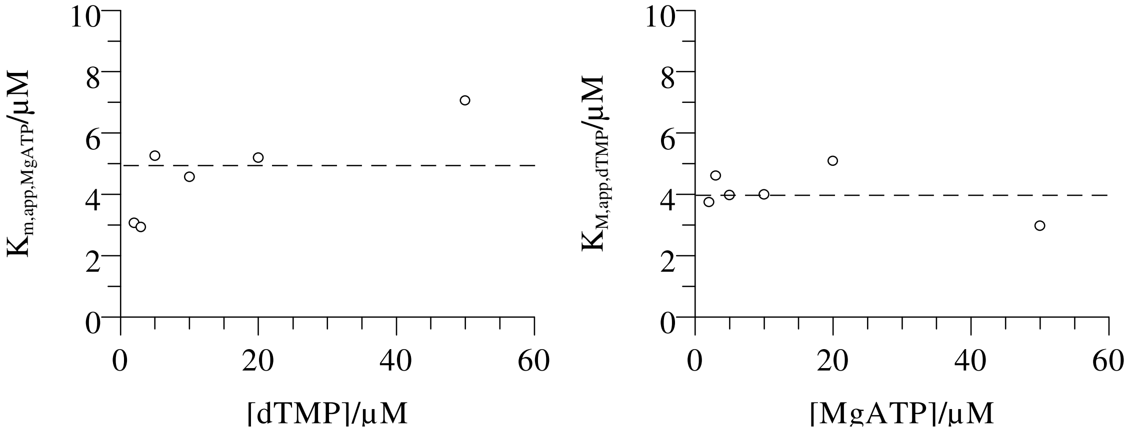


Abb. 39: Replot-Analyse der apparenten K_M-Werte: Der Verlauf der K_M-Werte zeigte mit steigenden Nukleotidkonzentrationen im untersuchten Konzentrationsbereich von 2 µM bis 50 µM weder für dTMP noch für MgATP einen Verlauf, der eine Aussage über das Bindungsverhalten im binären Komplex ermöglichte. Der Mittelwert der apparenten K_M-Werte ergab für dTMP eine Michaeliskonstante von 4 ± 1 µM, und für MgATP 5 ± 1 µM. Diese stimmen sehr gut mit den aus der Analyse der $k_{cat,app}$-Werte erhaltenen Michaeliskonstanten überein.

Grundsätzlich sind Thymidylatkinasen in ihrer maximalen Umsatzgeschwindigkeit deutlich langsamer als andere Kinasen. So zeigt beispielsweise humane AmpK eine maximale katalytische Ratenkonstante $k_{cat} = 586\ s^{-1}$ für die Umsetzung von ATP und AMP [100], UmpK aus dem Gehirn von Schweinen setzt ATP und UMP mit $k_{cat} = 174\ s^{-1}$ um [101] und GmpK aus Hefe hat einen k_{cat}-Wert von 394 s^{-1} [102]. Auffällig war, bei nahezu identischer Aminosäuresequenz der Thymidylatkinasen aus Mensch, Maus und Hefe, ein deutlicher Unterschied in der maximalen Katalyserate mit dem natürlichen Substrat dTMP. Das Maus-Enzym war viermal schneller als das menschliche, das Hefe-Enzym sogar fünfzigmal. Die k_{cat}-Werte scheinen offenbar mit der Wachstumsgeschwindigkeit des Wirtsorganismus korreliert zu sein. Während die K_M-Werte für dTMP bei den untersuchten Thymidylatkinasen in der selben Größenordnung lagen (≈ 10 µM), differierten diese für MgATP um mehr als eine Größenordnung. Die Affinitäten der erwähnten NMP-Kinasen (humane AmpK, UmpK aus Schweinehirn und GmpK aus Hefe) für die Substrate AMP, UMP und GMP sind deutlich geringer (Faktor 10 im Vergleich zu dTMP und TmpK), worin die größeren Umsatzzahlen begründet liegen. Die unterschiedlichen K_M-Werte für ATP sollten in der Zelle jedoch keinen Einfluß auf die maximale Katalyserate haben. Bei einer zellulären ATP-Konzentration von ungefähr 4 mM [103] sollte TmpK mit ATP gesättigt sein und damit prinzipiell die maximale Katalyserate erreichen können. Der Austausch von dTMP durch Thymidinderivate im ternären Komplex reduzierte den k_{cat}-Wert um bis zu zwei Größenordnungen.

wtTmpK	**steady-state kinetische Konstante**	**Nukleotid**							
		dTMP	*MgATP*	*AZTMP*	*MgATP*	*d4TMP*	*MgATP*	*FLTMP*	*MgATP*
TmpK$_{hs}$	k_{cat}/s^{-1}	0.70		0.012		0.08		0.03	
	$K_M/\mu M$	5	5	12	69	12	33	8.2	27
	$\frac{k_{cat}}{K_M}/M^{-1}s^{-1}\cdot 10^{-3}$	140	140	1	0.17	6.3	2.3	3.7	1.1
TmpK$_{murin}$	k_{cat}/s^{-1}	2.8		0.15		0.98		0.24	
	$K_M/\mu M$	15	55	7	825	13	396	24	1455
	$\frac{k_{cat}}{K_M}/M^{-1}s^{-1}\cdot 10^{-3}$	187	51	22	0.18	75	2.5	9.9	0.16
TmpK$_{S.cerevisiae}$	k_{cat}/s^{-1}	35[46]		0.175[46]		1.48		1.27	
	$K_M/\mu M$	9[46]	190[46]	6[46]	300[46]	154	467	43	860
	$\frac{k_{cat}}{K_M}/M^{-1}s^{-1}\cdot 10^{-3}$	3889	184	29	0.6	9.6	3.2	30	1.5
TmpK$_{E. coli}$	k_{cat}/s^{-1}	15[46]		6[46]		1.64		1.1	
	$K_M/\mu M$	2.7[46]	8[46]	30[46]	50[46]	44	25	53	1100
	$\frac{k_{cat}}{K_M}/M^{-1}s^{-1}\cdot 10^{-3}$	5555	1875	200	120	37	66	21	1

Tab. 14: Übersicht über die steady-state kinetischen Konstanten von TmpK aus Mensch, Maus, *S.cerevisiae* und *E. coli* mit den Substraten dTMP, AZTMP, d4TMP und FLTMP.

Gleichzeitig wurde die Affinität der Monophosphate der Anti-HIV-Medikamente im Vergleich zu dTMP um bis zu einer Größenordnung und die von ATP um bis zu zwei Größenordnungen geschwächt. Damit verbunden war eine geringere Effizienz aller TmpK bei der Aktivierung von Anti-HIV-Medikamenten. Aus den gemessenen katalytischen Effizienzen für die Thymidinderivate wird klar, daß für jedes Anti-HIV-Medikament eine speziell für dieses Derivat optimierte Kinase benötigt wird. So verminderte beispielsweise die Bindung von AZTMP an menschliche TmpK die katalytische Effizienz von ATP fast um den Faktor 1000, die Bindung von FLTMP reduzierte diesen Wert aber nur um den Faktor 100. Die Mutanten der menschlichen Thymidylatkinase, die zur Verfügungen standen [49], wurden für die verbesserte Aktivierung von AZTMP entwickelt, so daß die transientenkinetischen Experimente, die später beschrieben werden, nur mit dTMP und AZTMP durchgeführt wurden.

3.6.2.2 Steady-state hsTmpK$_{wt}$ mit TPCVMP, AZTPCVMP, TGCVMP

In diesem Abschnitt sollen die steady-state Ergebnisse der humanen wt-TmpK mit den Substraten TPCVMP, AZTPCVMP und TGCVMP beschrieben werden (Abb. 36). Diese Substrate basieren auf den offenkettigen Guanosinanalogen Penciclovir und Ganciclovir, die als Anti-Herpes Medikamente eingesetzt werden [104, 105] und von der Arbeitsgruppe von Prof. Chris Meier (Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt wurden. Der Grund für die Untersuchung dieser offenkettigen Thymidinderivate war die Vermutung, daß der ratenlimitierende Schritt in der AZTMP-Aktivierung durch hsTmpK$_{wt}$ der Phosphoryltransfer, also der chemische Schritt, sein könnte. Sollten die α-Phosphatgruppe von AZTMP und die γ-Phosphatgruppe des ATP infolge der durch den P-Loop-Shift ausgelösten Verzerrung der Enzymstruktur nicht optimal zueinander positioniert sein, hätte dieser Effekt durch eine flexiblere Struktur der Ribose, die sich der Verzerrung anpassen kann, ausgeglichen werden können.

Die Abstufung der Aktivität (Tab. 15) war wie erwartet: TGCVMP, das sowohl die OH-Gruppe als auch den Ether-Sauerstoff der Ribose hat, wurde etwas schneller umgesetzt als TPCVMP, das nur noch die OH-Gruppe hat. Die Aktivität von AZTPCVMP war mit dem NADH-Assay nicht mehr meßbar, sie lag im Bereich der Blindaktivität ($10^{-5}s^{-1}$). Interessant waren die nahezu identischen apparenten k_{cat}-Werte von TPCVMP und TGCVMP. Der Ringsauerstoff der (aufgelösten) Ribose, der einzige Unterschied bei beiden Monophosphaten, hat offensichtlich kaum Einfluß auf die Positionierung der Phosphatgruppe. Es gibt hier keine wichtigen Wasserstoffbrückenbindungen, was durch die Kristallstruktur von TmpK$_{S.\ cerevisiae}$ mit TP$_5$A bestätigt wird [46]. Viel wichtiger für die richtige Position ist die 3'-OH-Gruppe. TPCVMP zeigte eine Aktivität in der Größenordung $10^{-3}s^{-1}$, während die Umsatzzahl für AZTPCVMP nicht mehr meßbar war.

Enzym	**steady-state kinetische Konstante**	**Nukleotid**					
		TGCVMP (1000 µM MgATP)	*MgATP (1000 µM TGCVMP)*	*TPCVMP (1000 µM MgATP)*	*MgATP (150 µM TPCVMP)*	*AZTPCVMP (1000 µM MgATP)*	*MgATP (1000 µM AZTPCVMP)*
hsTmpK$_{wt}$	$k_{cat,app}/s^{-1}$	≈ 0.008		≈ 0.002		n. d.	
	$K_{M,app}/\mu M$	≈ 1300	≈ 30	≈20	≈200	n. d.	n. d.
	$\frac{k_{cat,app}}{K_{M,app}}/M^{-1}s^{-1}$	≈ 6	≈ 300	≈ 70	≈ 10	n. d.	n. d.

Tab. 15: Übersicht über die steady-state Messungen mit Thymidinderivaten mit offenkettiger Ribose: Bei diesen Substraten wurde wegen der geringen Verfügbarkeit keine 6x6-Matrix (siehe Appendix, Kapitel 8.1.1) gemessen. In der Klammer ist die konstante Konzentration des zweiten Substrats angegeben.

3.6.2.3 Steady-state hsTmpK$_{wt}$ mit S-MCAZTMP und N-MCAZTMP

Die steady-state Messungen mit den AZTMP-Derivaten mit fixierter Ribosekonformation wurden im wesentlichen aus zwei Gründen durchgeführt. Zum einen zeigt das Thymidinderivat mit einer in der northern-Konformation geblockten Ribose Anti-Herpes-Aktivität [106, 107], und das Triphosphat von N-MCAZT wird als starker Inhibitor der Reversen Transkriptase des HIV beschrieben [108]. Allerdings müßte N-MCAZT, wie alle Anti-HIV-Medikamte, durch zelluläre Kinasen ausreichend aktiviert werden. Zum anderen könnten geblockte Nukleoside und Nukleotide prinzipiell auch zur Bestimmung der von Enzymen bevorzugten Ribosekonformation (*sugar pucker*) benutzt werden. Die Reverse Transkriptase des HIV-1 beispielsweise unterscheidet strikt zwischen beiden Konformationen. Das Substrat für die Reverse Transkriptase ist die C3'-endo Konformation (N-MCAZT-5'-triphosphat), die C2'-endo Konformation (S-MCAZT-5'-triphosphat) wird nicht in die virale DNA eingebaut [109]. Eine falsche Konformation der Ribose von AZTMP kann somit ebenfalls ein Grund für die unzureichende Aktivierung dieses Medikaments sein. In diesem Fall sollte eines von beiden geblockten Substraten deutliche steady-state kinetische Vorteile gegenüber dem anderen aufweisen. Auf der anderen Seite wäre, wenn eines der beiden geblockten, strukturell absolut geordneten Substrate die richtige Ribosestruktur hat, dieses Nukleotid sicherlich schneller umgesetzt worden als ungeblocktes AZTMP mit einer flexibleren Struktur. Die Meßergebnisse mit N-MCAZTMP und S-MCAZTMP, die ebenfalls von der Arbeitsgruppe von Prof. Chris Meier (Universität Hamburg) zur

Verfügung gestellt wurden, sind in der Tabelle 16 zusammengestellt. Die geringen Substanzmengen verhinderten wiederum die Messung einer 6x6-Matrix, so daß nur apparente k_{cat}-Werte angegeben werden können. Aufgrund der gemessen apparenten K_M-Werte kann jedoch davon ausgegangen werden, daß humane wt-TmpK weitestgehend mit Substrat gesättigt war und die apparenten steady-state Konstanten recht nahe an den katalytischen Konstanten liegen. Die Nukleoside der AZTMP-Derivate mit geblockter Konformation sind als Anti-HIV-Medikamente gänzlich ungeeignet. Ihre Gesamtphosphorylierungsgeschwindigeit durch menschliche wt-TmpK ist im Vergleich zum AZTMP noch einmal 20 bis 40-fach reduziert.

Enzym	**steady-state kinetische Konstante**	**Nukleotid**			
		N-MCAZTMP (1000 µM MgATP)	*MgATP (1000 µM N-MCAZTMP)*	*S-MCAZTMP (1000 µM MgATP)*	*MgATP (1000 µM S-MCAZTMP)*
$hsTmpK_{wt}$	$k_{cat,app}/s^{-1}$	≈ 0.0003		≈ 0.0006	
	$K_{M,app}/\mu M$	< 5	≈ 200	≈ 30	≈ 100
	$\frac{k_{cat,app}}{K_{M,app}}/M^{-1}s^{-1}$	> 40	≈ 1.5	≈ 20	≈ 6

Tab. 16: Steady-state Ergebnisse der Nukleotide mit fixierter Ribose-Konformation: In der Klammer ist die konstant gehaltene Konzentration des zweiten Substrats angegeben.

3.6.2.4 Steady-state hsTmpK-Mutanten mit dTMP und AZTMP

Im Verlauf dieser Arbeit gelang es, Mutanten der menschlichen Thymidylatkinase zu entwickeln, die AZTMP besser aktivieren als der Wildtyp [49]. Allerdings wurden nur apparente k_{cat}-Werte bei einer jeweils konstanten Konzentration von MgATP und dTMP bzw. AZTMP bestimmt. Für die Ableitung eines kinetischen Mechanismus war jedoch eine möglichst exakte Kenntnis der katalytischen Ratenkonstanten nötig, weil sonst die Konsistenz des abgeleiteten Mechanismus nicht überprüft werden kann. In Tabelle 17 wurden die mit einer 6x6-Matrix durch Extrapolation erhaltenen steady-state kinetischen Konstanten zusammengefaßt. Mit menschlichen TmpK-Mutanten wurden nur das natürliche Substrat dTMP und das monophosphorylierte Anti-HIV-Medikament AZTMP untersucht.

hsTmpK	**steady-state kinetische Konstante**	**Nukleotid**			
		dTMP	*MgATP*	*AZTMP*	*MgATP*
wt	k_{cat}/s^{-1}	0.70		0.012	
	$K_M/\mu M$	5	5	12	69
	$\frac{k_{cat}}{K_M}/M^{-1}s^{-1}\cdot 10^{-3}$	140	140	1.0	0.17
R200A/F105Y	k_{cat}/s^{-1}	0.17		0.25	
	$K_{M,}/\mu M$	4.2	2.3	3.8	6.4
	$\frac{k_{cat}}{K_M}/M^{-1}s^{-1}\cdot 10^{-3}$	40	74	66	39
[a] *R200A/R16G/E.coli small lid*	k_{cat}/s^{-1}	0.49		0.10	
	$K_M/\mu M$	4.4	6.2	32	128
	$\frac{k_{cat}}{K_M}/M^{-1}s^{-1}\cdot 10^{-3}$	111	79	3.1	0.8
[b] *R200A/R16G/E.coli large lid*	k_{cat}/s^{-1}	1.1		1.2	
	$K_M/\mu M$	22	3	8.7	13
	$\frac{k_{cat}}{K_M}/M^{-1}s^{-1}\cdot 10^{-3}$	50	370	148	99

Tab. 17: Ergebnisse der steady-state kinetischen Experimente (6x6-Matrix) mit den Mutanten der menschlichen Thymidylatkinase, zum Vergleich ist noch einmal der Wildtyp aufgeführt: [a]: Die Aminosäuren ^{145}AFGH^{148} der humanen TmpK wurden ersetzt durch ^{151}RARGEL^{156} der *E. coli*-TmpK; [b]: Die Aminosäuren ^{136}QLADAAKRGAFGH^{148} der humanen TmpK wurden ersetzt durch ^{142}TPEVGLKRARARGEL^{156} der *E. coli*-TmpK.

Zunächst wurde bei allen Enzymmutanten Arginin 200 gegen die Aminosäure Alanin ausgetauscht. Diese Mutation bewirkte keine Änderung in der steady-state Aktivität mit dTMP und AZTMP und war aus proteinkristallographischen Gründen notwendig, weil sich Arg 200 an der Oberfläche des Proteins befindet und mit dem Nukleotid eines symmetrieverwandten Moleküls wechselwirkte [110]. Einige Mutanten zeigten eine höhere katalytische Ratenkonstante für AZTMP als der Wildtyp. Wichtig war, daß gleichzeitig das Verhältnis der katalytischen Ratenkonstante von dTMP und AZTMP $\frac{k_{cat,dTMP}}{k_{cat,AZTMP}}$ für die Mutanten nicht größer wurde als für den Wildtyp. Das Endprodukt der Aktivierungskaskade – AZTTP - muß mit dTTP um die Bindungsstelle der Reversen Transkriptase, die das Triphosphat in die wachsende virale DNA einbaut, kompetieren.

Würde die Erhöhung von $k_{cat,dTMP}$ genauso groß sein wie die von $k_{cat,AZTMP}$, könnte zwar die AZTTP-Konzentration erhöht werden, im gleichen Maße würde aber auch die dTTP-Konzentration steigen, so daß der kompetitive Vorteil einer höheren AZTTP-Konzentration verloren gehen würde. Im folgenden werden die Mutanten mit einer höheren Aktivität in Bezug auf AZTMP näher beschrieben.

Der Austausch nur einer einzigen Aminosäure (Phenylalanin 105 gegen Tyrosin) führte zu einer zwanzigfachen Verbesserung der katalytischen Aktivität mit AZTMP (Tab. 17). Gleichzeitig zeigte diese Mutante verbesserte Bindungseigenschaften für die Nukleotide im ternären Kompelx (K_M-Werte), so daß die katalytische Effizienz im Vergleich zum Wildtyp um ein (für AZTMP) bzw. zwei (für MgATP) Größenordnungen gesteigert werden konnte. Mit der schnelleren AZTMP-Aktivierung war eine Verminderung des k_{cat}-Wertes für dTMP um den Faktor vier verbunden, so daß das Verhältnis $\frac{k_{cat,dTMP}}{k_{cat,AZTMP}}$ mit 0.68 zwei Größenordnungen kleiner war als für den Wildtyp mit $\frac{k_{cat,dTMP}}{k_{cat,AZTMP}}$ mit 61.

Auch die „small lid“-Mutante (R200A/R16G/*E. coli* small lid) aktivierte AZTMP besser als der Wildtyp. Die Phosphorylierungsgeschwindigkeit für dTMP war nur wenig reduziert. Das Verhältnis $\frac{k_{cat,dTMP}}{k_{cat,AZTMP}} = 4.9$ war hier nur um einen Faktor 10 kleiner als für den Wildtyp. Während sich die K_M-Werte für dTMP und MgATP kaum veränderten, verschlechterten sich die Bindungseigenschaften für AZTMP und MgATP gegenüber dem Wildtyp noch einmal. Daher unterschied sich die katalytische Effizienz dieser Mutante mit AZTMP und MgATP nicht von der für den Wildtyp. Sowohl der k_{cat}-Wert als auch die K_M-Werte für AZTMP und MgATP konnten durch den Austausch der kompletten menschlichen Lid-Region gegen die der *E. coli*-TmpK („large lid“-Mutante, R200A/R16G/*E. coli* large lid) noch einmal verbessert werden. Die katalytische Effizienz für AZTMP war 150-fach größer als bei dem Wildtyp-Enzym, die für MgATP sogar 600-fach. Bei beiden Lid-Mutanten mußte Arg 16 gegen Glycin ausgetauscht werden, um eine sterische Wechselwirkung dieses P-Loop-Arginins mit den Argininen aus dem *E. coli*-Lid und die damit verbundene Inaktivierung des Enzyms zu verhindern [49].

3.6.2.5 Bestimmung der Gleichgewichtskonstante in freier Lösung

Die Kenntnis der chemischen Gleichgewichtskonstante einer Reaktion war für die enzymkinetischen Untersuchungen mit TmpK außerordentlich wichtig, weil über die Haldane-Gleichung [111] die Michaeliskonstanten für den ternären Komplex, die Dissoziationskonstanten für den binären Komplex und die Katalyseraten für die Vor- bzw. Rückwärtsreaktion in Beziehung stehen. Unter der Annahme, daß TmpK einem *rapid equilibrium random bi-bi*-Mechanismus gehorcht, ist folgende Haldane-Beziehung gültig [112]:

$$\begin{aligned} K_{\mathrm{eq,\,freie\ L\ddot{o}sung}} &= \frac{k_{\mathrm{cat,\,v}} K_{\mathrm{M,\,NDP}} K_{\mathrm{d,\,MgADP}}}{k_{\mathrm{cat,\,r}} K_{\mathrm{d,\,NMP}} K_{\mathrm{M,\,MgATP}}} = \frac{k_{\mathrm{cat,\,v}} K_{\mathrm{d,\,NDP}} K_{\mathrm{M,\,MgADP}}}{k_{\mathrm{cat,\,r}} K_{\mathrm{d,\,NMP}} K_{\mathrm{M,\,MgATP}}} \\ &= \frac{k_{\mathrm{cat,\,v}} K_{\mathrm{d,\,NDP}} K_{\mathrm{M,\,MgADP}}}{k_{\mathrm{cat,\,r}} K_{\mathrm{M,\,NMP}} K_{\mathrm{d,\,MgATP}}} = \frac{k_{\mathrm{cat,\,v}} K_{\mathrm{M,\,NDP}} K_{\mathrm{d,\,MgADP}}}{k_{\mathrm{cat,\,r}} K_{\mathrm{M,\,NMP}} K_{\mathrm{d,\,MgATP}}} \end{aligned}$$

Hierin sind $k_{cat,v}$ und $k_{cat,r}$ die maximale katalytische Ratenkonstante für die Vor- bzw. Rückwärtsreaktion, K_d die Dissoziationskonstante und K_M die Michaelis-Konstante. Die Gleichgewichtskonstanten sind unabhängig von Enzym, denn das Enzym TmpK verändert als Katalysator per Definition nicht die Lage des Gleichgewichts, sondern erhöht nur die Geschwindigkeit bis zur Einstellung des Gleichgewichts. In der Tabelle 18 sind die Gleichgewichtskonstanten für die Umsetzung von dTMP und von AZTMP zusammengefaßt. Diese Gleichgewichtskonstanten nahe eins stimmten gut mit denen für andere NMP-Kinasen, beispielsweise AmpK [113], überein.

Nukleotid	*MgATP/dTMP*	*MgATP/AZTMP*
K_{eq}	0.85	0.87

Tab. 18: Gleichgewichtskonstanten in freier Lösung für dTMP und AZTMP.

3.6.2.6 Steady-state der Rückwärtsreaktion von hsTmpK mit dTDP und AZTDP

Bei der Rückwärtsreaktion mußte zwischen MgADP und magnesiumfreiem dTDP bzw. AZTDP unterschieden werden. TmpK akzeptiert nur MgADP auf der ATP/ADP-Bindestelle, und nur magnesiumfreies NDP auf der NMP/NDP-Bindestelle. Führt man nun die Rückwärtsreaktion im NADP-Puffer bei einer konstanten Mg^{2+}-Konzentration durch, so bilden sich immer MgADP und MgNDP. Für die Bestimmung der maximalen Ratenkonstante k_{cat} spielte diese Tatsache wegen der Extrapolation auf unendliche Nukleotidkonzentrationen keine so große Rolle, denn die einzelnen Meßkurven verliefen aufgrund der geringeren Konzentration der aktiven Spezies lediglich flacher. Die gemessenen apparenten K_M-Werte waren jetzt aber zu groß. Deswegen wurde für jede Nukleotidkonzentration mit Hilfe der quadratischen Gleichung für die Komplexbildung (Gl. 32) [60] (Appendix, Kapitel 8.1.4) die Konzentration von MgADP bzw. MgNDP berechnet. Voraussetzung für die Berechnung der Konzentrationen mit der quadratischen Gleichung war die Kenntnis der Dissoziationskonstante von MgNDP. Sie ist abhängig vom pH-Wert, der Ionenstärke und der Temperatur. Für die Bildung von Mg^{2+} und ADP aus MgADP bei 30 °C und pH 7.4 ist $K_d^{MgADP} \approx 350 \mu M$ [114]. Diese Dissoziationskonstante wurde als Näherung für die Auswertung der Daten benutzt. Für MgdTDP und MgAZTDP wurde derselbe Wert angenommen, weil die Dissoziationskonstante nur vom Grad der Phosphorylierung abhängt (NMP, NDP bzw NTP). Danach wurden die apparenten Ratenkonstanten gegen die Konzentration [MgADP] bzw. gegen $[NDP] = [NDP]_0 - [MgNDP]$ aufgetragen, so daß nach dieser Korrektur die Affinitäten experimentell zumindest abgeschätzt werden konnten.

Die Bestimmung der tatsächlichen K_M-Werte wurde weiterhin durch eine inhärente Eigenschaft des Hilfsenzymsystems HK/G6P-DH erschwert. Aufgrund der nichtlinearen Verzögerungsphase dieses gekoppelten Tests von ca. 40 s [115] wurde ein beträchtlicher Teil der Diphosphate schon verbraucht, bevor die Messung der Hydrolyserate erfolgen konnte. Dies spielte besonders bei niedrigen Nukleotidkonzentrationen eine Rolle, denn es bestand die Gefahr, daß die Bedingungen des Fließgleichgewichts nicht mehr erfüllt waren. Die apparenten Michaelis-Konstanten für die einzelnen Substratkonzentrationen konnten somit falsch sein. Der k_{cat}-Wert wurde nicht beeinflußt, denn für die Extrapolation der maximalen Ratenkonstante waren nur die Geschwindigkeiten bei hohen Substratkonzentrationen wichtig, bei denen die steady-state-Bedingungen trotz der nichtlinearen Verzögerung gegeben waren.

Eine Überprüfung der K_M-Werte der Rückwärtsreaktion war, zumindest für das Wildtyp-Enzym, aber mit Hilfe der Haldane-Gleichung, die im vorherigen Kapitel beschrieben wurde, möglich. Den K_M-Werte für MgADP erhielt man mit Hilfe der k_{cat}-Werte für die Vor- und Rückwärtsreaktion und der K_M bzw. K_d-Werte für die Edukte der Vorwärtsreaktion. Mit der Dissoziationskonstante für MgADP ($K_{d,\,hsTmpK_{wt}}^{MgADP} = 27\ \mu M$) konnten die Michaeliskonstanten der Nukleosiddiphosphate berechnet werden (Tab. 19).

Nukleotid	***dTDP/MgADP***				***AZTDP/MgADP***			
steady state kinetische Konstante	$K_{M,dTDP}$/µM		$K_{M,MgADP}$/µM		$K_{M,AZTDP}$/µM		$K_{M,MgADP}$/µM	
	gem	ber	gem	ber	gem	ber	gem	ber
hsTmpK$_{wt}$	1.4	0.6	2.3	0.6	1.0	1.8	105	1.3

Tab. 19: Gegenüberstellung der gemessenen und berechneten steady-state kinetische Konstanten für die Reaktion von hsTmpK$_{wt}$ mit dTDP bzw AZTDP. $K_{M,NDP}$ konnte mit dem K_M-Wert und dem K_d-Wert für MgATP bzw. für NMP berechnet werden, der angegebene Zahlenwert wurde durch Mittelung erhalten. (gem: gemessen; ber: berechnet).

Die gemessenen und berechneten K_M-Werte für die Rückwärtsreaktion unterschieden sich teilweise sehr deutlich. Der Unterschied des gemessenen und des berechneten K_M-Werts für MgADP im ternären Komplex mit AZTDP und hsTmpK$_{wt}$ betrug einen Faktor 80. Für die Umsetzung von AZTDP wurde neben der analytischen Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 3, Appendix, Kapitel 8.1.2) auch das entsprechende Differentialgleichungssystem (Gl. 12-16, Appendix, Kapitel 8.1.2) benutzt. Obwohl beide Analysemethoden denselben K_M-Wert für AZTDP lieferten, unterschied sich der berechnete K_M-Wert um einen Faktor 2. Offensichtlich beeinflußte der nichtlineare Verlauf der Absorptionskurven die Auswertung stark, so daß wohl eher die berechneten K_M-Werte den wahren Affinitäten entsprechen. Für die Mutanten der menschlichen TmpK standen keine Bindungsdaten für den binären Komplex zur Verfügung. Die gemessenen Affinitäten (Tab. 20) für die ternären Komplexe konnten daher nicht mit den Gleichgewichtsdaten und der Haldane-Gleichung überprüft werden. Diese Affinitäten können somit nur als Anhaltspunkte dienen und werden aufgrund der bestehenden Unsicherheiten nicht weiter kommentiert. Die katalytischen Ratenkonstanten für dTDP waren bei allen menschlichen TmpK identisch. TmpK aus der Maus setzte dTDP wieder schneller um als humane TmpK (Faktor 7). Klare Unterschiede zeigten sich bei der Reaktion von AZTDP mit MgADP. Das menschliche

Wildtyp-Enzym war 100 mal langsamer in der Umsetzung von AZTDP als die beste Mutante („large lid“-Mutante).

TmpK	**steady-state kinetische Konstante**	**Nukleotid**			
		dTDP	*MgADP*	*AZTDP*	*MgADP*
hsTmpK$_{wt}$	k_{cat}/s^{-1}	0.11		0.0012	
	$K_{M,}/\mu M$	0.6	0.6	1.8	1.3
hsTmpK$_{R200A/F105Y}$	k_{cat}/s^{-1}	0.14±0.01		0.018±0.001	
	$K_{M,}/\mu M$	1.2	2.4	2.4	1.4
$^{a)}$*hsTmpK$_{R200A/R16G/E.coli\ small\ lid}$*	k_{cat}/s^{-1}	0.14±0.01		0.0021±0.0001	
	$K_M/\mu M$	1.5	4.0	0.4	7
$^{b)}$*hsTmpK$_{R200A/R16G/E.coli\ large\ lid}$*	k_{cat}/s^{-1}	0.17±0.01		0.26±0.01	
	$K_M/\mu M$	1.3	3.2	3.6	7.8
murin TmpK$_{wt}$	k_{cat}/s^{-1}	0.72±0.02		0.018±0.001	
	$K_M/\mu M$	2.2	21	3.3	98

Tab. 20: Ergebnisse der steady-state kinetischen Experimente der Rückwärtsreaktion (6x6-Matrix) mit verschiedenen menschlichen TmpK-Mutanten und der wt-TmpK aus der Maus: $^{a)}$: Die Aminosäuren ^{145}AFGH^{148} der humanen TmpK wurden ersetzt durch ^{151}RARGEL^{156} der *E. coli*-TmpK; $^{b)}$: Die Aminosäuren ^{136}QLADAAKRGAFGH^{148} der humanen TmpK wurden ersetzt durch ^{142}TPEVGLKRARARGEL^{156} der *E. coli*-TmpK.

3.6.2.7 Kooperativität der Bindungsstellen

Der Begriff Kooperativität (Symbol α) beschreibt den Einfluß der Bindung des ersten Substrats auf die Substrataffinität der zweiten Bindungsstelle [116]. Wird die Substrataffinität der zweiten Bindestelle bei besetzter erster Bindestelle größer, spricht man von einem synergistischen Effekt, im anderen Fall von einem antagonistischen. Nach den Gesetzen der Thermodynamik (mikroskopische Reversibilität) muß der Faktor α für beide Substrate gleich sein. Mathematisch ist α folgendermaßen definiert: $\alpha = \frac{K_{M,\text{ternär}}}{K_{d,\text{binär}}}$. Kooperative Bindungsereignisse sind bei Phosphotransferasen keine Seltenheit. So wurde beispielsweise bei der Bindung von MgATP und AMP an Hühnchen-Adenylatkinase ein Synergismus beschrieben [117], während menschliche Thymidinkinase 1 und 2 sowohl mit Thymidin als auch mit AZT negative

Kooperativität zeigte [118, 119]. Bei der menschlichen 2'-Deoxycytidinkinase waren die Affinitäten im ternären Komplex gegenüber dem binären vermindert [120 – 122], und schließlich hatte auch die Substratbindung bei der hexameren UmpK$_{E.\ coli}$ kooperative Eigenschaften [123].

S_1 **S_2**	*MgATP* *dTMP*	*dTMP* *MgATP*	*MgATP* *AZTMP*	*AZTMP* *MgATP*	*MgADP* *dTDP*	*dTDP* *MgADP*	*MgADP* *AZTDP*	*AZTDP* *MgADP*
$K_{d,S1}$	16	26	16	7	27	23	27	22
$K_{M,S1}$	5	5	69	12	0.6	0.6	1.3	1.8
α_{S1}	0.3	0.2	4	2	0.022	0.026	0.04	0.06
$\overline{\alpha}$	0.25 ± 0.05		3 ± 1		0.024 ± 0.002		0.06 ± 0.02	

Tab. 21: Übersicht über die Kooperativitätsfaktoren für hsTmpK$_{wt}$ mit dTMP/dTDP bzw. AZTMP/AZTDP. $\overline{\alpha}$ ist der Mittelwert der Kooperativitätsfaktoren beider Substrate.

Auch bei TmpK war eine sehr starke Kooperativität zwischen den Bindungsstellen vorhanden. Besonders auffällig war der gegenläufige Effekt für dTMP und AZTMP. Bei dTMP war die Bindung synergistisch, während sie bei AZTMP eindeutig antagonistisch war. In der Tabelle 21 wurden die für die Berechnung der Kooperativität relevanten Daten noch einmal zusammengestellt. S_1 ist das Substrat auf der ersten Bindungsstelle, S_2 das auf der zweiten Bindungsstelle. Die Bindungsaffinitäten, die als Mittelwert aus fluoreszenzspektroskopischer und kalorimetrischer Messung erhalten wurden, sind jeweils nur für das Substrat S_1 aufgelistet.

3.6.2.8 Inhibierung der Vorwärtsreaktion

Bei den steady-state Experimenten mit menschlicher wt-TmpK wurde eine Substratinhibierung durch dTMP bzw. AZTMP festgestellt. Die katalytische Aktivität fiel bei dTMP- und AZTMP-Konzentrationen, die über deren K_M-Werte hinausgingen, ab. Dieser Effekt wurde bei der Adenylatkinase aus Kaninchen [12] und der Pyrimidinmonophosphatkinase aus dem Knochenmark von Ratten [124] ebenfalls beobachtet und mit einer Kompetition zwischen AMP (bei der Adenylatkinase) bzw. UMP (bei der Pyrimidinmonophosphatkinase) und MgATP um die ATP-Bindungsstelle erklärt. Die entsprechenden Meßpunkte wurden bei der Auswertung mit der analytischen Michaelis-Menten-Gleichung nicht berücksichtigt. Die Bestimmung der Inhibierungskonstante K_i war nur mit Gleichung 25 und dem Computerprogramm Scientist möglich (Appendix, Kapitel 8.1.3). Die Berechnung von K_i erforderte Informationen über die Kooperativität der Bindungsstellen (Tab. 21). Die erhaltenen Inhibierungskonstanten sind in der Tabelle 22 zusammengestellt.

hsTmpK	**Konstante**	**Nukleotid**	
		dTMP	*AZTMP*
wt	α	0.25	3
	K_i/µM	10±4	2500±2000

Tab. 22: Inhibierung der katalytischen Aktivität der humanen wt-TmpK durch die Konkurrenz von dTMP bzw. AZTMP und MgATP um die ATP-Bindestelle: Die angegebenen Fehler wurden mit dem Computerprogramm Scientist ermittelt und stellen die Abweichung der mit dem Modell simulierten von den gemessen Daten dar. Der große Fehler für $K_{i,AZTMP}$ ist in der Messung begründet. Die verwendeten Nukleotidkonzentrationen ($[MgATP]_{max}$ = 1000 µM und $[AZTMP]_{max}$ = 500 µM) waren zu gering, um die Inhibierungskonstante genauer bestimmen zu können.

Die Inhibierung der menschlichen TmpK-Aktivität durch dTMP war sehr stark, während die durch AZTMP, trotz des großen Fehlers, mindestens 50 mal schwächer war. Für die Thymidylatkinase aus *S. cerevisiae* wurde eine Inhibierungskonstante für AZTMP von 30 µM beschrieben [40]. Als ein Grund für die schlechte Aktivierung von AZTMP wurde deshalb die Inhibierung durch millimolare Konzentrationen dieses Anti-HIV-Medikaments angenommen. Dieser Effekt ist bei der menschlichen Thmyidylatkinase zwar mindestens 20-fach schwächer, doch aufgrund der hohen AZTMP-Konzentrationen in der Zelle [125] erscheint eine Inhibierung immer noch wahrscheinlich.

3.7 Nukleotidassoziations- und -dissoziationsratenkonstanten

Für die Bestimmung eines kinetischen Mechanismus waren auch die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten der Nukleotide von Interesse. In dieser Arbeit ist zumindest eine Abschätzung dieser Ratenkonstanten für die binären Enzym-Nukleotid-Komplexe aus $hsTmpK_{wt}$ mit MgATP, MgADP, dTMP, dTDP, AZTMP und AZTDP gelungen. Die Ermittlung dieser Parameter für MgATP und MgADP war verhältnismäßig einfach. MgATP bzw. MgADP konnten aus den binären Komplexen mit hsTmpK$_{wt}$ durch TP$_5$A-mant verdrängt werden, weil dieser Fluorophor eine sehr große Affinität zu TmpK (K_d = 336 nM) und eine hohe Assoziationsratenkonstante ($k_{ass} = 51\ \mu M^{-1}s^{-1}$) hatte.

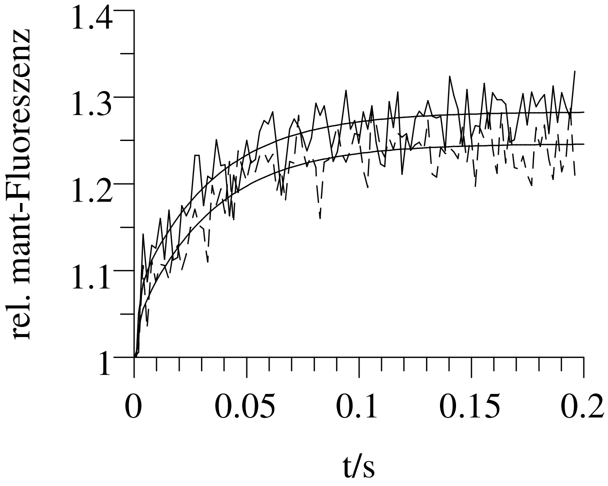


Abb. 40: Verdrängung von jeweils 600(300) µM MgADP (—) bzw. MgATP (-----) aus einem Komplex mit 0.2(0.1) µM hsTmpK$_{wt}$ durch (100)50 µM TP$_5$A-mant bei 25 °C in Standardfluoreszenzpuffer: Der hohe Überschuß an Fluorophor führte zu einer 90%-igen Sättigung des Enzyms nach der Verdrängung, wodurch eine erneute Verdrängung des Fluorophors durch das Nukleotid nahezu verhindert wurde.

Zunächst wurden die Konzentrationen an TmpK und Nukleotid mit Hilfe der quadratischen Gleichung und den bekannten Dissoziationskonstanten so eingestellt, daß eine mindestens 95 %-ige Sättigung des Enzyms vorlag. Danach wurde das Nukleotid mit einem Überschuß TP$_5$A-mant verdrängt (Abb. 40). Beide Fluoreszenzkurven konnten mit einer zweifach exponentiellen Gleichung ausgewertet werden. Die erste, außerordentlich schnelle Phase der Reaktion ($k_{app} \approx 700\ ^{s-1}$) spiegelte die Bindung des Fluorophors an noch vorhandenes freies Enzym wider. Die effektive Assoziationsratenkonstante für TP$_5$A-mant war bei den gewählten Konzentrationen ca. 2500 s^{-1}. Aufgrund der Totzeit des stopped-flow Geräts von ca. 2 ms konnte diese Rate nicht genauer bestimmt werden. Die nach der Verdrängung von MgADP bzw. MgATP vorhandene 90 %-ige Sättigung des Enzyms mit Fluorophor stellte nahezu sicher, daß das Nukleotid nicht erneut binden konnte. Damit konnte die apparante zweite Ratenkonstante mit einem geringen Fehler als Dissoziationsratenkonstante von

MgADP bzw. MgATP interpretiert werden, denn sie sollte nicht mehr die Summe aus Bindung und Verdrängung des Fluorophors repräsentieren, sondern nur dessen tatsächlich mögliche Assoziationsratenkonstante. Diese wurde aber limitiert durch die Dissoziationsratenkonstante des Nukleotids, denn der Flurophor konnte nicht schneller assoziieren als das Nukleotid dissoziierte. Über die bekannten Dissoziationskonstanten für MgADP und MgATP konnten dann ebenfalls die Assoziationsratenkonstanten für diese beiden Nukleotide berechnet werden (Tab.23)

Enzym	***hsTmpK$_{wt}$***	
Nukleotid	*MgADP*	*MgATP*
$K_d/\mu M$	27±2	16±2
k_{diss}/s^{-1}	29.2±0.4	29±1
$k_{ass}/\mu M^{-1}s^{-1}$	1.4±0.1	1.8±0.3

Tab. 23: Bindung und Freisetzung von Nukleotiden der A-Bindestelle.

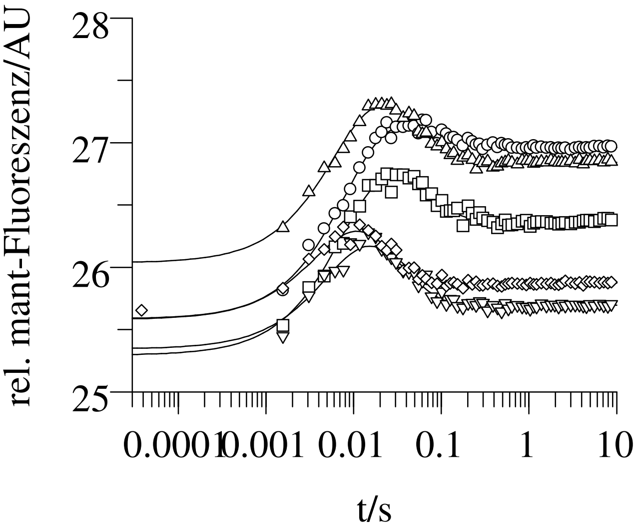


Abb. 41: Fluoreszenzverlauf der Kompetition von $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP und dTMP um die Bindung an humane wt-TmpK: Bei 25 °C wurden in Standardfluoreszenzpuffer 0.5(0.25) µM TmpK in Spritze 1 mit 5(2.5) µM $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP und steigenden dTMP-Konzentrationen (0.2(0.1) µM (○), 0.8(0.4) µM (□), 2(1) µM (Δ), 5(2.5) µM (∇), 10(5) µM (◊)) in Spritze 2 gemischt.

Die Untersuchung der T-Bindestelle war wesentlich komplexer. $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP war aufgrund der schlechten Bindungseigenschaften nicht als Verdränger der Nukleotide geeignet. Deswegen wurde zunächst ein Kompetitionsexperiment im stopped-flow Gerät durchgeführt. In einer Spritze befand sich TmpK, in der anderen konstante

Konzentrationen $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP mit verschiedenen dTMP-Konzentrationen. Diese wurden dann gemischt und der Zeitverlauf der Fluoreszenz untersucht (Abb. 41).

Es wurden zweiphasige Meßkurve erhalten, bei der die Fluoreszenz zunächst anstieg und nach Erreichen eines Vorgleichgewichts wieder sank. Aufgrund der durch die Konzentrationen bestimmten höheren effektiven Ratenkonstante assoziierte zunächst der Fluorophor und verursachte eine Fluoreszenzerhöhung. Dieses wurde dann aber wegen der geringeren Affinität im Vergleich mit dTMP und der steigenden dTMP-Konzentrationen schließlich verdrängt. Die Datenanalyse wurde mit einer *global-fit* Prozedur für folgendes einfaches kompetitives Verdrängungsmodell versucht:

$$\text{TmpK} + P_{(\beta)}\text{–MAHA-TDP} \underset{k_{diss,MAHA}}{\overset{k_{ass,MAHA}}{\rightleftharpoons}} \text{TmpK.}P_{(\beta)}\text{-MAHA-TDP}$$

$$\text{TmpK} + \text{dTMP} \underset{k_{diss,dTMP}}{\overset{k_{ass,dTMP}}{\rightleftharpoons}} \text{TmpK.dTMP}$$

Dies gelang nicht, und das Modell wurde sowohl um stöchiometrische Faktoren für den Fluorophor und für dTMP als auch um die Bildung eines ternären Komplexes erweitert. Diese Modelle besaßen jedoch zu viele Freiheitsgerade bei zu wenig sicher bekannten Ratenkonstanten, so daß die *global-fit* Auswertung nicht möglich war.

Beide apparenten Ratenkonstanten zeigten aber eine einfache Abhängigkeit von der dTMP-Konzentration: Der Auftrag von k_{app1} über der dTMP-Konzentration ergab eine Gerade und k_{app2} hing hyperbolisch von der dTMP-Konzentration ab (Abb. 42). Die Amplituden der zeitlichen Fluoreszenzverläufe wurden mit steigender dTMP-Konzentration kleiner. Dies war zu erwarten, denn es konnte nur die Bindung und Freisetzung des Fluorophors detektiert werden, und mit steigender dTMP-Konzentration band immer weniger Fluorophor. In einer Veröffentlichung über die Kompetition eines Fluorophors (ε-ATP) und ATP bei der Bindung an G-Aktin [126] wurde ebenfalls eine lineare Abhänigigkeit der apparenten Ratenkonstante von der ATP-Konzentration beobachtet. Bei einer konstanten Flurophorkonzentration ergab sich aus dem Achsenabschnitt der Auftragung von k_{app} über der ATP-Konzentration die Assoziationsratenkonstante für ε-ATP und aus der Steigung die für ATP. Die kinetischen Voraussetzungen im Fall der TmpK unterschieden sich aber deutlich von denen im Fall des G-Aktin: Hier waren sowohl die Assoziationsratenkonstante von ε-

ATP als auch die von ATP um drei bis vier Größenordnungen größer als die entsprechenden Dissoziationsratenkonstanten. Die beobachtete Ratenkonstante des Experiments setzte sich nun aus den insgesamt vier Ratenkonstanten für den Fluorophor bzw. den Kompetitor zusammen, und aufgrund der großen Unterschiede konnten die Dissoziationsratenkonstanten für den Fluorophor und den Kompetitor vernachlässigt werden. Im Fall der TmpK trafen diese Vereinfachungen jedoch nicht zu. Die Dissoziationsratenkonstante für $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP war vierzig mal größer als die Assoziationsratenkonstante. Aufgrund der gemessenen Dissoziationskonstante schien das Verhältnis für dTMP ähnlich zu sein. Die Amplitude der Analyse von k_{app2} entsprach jedoch der Dissoziationsratenkonstante von $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP. Die Steigung der Analyse von k_{app1} war möglicherweise die Assoziationsratenkonstante für dTMP. Diese kinetische Bedeutung der Steigung und des Ordinatenabschnitts (k_{app1}) bzw. der Amplitude (k_{app2}) konnte jedoch nicht abgeleitet werden.

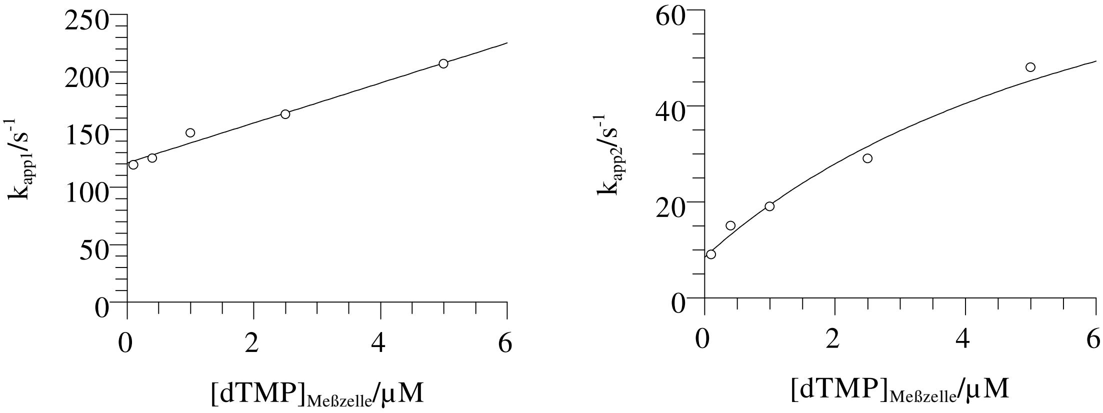


Abb. 42: Konzentrationsabhängigkeit der beiden beobachteten Ratenkonstanten des Kompetitionsexperiments: k_{app1} (linker Graph) zeigte eine lineare Abhängigkeit von der dTMP-Konzentration mit einer Steigung $m = 17 \pm 1\ \mu M^{-1}s^{-1}$ und einem Ordinatenabschnitt $y = 121 \pm 4\ s^{-1}$. Die Amplitude der Auftragung von k_{app2} über der dTMP-Konzentration (rechter Graph) betrug $91 \pm 15\ s^{-1}$.

Ein weiteres stopped-flow Experiment legte die Vermutung nahe, daß der Verdrängungsmechanismus des Fluorophors nicht kompetitiv war. Bei diesem Experiment wurde $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP im stopped-flow Gerät mit steigenden Konzentrationen der vier Nukleotide dTMP, dTDP, AZTMP und AZTDP verdrängt, wobei die beobachteten Ratenkonstanten mit steigender Nukleotidkonzentration zunahmen (Abb. 43).

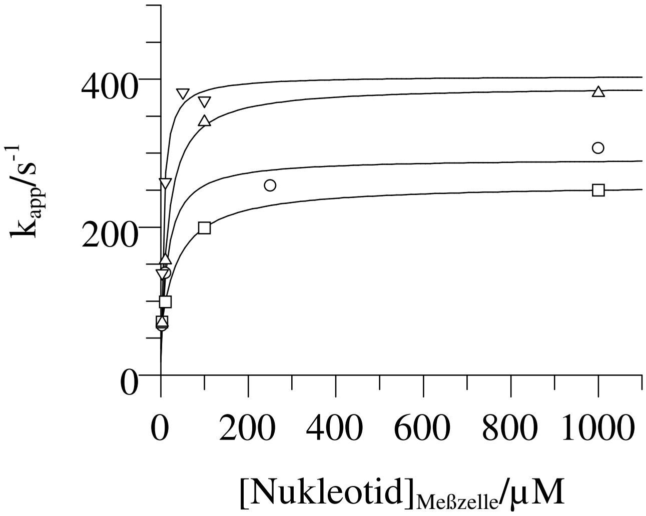


Abb. 43: Zeitaufgelöste Verdrängung von $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP durch dTMP (○), dTDP (□), AZTMP (Δ) und AZTDP (∇): Die Konzentration des Fluorophors betrug bei jeder Messung 1(0.5) µM. Die Messung wurde in Standardfluoreszenzpuffer durchgeführt. Alle Meßkurven wurden mit einer hyperbolischen Gleichung analysiert.

Aus der über der Dissoziationsratenkonstante des Fluorophors liegenden beobachteten maximalen Ratenkonstante konnte auf einen assoziativen Verdrängungsmechanismus, bei dem sich ein ternärer Komplex bildet, geschlossen werden [127]. Die Nukleotide schienen in Gegenwart des Fluorophors am zweiten, nicht besetzten Monomer zu binden und die Dissoziation von $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP durch strukturelle Wechselwirkungen zu beschleunigen. Dieser Befund eröffnete allerdings die Möglichkeit, die Assoziationsratenkonstanten für die vier T-Nukleotide zumindest abzuschätzen. Bei niedrigen Nukleotidkonzentrationen (z. B. 0.1 µM) wurde davon ausgegangen, daß die Dissoziation von $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP noch nicht limitierend war, sondern eher die Assoziation des T-Nukleotids, weil die maximale beobachtete Dissoziationsratenkonstante für den Fluorophor erst bei sehr viel höheren T-Nukleotidkonzentrationen erreicht wurde (50 - 200 µM). Eine erneute Bindung des Fluorophors sollte aufgrund der geringen effektiven Assoziationsratenkonstante $k_{ass,eff} \approx 1\ s^{-1}$ nicht sehr stark in die apparente Ratenkonstante eingehen. Damit beschrieb die Anfangssteigung der hyperbolischen Kurve, die durch Ableitung der zugehörigen Gleichung erhalten wurde, in guter Näherung die Assoziationsratenkonstante für das T-Nukleotid. Mit den bekannten Dissoziationskonstanten konnten dann auch die Dissoziationsratenkonstanten abgeschätzt werden (Tab. 24).

Enzym	***hsTmpK$_{wt}$***			
Nukleotid	*dTMP*	*dTDP*	*AZTMP*	*AZTDP*
K_d/µM	26	23	7	22
k_{ass}/µM^{-1}s^{-1}	≈ 15	≈ 5	≈ 20	≈ 60
k_{diss}/s^{-1}	≈ 400	≈ 120	≈ 140	≈ 1300

Tab. 24: Zusammenstellung der abgeschätzten Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten für die T-Nukleotide bei $[\text{T-Nukleotid}]_{\text{Meßzelle}}$ = 0.1 µM: Die Dissoziationskonstanten wurden innerhalb der Fehlergrenzen als Mittelwert aus den fluoreszenzspektroskopischen und kalorimetrischen Bestimmungen berechnet.

3.8 Quenched-flow Kinetik

Zur weiteren Analyse des kinetischen Mechanismus der Kinasereaktion wurden mit humaner wt-TmpK sowie mit zwei Mutanten (hsTmpK$_{\text{R200A/F105Y}}$ und hsTmpK$_{\text{R200A/R16G/}\textit{E. coli}\text{ small lid}}$), die AZTMP besser aktivieren als der Wildtyp, Experimente durchgeführt, die die Substratfreisetzung als möglichen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt ausschalteten. Bei diesen single turnover Experimenten wurde mit einem anderthalbfachen Enzymüberschuß gearbeitet. Dieser Überschuß gewährleistete aufgrund der bekannten Bindungskonstanten im mikromolaren Bereich eine nahezu vollständige Bindung der eingesetzten Nukleotide an das Enzym im ternären Komplex. Als Substrate wurden dTMP/dTDP bzw. AZTMP/AZTDP untersucht. Der Reaktionspartner war MgATP für die Monophosphate und MgADP für die Diphosphate. Die Reaktion wurde durch das Mischen von TmpK und dem entsprechenden Nukleotidgemisch gestartet und nach verschiedenen Reaktionszeiten durch Zugabe von Trichloressigsäure gestoppt. Der Nukleotidgehalt wurde dann mittels HPLC untersucht. Vorexperimente zeigten jedoch, daß die single turnover Geschwindigkeit in der Regel zu groß war, um diese Versuche im Handmischverfahren durchzuführen. Deswegen wurde eine Technik, die als quenched-flow Technik bezeichnet wird, benutzt. Dabei geschieht das Mischen, also der Reaktionsstart, und das Stoppen der Reaktion automatisch mit einem quenched-flow Gerät. Diese Technik wurde unter anderem zur Bestimmung kinetischer Daten bei der Signalübertragung, bei DNA-Enzym-Wechselwirkungen, bei Untersuchungen von Muskelenzymen oder bei der Proteinphosphorylierung verwendet [128 - 133]. Das quenched-flow Gerät der Firma Kintek (Material und Methoden, Kapitel 2.2.8.3) erlaubte dabei die Messung minimaler Reaktionszeiten von 2 ms.

3.8.1 Quenched-flow Kinetik mit hsTmpK$_{wt}$

3.8.1.1 Umsetzung von dTMP/dTDP

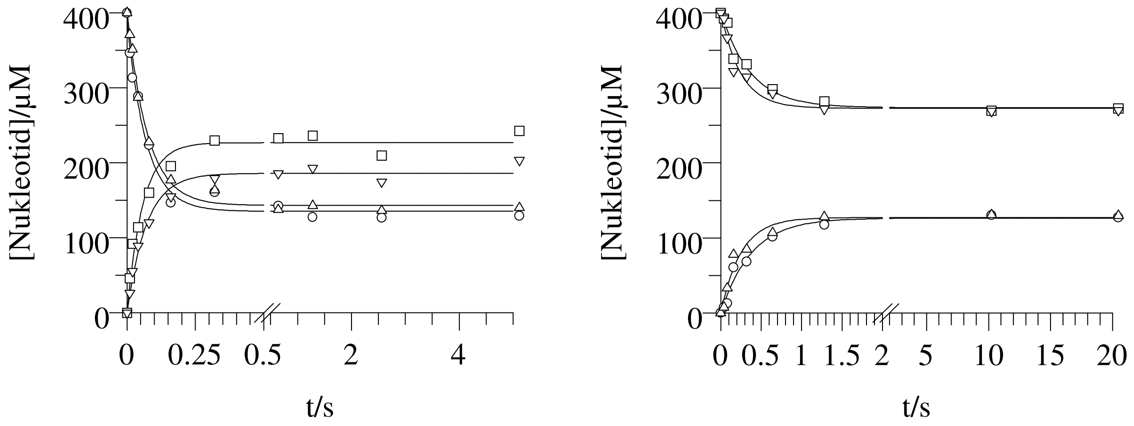


Abb. 44: Single turnover Analyse der Vorwärtsreaktion (linker Graph) und der Rückwärtsreaktion (rechter Graph) von hsTmpK$_{wt}$ mit dTMP bzw. dTDP: Die erhaltenen Datenpunkte wurden mit einer einfach exponentiellen Gleichung analysiert, die im Text angegebenen Fehler ergaben sich als Standardabweichung des Mittelwerts der vier Ratenkonstanten für die Nukleotide (ATP (○); ADP (□); dTMP (Δ); dTDP (∇)).

In der Abbildung 44 sind die mit der quenched-flow Technik erhaltenen single turnover Ergebnisse der humanen wt-TmpK für die Vorwärtsreaktion und die Rückwärtsreaktion dargestellt. Durch die single turnover Bedingungen wurde die Produktfreisetzung als möglicher ratenlimitierender Schritt ausgeschaltet. Der Prozeß der Produktfreisetzung umfaßte sowohl die Konformationsänderung beim Übergang vom aktiven in den inaktiven Komplex als auch die Dissoziation der Produkte. Diese Dissoziation war aber schnell, was auch bei anderen Kinasen beobachtet wurde. So dissoziierte beispielsweise ATP aus einem Komplex mit UmpK$_{D.\ discoideum}$ mit einer Ratenkonstante von mindestens 20000 s^{-1} [134]. Die Umsetzung der Substrate geschah im Falle der Vorwärtsreaktion mit $\overline{k}_{quench} = 14 \pm 1 s^{-1}$, bei der Rückwärtsreaktion mit $\overline{k}_{quench} = 3.3 \pm 0.8 s^{-1}$. Dies bedeutete eine Beschleunigung der Reaktion um mehr als eine Größenordnung gegenüber der steady-state Geschwindigkeit.

3.8.1.2 Umsetzung von AZTMP/AZTDP

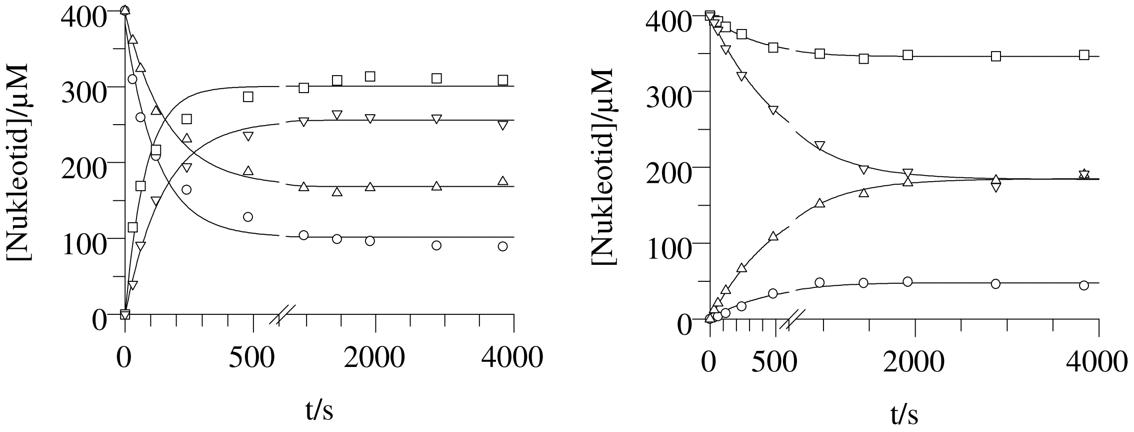


Abb. 45: Single turnover Analyse der Vorwärtsreaktion (linker Graph) und der Rückwärtsreaktion (rechter Graph) von hsTmpK$_{wt}$ mit AZTMP bzw. AZTDP: Die erhaltenen Datenpunkte wurden mit einer einfach exponentiellen Gleichung analysiert, die im Text angegebenen Fehler ergaben sich als Standardabweichung des Mittelwerts der Ratenkonstanten für die vier Nukleotide. (ATP (○); ADP (□); AZTMP (Δ); AZTDP (∇)).

Als nächstes wurde ein single turnover Experiment mit AZTMP bzw. AZTDP durchgeführt, um mögliche Erkenntnisse über den ratenlimitierenden Schritt für dieses monophosphorylierte Anti-HIV-Medikament zu erhalten (Abb. 45). Trotz Ausschaltung der Produktfreisetzung als möglichem ratenlimitierendem Schritt entsprachen die erhaltenen Ratenkonstanten der quenched-flow Experimente denen der steady-state Messungen. Für die Vorwärtsreaktion wurde $\overline{k}_{quench} = 0.008 \pm 0.002\,s^{-1}$ und für die Rückwärtsreaktion $\overline{k}_{quench} = 0.0021 \pm 0.0005\,s^{-1}$ gemessen. Daraus konnte sofort gefolgert werden, daß der entscheidende kinetische Schritt bei der Umsetzung von AZTMP/AZTDP nicht der Übergang vom aktiven in den inaktiven Enzymzustand, also das Öffnen der Lid-Region des Enzyms, war. Aufgrund der hohen effektiven Assoziationsratenkonstanten der Nukleotide schied zudem die Bindung der Nukleotide als geschwindigkeitsbestimmender Schritt aus.

3.8.1.3 Nukleotidverdrängung aus dem Gleichgewicht

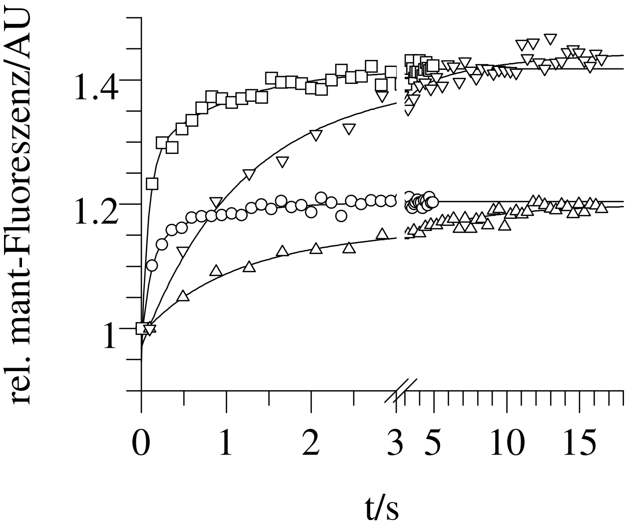


Abb. 46: Verdrängung der Gleichgewichtsmischungen von ATP/ADP/dTMP/dTDP durch (10)5 µM (○) bzw. (20)10 µM (□) TP_5A-mant und von ATP/ADP/AZTMP/AZTDP durch (10)5 µM (Δ) bzw. (20)10 µM (∇) TP_5A-mant aus einem Komplex mit humaner wt-TmpK: Für die Reaktion von dTMP mit MgATP wurden jeweils 150(75) µM MgATP und dTMP mit 0.5(0.25) µM $hsTmpK_{wt}$ 30 min bei 25 °C bis zur Einstellung des Gleichgewichts inkubiert. Für die Umsetzung von AZTMP und MgATP wurden 3000(1500) µM MgATP und 400(200) µM AZTMP mit 0.5(0.25) µM $hsTmpK_{wt}$ 3 h bei 25 °C in Standardfluoreszenzpuffer bis zur Einstellung des Gleichgewichts inkubiert.

Danach wurde in stopped-flow Experimenten ein Gemisch aus ATP/ADP/dTMP/dTDP bzw. ATP/ADP/AZTMP/AZTDP nach Einstellung des Gleichgewichts mit TP_5A-mant aus einem Komplex mit humaner wt-TmpK verdrängt (*chase* Experiment). Durch diese Experimente konnten Erkenntnisse über die Geschwindigkeit der Produktfreisetzung erhalten werden, denn die gemessenen apparenten Ratenkonstanten waren eben durch die Produktfreisetzung bestimmt. TP_5A-mant konnte nicht schneller assoziieren als die Nukleotide dissoziieren. Sollten sich die entsprechenden Ratenkonstanten bei mit Nukleotid gesättigtem Enzym für die Vorwärts- und die Rückwärtsreaktion voneinander unterscheiden, war eine zweiphasige Kurve zu erwarten. Die Verdrängung erfolgte mit zwei Fluorophorkonzentrationen (5 µM und 10 µM). Bei beiden Konzentrationen betrug der Sättigungsgrad des Enzyms nach der Verdrängung mehr als 90 %. Eine erneute Assoziation der Nukleotide lag somit im Rahmen des Meßfehlers, so daß die gemessenen Ratenkonstanten in guter Näherung als Ratenkonstanten für die

Produktfreisetzung aus dem ternären Komplex interpretiert werden konnten (Abb. 46). Sowohl die Verdrängung von dTMP/dTDP als auch von AZTMP/AZTDP zeigten zweiphasige Fluoreszenzverläufe. Die Mittelwerte der Ratenkonstanten für dTMP/dTDP waren $k_{app1} = 1.0 \pm 0.1\ s^{-1}$ und $k_{app2} = 0.16 \pm 0.02\ s^{-1}$. Für AZTMP/AZTDP ergab sich $k_{app1} = 11 \pm 2\ s^{-1}$ und $k_{app2} = 1.1 \pm 0.2\ s^{-1}$.

3.8.1.4 Arbeitsmodell für die TmpK-Reaktion

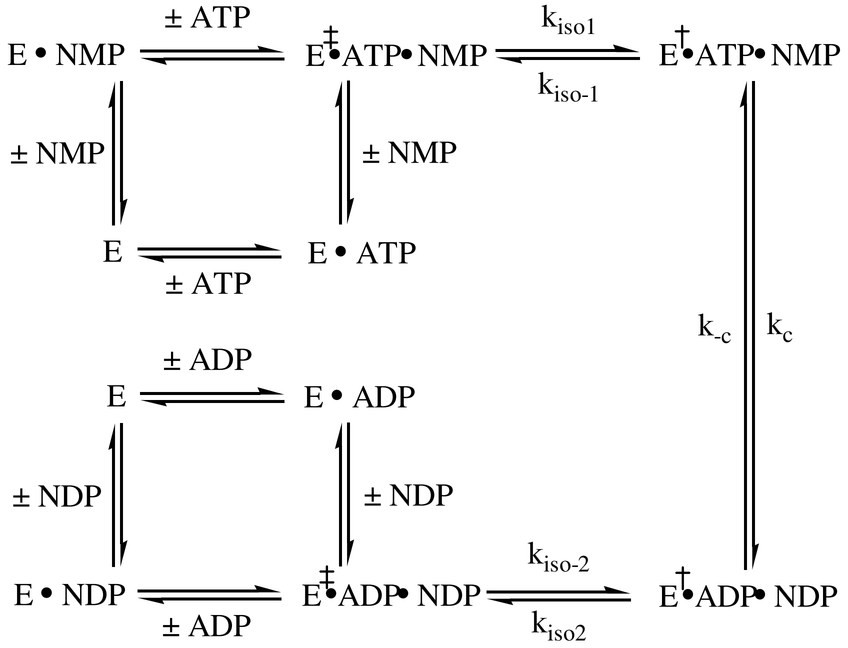


Abb. 47: Arbeitsmodell für die TmpK-Reaktion: Bei NMP-Kinasen werden im allgemeinen durch Substratbindung und -freisetzung verursachte offene (‡) und geschlossene (†) Enzymstrukturen beobachtet (*induced fit* Mechanismus), wodurch die einfache Hydrolyse des Phosphoryldonors (ATPase-Aktivität) nahezu verhindert wird. Für menschliche wt-TmpK betrug beispielsweise diese ATPase-Aktivität ca. $\frac{1}{25000}$ (turnover-Zahl = $2.7 \cdot 10^{-5}\ s^{-1}$) der steady-state Aktivität.

Um einen Zusammenhang zwischen den steady-state kinetischen Konstanten (k_{cat} und K_M), den Bindungskonstanten im binären Komplex (K_d), den quenched-flow und stopped-flow Daten erkennen zu können, war zunächst ein kinetisches Arbeitsmodell für die TmpK-Reaktion notwendig. Auf der Basis des für AmpK aus Kaninchen abgeleiteten *random bi-bi*-Mechanismus [12] und dem Konzept des *induced fit* [135] wurde das in Abbildung 47 dargestellte Arbeitsmodell für die TmpK-Reaktion zugrundegelegt. Die Annahme eines ähnlichen Mechanismus für TmpK war sinnvoll, weil TmpK und AmpK funktionell absolut identisch sind: Es werden zwei Substrate gleichzeitig gebunden, die chemische Reaktion ist dieselbe (nukleophile Substitution, S_{N2}-Mechanismus) und die Reaktion ist reversibel. Aus den Experimenten wurden keine Hinweise auf ein geordneten Bindungsmechanismus erhalten. Für alle Nukleotide konnten unabhängig voneinander Affinitäten gemessen werden.

3.8.1.5 Kinetischer Mechanismus der humanen wt-TmpK

Mit den in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen kinetischen Ergebnissen konnte nun für menschliche wt-TmpK ein Mechanismus auf der Grundlage des minimalen Reaktionsschemas bei offenen und geschlossenen Enzymkonformationen abgeleitet werden. Diese Ableitung soll exemplarisch für den humanen Wildtyp mit dTMP und AZTMP detailliert durchgeführt werden, für die R200A/F105Y-Mutante bzw. die R200A/R16G/*E. coli* small lid-Mutante war die Ableitung analog. Die für die Ratenkonstanten verwendete Nomenklatur entspricht der in Abbildung 47, in der Abbildung 48 ist der kinetische Mechanismus für menschliche wt-TmpK mit dTMP und AZTMP schematisch dargestellt.

Experiment	*steady state*		*single turnover*		*stopped flow*		*Equilibrium*
Nukleotid	$k_{cat,v}$	$k_{cat,r}$	$k_{quench,v}$	$k_{quench,r}$	k_{chase1}	k_{chase2}	$K_{eq,Enzym}$
dTMP/dTDP	0.7	0.11	14	3.3	1	0.16	0.75
AZTMP/AZTDP	0.012	0.0012	0.008	0.002	11	1.1	0.95

Tab. 25: Zusammenfassung der experimentell ermittelten Ratenkonstanten für die Vorwärtsreaktion (mit MgATP) und die Rückwärtsreaktion (mit ADP) von $hsTmpK_{wt}$ sowie der entsprechenden chemischen Gleichgewichtskonstanten am Enzym.

Zunächst wurde durch steady-state Analyse die Ratenkonstante des langsamsten und damit geschwindigkeitsbestimmenden Schritts für die Umsetzung von dTMP und AZTMP (Vorwärtsreaktion) bzw. die Umsetzung von dTDP und AZTDP (Rückwärtsreaktion) gemessen (Tab. 25). Die entsprechenden Ratenkonstanten erhielten das Symbol $k_{cat,v}$ bzw. $k_{cat,r}$. Der zweite Schritt bestand aus einer single turnover Analyse der Kinetik der Vorwärts- und der Rückwärtsreaktion. Dabei war die Enzymkonzentration größer als die Nukleotidkonzentration (im Experiment 300 µM

Enzym und 200 µM Nukleotid). Durch die hohe Affinität aller Nukleotide im ternären Komplex wurde so eine nahezu vollständige Bindung gewährleistet. Die Nukleotide konnten in einem einzigen Reaktionszyklus umgesetzt werden. Die Produktfreisetzung spielte dann für die Ratenkonstante des single turnover Experiments keine Rolle mehr und schied als möglicher geschwindigkeitsbestimmender Schritt aus. Die einfach exponentielle Angleichung der durch HPLC ermittelten, zu verschiedenen Zeitpunkten vorhandenen Nukleotidkonzentrationen lieferte Ratenkonstanten, die für die Vor- bzw. Rückwärtsreaktion als $k_{quench,v}$ bzw. $k_{quench,r}$ (Tab. 25) bezeichnet wurden.

Die unter single turnover Bedingungen für die Vor- bzw. Rückwärtsreaktion gemessenen Ratenkonstanten waren innerhalb der Fehlergrenzen nicht identisch und konnten deshalb nicht derselben Reaktion zugeordnet werden. Die beobachtete Ratenkonstante wäre bei der Messung derselben Reaktion unabhängig von der Richtung gewesen, weil es sich bei der beobachteten Reaktion um eine Einstellung ins Gleichgewicht gehandelt hätte. Die beobachtete Rate hätte sich in diesem Fall als die Summe der Ratenkonstanten der Vor- und Rückwärtsreaktion ergeben und hätte deshalb in beiden Richtungen gleich sein müssen. Damit repräsentierten die quench-flow Daten nicht die Geschwindigkeit des Phosphoryltransfers (k_c bzw k_{-c}), sondern sowohl mit dTMP/dTDP als auch mit AZTMP/AZTDP eine Konformationsänderung des Enzyms (k_{iso1}, k_{iso-1} bzw k_{iso2}, k_{iso-2}). Diese Konformationsänderung entsprach dem Übergang von der offenen inaktiven in die geschlossene aktive Form des Enzyms oder umgekehrt, also hauptsächlich der Bewegung der Lid-Region neben einer des P-Loops.

Die Zuordnung der Ratenkonstanten aus den single turnover Experimenten zur Konformationsänderung (repräsentierten diese Daten das Öffnen oder das Schließen des Enzyms?) geschah mit Hilfe von *chase*-Experimenten (Tab 25). Dazu wurden die Nukleotide im Gleichgewicht mit TP_5A-mant vom gesättigten Enzym verdrängt. Sowohl für TMP/TDP als auch für AZTMP/AZTDP wurden biphasige Kurven erhalten. In beiden Fällen wurde mit zwei verschiedenen Fluorophorkonzentrationen verdrängt, um sicherzustellen, daß die Verdrängung vollständig und möglichst irreversibel war.

Zusätzlich war für die Ableitung des kinetischen Mechanismus noch die Kenntnis der chemischen Gleichgewichtskonstanten am Enzym wichtig. Diese waren prinzipiell aus den quenched-flow Experimenten zugänglich, wurden jedoch aufgrund bestehender experimenteller Schwierigkeiten (Material und Methoden, Kapitel 2.2.8.3) in einem unabhängigen Experiment bei 25 °C durch Gleichgewichtsnukleotidanalyse mit HPLC ermittelt. Zur besseren Übersicht wurden alle relevanten Daten noch einmal in Tabelle 25 zusammengefaßt. Die Gleichgewichtskonstante wurde definiert als $K_{eq,Enzym} = \frac{[MgATP][NMP]}{[MgADP][NDP]}$.

Für dTMP bzw. dTDP entsprachen die observierten Ratenkonstanten bei der Verdrängung durch TP_5A-mant sehr gut den durch steady-state Analyse ermittelten k_{cat}-Werten ($k_{chase1} = k_{cat,v}$ und $k_{chase2} = k_{cat,r}$). Die Verdrängung mit mant-AP_5T geschah aus der geschlossenen Konformation. Der Vergleich mit den steady-state-Raten machte es deshalb wahrscheinlich, daß k_{chase1} der Öffnung des Enzyms auf der Diphosphatseite ($k_{chase1} = k_{iso2} = k_{cat,v} = 0.7\ s^{-1}$) und k_{chase2} der Öffnung des Enzyms auf der Monophosphatseite entsprach ($k_{chase2} = k_{iso-1} = k_{cat,r} = 0.11\ s^{-1}$). Damit stellten die Ratenkonstanten aus dem quenched-flow Experiment die Geschwindigkeit für den Übergang in die aktive Konformation dar, und es war $k_{iso1} = k_{quench,v} = 14\ s^{-1}$ und $k_{iso-2} = k_{quench,r} = 3.3\ s^{-1}$. Für die Umsetzung von dTMP bzw. dTDP war damit die Zuordnung der steady-state und der single turnover Ratenkonstanten eindeutig. Der ratenlimitierende Schritt ist sowohl für die Vorwärts- als auch für die Rückwärtsreaktion der Übergang vom geschlossenen aktiven in den offenen inaktiven Komplex (k_{iso2} bzw. k_{iso-1}). Die Plausibilität dieser Zuordnung konnte anhand der Gleichgewichtskonstante für den chemischen Schritt ($K_c = \frac{k_{-c}}{k_c}$) überprüft werden. War das chemische Gleichgewicht am Emzym -$K_{eq,Enzym}$ - bekannt, konnte K_c mit Gl. 82 (Appendix, Kapitel 8.6) berechnet werden. Mit $K_{eq,Enzym} = 0.75$ berechnete sich $K_c = 0.91$. Dieser Wert für die chemische Gleichgewichtskonstante war sinnvoll, denn es gab keinen Grund anzunehmen, weshalb der Phosphatübertrag in eine von beiden Reaktionsrichtungen schneller sein sollte als in die andere.

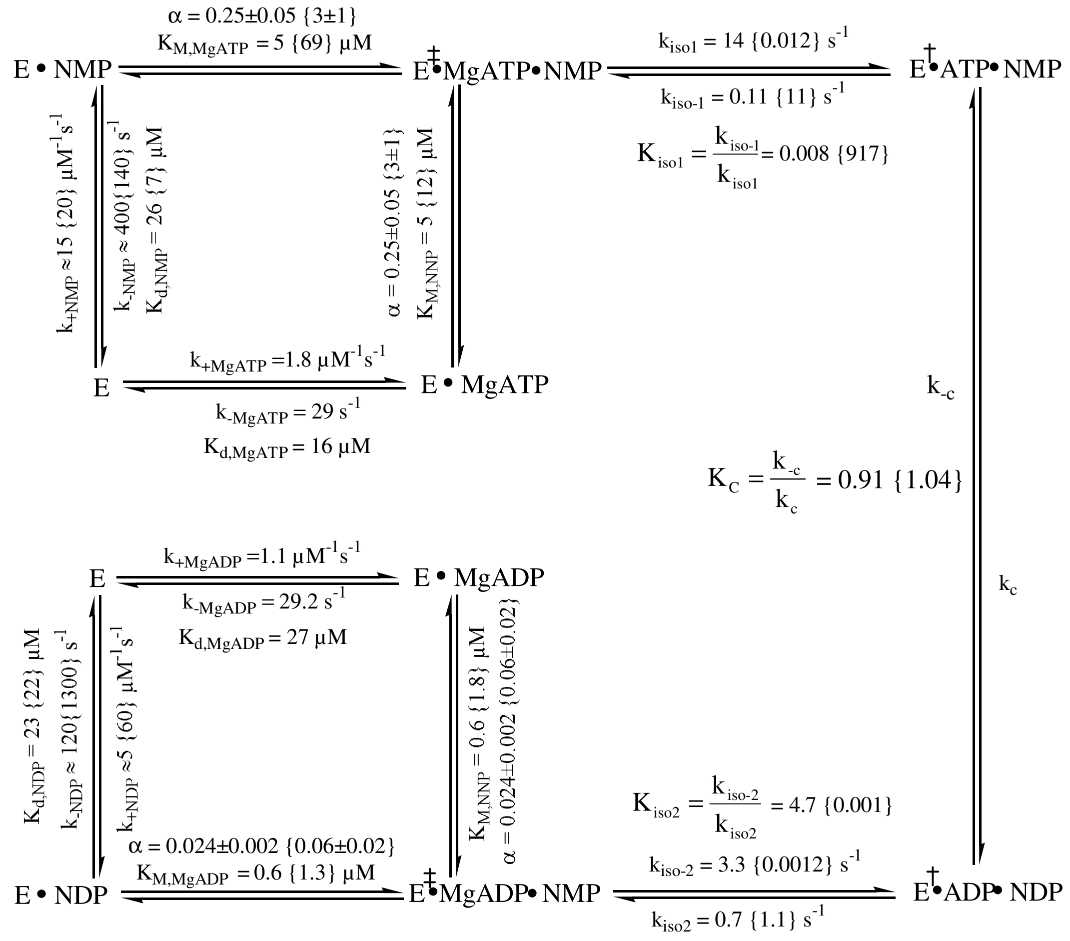


Abb. 48: Darstellung des kinetischen Mechanis humaner wt-TmpK mit dTMP/dTDP und {AZTMP/AZTDP}. Die Zahlen in geschweiften Klammern stehen für den Zyklus mit AZTMP/AZTDP, die ohne geschweifte Klammer für dTMP/dTDP. Der Zahlenwert für den Kooperativitätsfaktor α ist definiert als $\alpha = \frac{K_M}{K_d}$ (‡: offene, inaktive Enzymkonformation; †: geschlossene, aktive Enzymkonformation).

Für AZTMP/AZTDP sahen die Ergebnisse anders aus: Hier entsprachen im Rahmen der Fehler die Ratenkonstanten aus den quenched-flow-Experimenten den k_{cat}-Werten aus der steady-state-Analyse, es war $k_{quench,v} = k_{cat,v} = 0.012\ s^{-1}$ und $k_{quench,r} = k_{cat,r} = 0.0012\ s^{-1}$. Die Verdrängung der Nukleotide im Gleichgewicht aus der geschlossenen Enzymkonformation mit TP_5A-mant ergab wesentlich größere Ratenkonstanten (Tab. 25), die Verdrängung der Nukleotide aus dem Komplex geschah also deutlich schneller als im Fließgleichgewicht. Da im quenched-flow Experiment aus den schon genannten Gründen (Ungleichheit der beobacheten Ratenkonstanten) nicht die Geschwindigkeit der chemischen Reaktion gemessen worden sein konnte, mußten die quenched-flow Daten das Schließen der Lid-Region darstellen. Damit war folgende zwangsläufige Zuordnung gegeben: $k_{iso1} = k_{quench,v} = k_{cat,v} = 0.012\ s^{-1}$ und $k_{iso-2} = k_{quench,r} = k_{cat,r} = 0.0012\ s^{-1}$. Der ratenlimitierende Schritt für die AZTMP-Phosphorylierung ist also das Schließen der Lid-Domäne über den Substraten. Diese enzymdynamischen Ergebnisse wurden durch die Kristallstruktur bestätigt [136]. Diese zeigte für den TmpK-Komplex mit AZTMP und dem nicht hydrolysierbaren ATP-Derivat AppNHp eine eindeutig offene Konformation. Die Zuordnung der stopped-flow Ratenkonstanten zur Vorwärts- bzw. Rückwärtsreaktion war auf den ersten Blick nicht möglich und konnte nur deduktiv erfolgen. Dazu mußte man annehmen, daß die Gleichgewichtskonstante für den chemischen Schritt -K_c - in der Größenordnung 1 war. Dies erschien aus denen bei dTMP/dTDP erwähnten Gründen logisch. Mit der bekannten Gleichgewichtskonstanten am Enzym $K_{eq,Enzym} = 0.95$ errechnete sich eine sinnvolle chemische Gleichgewichtskonstante bezogen auf das minimale Reaktionsschema (Abb. 47) nur bei folgender Zuordnung: $k_{iso-1} = 11\ s^{-1}$ und $k_{iso2} = 1.1\ s^{-1}$. Die berechnete Gleichgewichtskonstante K_c betrug dann $K_C = 1.04$ (Gl. 82, Appendix, Kapitel 8.6). In der Abbildung 48 wurde die Zuordnung der Ratenkonstanten noch einmal graphisch verdeutlicht.

3.8.2 Quenched-flow Kinetik mit hsTmpK-Mutanten

Interessant war ein mechanistischer Vergleich zwischen der menschlichen wt-TmpK und den Kinasen, die durch Mutationen in ihren kinetischen Eigenschaften verändert wurden. Dabei konnten nur die $\text{hsTmpK}_{\text{R200A/F105Y}}$ und die $\text{hsTmpK}_{\text{R200A/R16G/}\textit{E. coli}\text{ small lid}}$ näher untersucht werden. Für diese Mutanten konnten aus Zeitgründen keine Dissoziationskonstanten bzw. Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten bestimmt werden. Die mechanistische Interpretation der kinetischen Daten erfolgte deshalb unter der Annahme, daß auch bei den Mutanten die Bildung der binären und ternären Komplexe sehr schnell war. Die Ableitung eines kinetischen Mechanismus schließlich erfolgte mit denselben Überlegungen, die für humane wt-TmpK beschrieben wurden.

3.8.2.1 hsTmpK$_{\mathrm{R200A/F105Y}}$

Für die Vorwärtsreaktion von hsTmpK$_{\mathrm{R200A/F105Y}}$ mit dTMP ergab sich aus dem single turnover Experiment eine mittlere Ratenkonstante $\overline{k}_{\mathrm{quench,v}} = 130 \pm 17\,\mathrm{s}^{-1}$, die Rückwärtsreaktion mit dTDP lieferte $\overline{k}_{\mathrm{quench,r}} = 96 \pm 3\,\mathrm{s}^{-1}$. Die mit der quenched-flow Technik ermittelten Ratenkonstanten waren damit um eine Größenordnung schneller als die quenched-flow Ratenkonstanten, die für menschliche wt-TmpK erhalten wurden. Die k_{cat}-Werte aus den steady-state Experimenten mit dieser Mutante waren fast drei Größenordnungen kleiner als die aus den single turnover Experimenten, so daß auch bei der Phenylalanin-Mutante mit dTMP/dTDP der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Öffnung der Lid-Region des Enzyms war. Die single turnover Reaktion dieser Mutante mit AZTMP bzw. AZTDP war wesentlich langsamer als mit dem natürlichen Substrat, aber noch immer schneller als die des humanen wt-Enzyms mit dem monophosphorylierten Anti-HIV-Medikament. Die mathematische Analyse der Datenpunkte ergab für die Vorwärtsreaktion $\overline{k}_{\mathrm{quench,v}} = 4.8 \pm 0.1\,\mathrm{s}^{-1}$ und für die Rückwärtsreaktion $\overline{k}_{\mathrm{quench,r}} = 0.07 \pm 0.01\,\mathrm{s}^{-1}$. Im Gegensatz zur wt-TmpK waren die single turnover Ratenkonstanten mit AZTMP/AZTDP größer als die steady-state Konstanten. Damit hatte durch eine einzelne Punktmutation ein Wechsel der Enzymdynamik stattgefunden: War bei der wt-TmpK mit AZTMP/AZTDP noch die Konformationsänderung, die zum aktiven Komplex führte, der ratenlimitierende Schritt, so war es bei der Phenylalanin-Mutante die Konformationsänderung vor der Produktfreisetzung.

3.8.2.2 hsTmpK$_{\mathrm{R200A/R16G}/\mathit{E.\ coli}\ \mathrm{small\ lid}}$

Unter single turnover Bedingungen wurde für die Reaktion dieser Mutante mit dTMP eine Ratenkonstante $\overline{k}_{\mathrm{quench,v}} = 36 \pm 10\,\mathrm{s}^{-1}$ und für die Reaktion mit dTDP $\overline{k}_{\mathrm{quench,r}} = 2.7 \pm 0.6\,\mathrm{s}^{-1}$ gemessen. Diese Geschwindigkeitskonstanten waren deutlich größer als die steady-state Ratenkonstanten für diese Mutante, so daß wiederum von einer Ratenlimitierung durch die vor der Produktfreisetzung erfolgenden Konformationsänderung ausgegangen werden konnte. Der einfach exponentielle Angleich der Datenpunkte des single turnover Experiments mit AZTMP/AZTDP ergab für die Vorwärtsreaktion die Geschwindigkeitskonstante $\overline{k}_{\text{quench,v}} = 0.98 \pm 0.03\ \text{s}^{-1}$ und für die Rückwärtsreaktion $\overline{k}_{\text{quench,r}} = 0.014 \pm 0.004\,\text{s}^{-1}$. Auch bei dieser TmpK-Mutante wurde die Gesamtaktivität mit AZTMP/AZTDP durch den Übergang vom aktiven in den inaktiven Zustand bestimmt.

3.8.2.3 Kinetischer Mechanismus der hsTmpK-Mutanten

Zur besseren Übersicht wurden die für die Ableitung der kinetischen Mechanismen der Mutanten wichtigen Ratenkonstanten noch einmal zusammengefaßt (Tab. 26).

Enzym	***Experiment***	***steady state***		***single turnover***		***Equilibrium***
	Nukleotid	$k_{\text{cat,v}}$	$k_{\text{cat,r}}$	$k_{\text{quench,v}}$	$k_{\text{quench,r}}$	$K_{\text{eq,Enzym}}$
R200A/F105Y	dTMP/dTDP	0.17	0.14	130	96	0.80
	AZTMP/AZTDP	0.25	0.018	4.8	0.07	0.19
R200A/R16G/ *E. coli* small lid	dTMP/dTDP	0.49	0.14	36	3.7	0.89
	AZTMP/AZTDP	0.10	0.0021	0.98	0.014	0.10

Tab. 26: Zusammenfassung der ermittelten Konstanten für die Umsetzung von dTMP/dTDP bzw. AZTMP/AZTDP durch hsTmpK-Mutanten. Die Gleichgewichtskonstante wurde wieder definiert als $K_{\text{eq,Enzym}} = \frac{[\text{MgATP}][\text{NMP}]}{[\text{MgADP}][\text{NDP}]}$.

Die F105Y-Mutation führte gegenüber wt-TmpK zu einer Verlangsamung der Öffnung und zu einer Beschleunigung des Schließens der Lid-Region (Abb. 49). Der ratenlimitierende Schritt war sowohl für dTMP/dTDP als auch AZTMP/AZTDP die Konformationsänderung vor der Produktfreisetzung. Die Gleichgewichtskonstante für den chemischen Schritt berechnete sich zu $K_C = 0.80$ für dTMP/dTDP bzw. $K_C = 0.89$ für AZTMP/AZTDP (Gl. 82, Appendix, Kapitel 8.6), wodurch die Gültigkeit des abgeleiteten Mechanismus bestätigt wurde. Ein ähnliches Ergebnis erhielt man für die „small lid“-Mutante (Abb. 50). Die Geschwindigkeitskonstanten für das Öffnen und Schließen der Lid-Region mit dTMP/dTDP unterschieden sich kaum vom Wildtyp-Enzym. Die Berechnung der chemischen Gleichgewichtskonstante ergab für dTMP/dTDP $K_C = 0.92$. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt mit diesen Nukleotiden war wie bei den beiden anderen untersuchten TmpK der Übergang von der geschlossenen aktiven in die offene inaktive Enzymkonformation ($k_{\text{iso-1}}$ bzw. k_{iso2}).

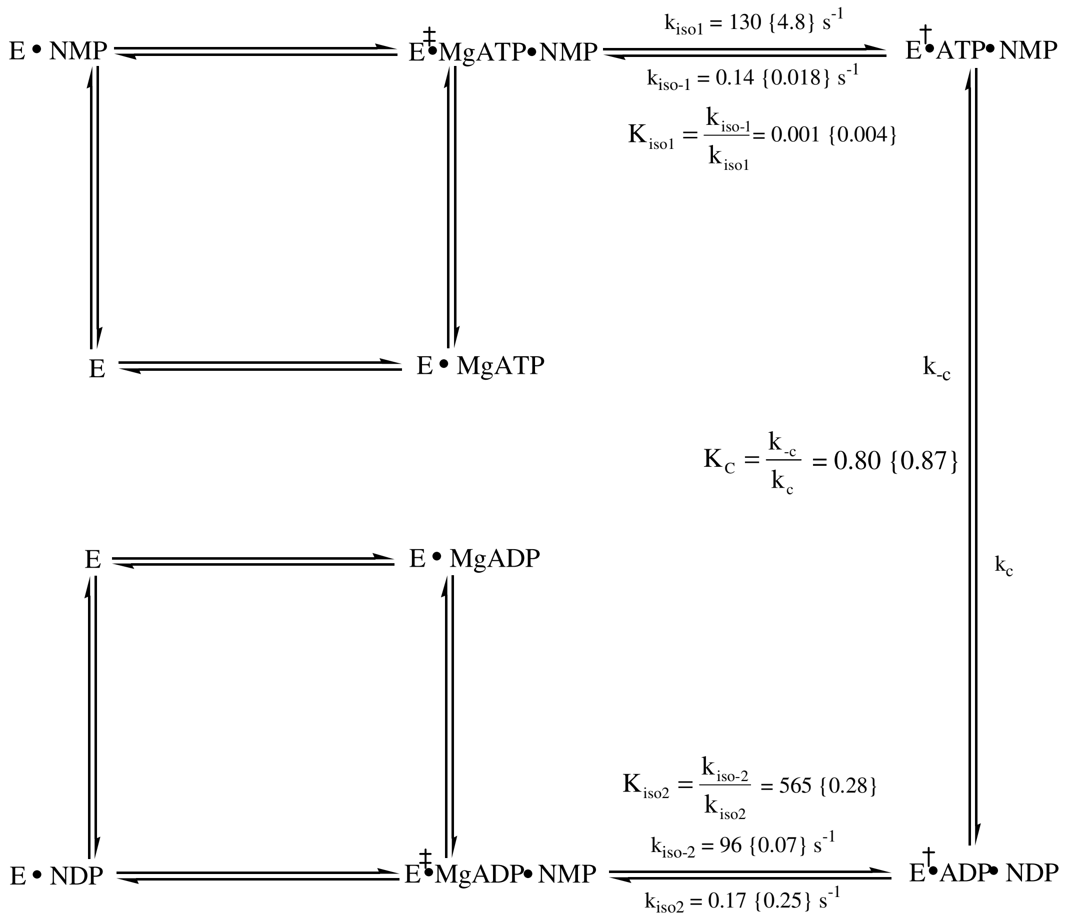


Abb. 49: Darstellung des kinetischen Mechanis der humanen R200A/F105Y-Mutante mit dTMP/dTDP und {AZTMP/AZTDP}. Die Zahlen in geschweiften Klammern stehen für den Zyklus mit AZTMP/AZTDP, die ohne geschweifte Klammer für dTMP/dTDP (‡: offene, inaktive Enzymkonformation; †: geschlossene, aktive Enzymkonformation).

Der Austausch der Lid-Region des menschlichen Enzyms und der Ersatz durch die *E. coli* Lid-Region führte mit AZTMP/AZTDP zu einer Beschleunigung des Übergangs in den aktiven Komplex und zu einer Verlangsamung der Produktfreisetzung. Der Effekt bei der „small lid“-Mutante war aber nicht so dramatisch wie bei der F105Y-Mutante. Die berechnete chemische Gleichgewichtskonstante für AZTMP/AZTDP war $K_C = 0.82$. Die Verschiebung des Gleichgewichts am Enzym mit AZTMP/AZTDP gegenüber dem Wildtyp paßte in das mechanistische Bild der Mutantenproteine. Die extreme Beschleunigung des Schließbewegung der Lid-Region mit AZTMP (400-fach bei der F105Y-Mutante bzw. 100-fach bei der „small lid“-Mutante) in Verbindung mit einer dramatischen Verlangsamung der entsprechenden Rückreaktion (600-fach bei der F105Y-Mutante bzw. 5000-fach bei der“small lid“-Mutante) fing den aktiven Komplex beider Mutanten mit AZTMP quasi ein. Die Gleichgewichtskonstante für das Schließen der Lid-Region beider Mutanten mit AZTMP war deshalb auch im Vergleich mit dem Wildtyp um mehr als fünf Größenordnungen hin zu den Produkten verschoben.

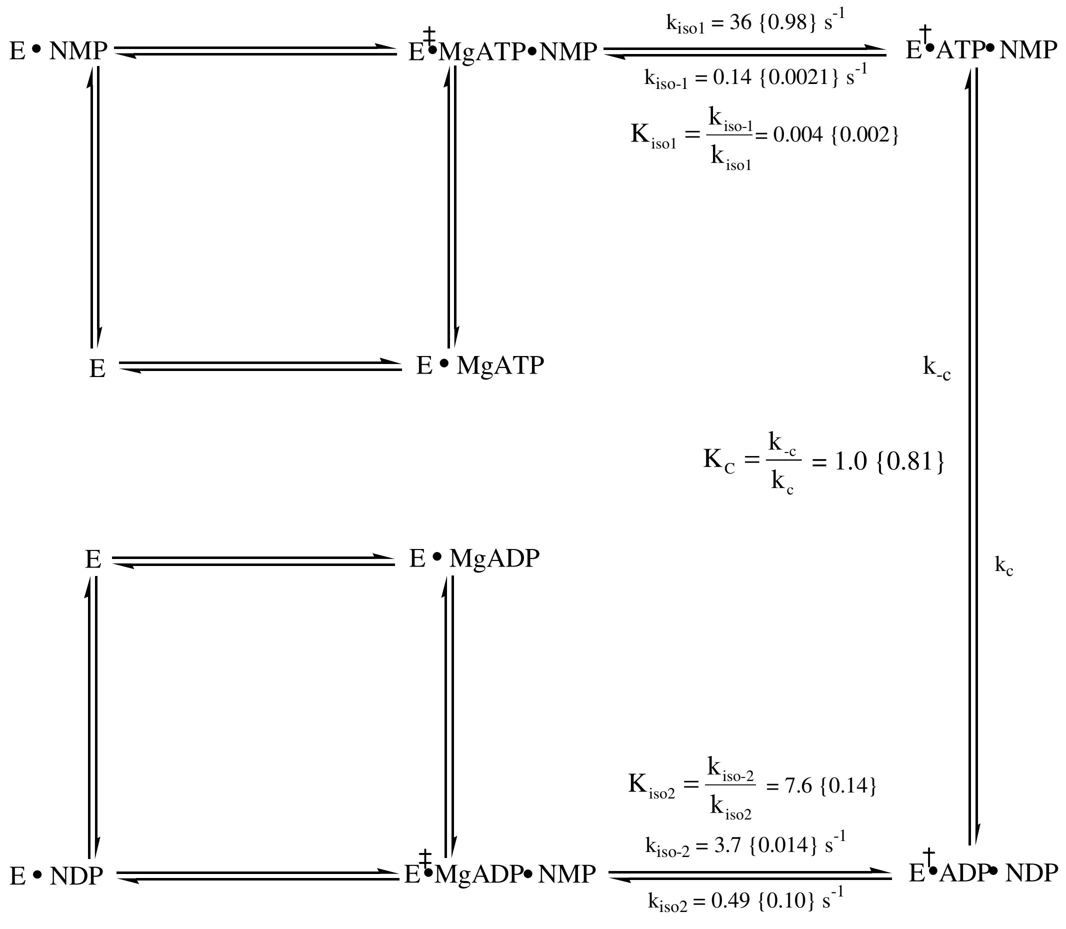


Abb. 50: Darstellung des kinetischen Mechanis der humanen R200A/R16G/*E. coli* small lid-Mutante mit dTMP/dTDP und {AZTMP/AZTDP}. Die Zahlen in geschweiften Klammern stehen für den Zyklus mit AZTMP/AZTDP, die ohne geschweifte Klammer für dTMP/dTDP (‡: offene, inaktive Enzymkonformation; †: geschlossene, aktive Enzymkonformation).

3.9 Thermische Stabilität von Thymidylatkinasen

Die thermische Stabilität der Thymidylatkinasen aus *E. coli*, *S. cerevisiae*, Maus und Mensch wurde mit Hilfe der *differential scanning calorimetry* (DSC) [137, 138] untersucht. Diese Technik wurde unter anderem zur Untersuchung von DNA-Wechselwirkungen [139], zur Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen [141] und in Proteinfaltungsstudien [142, 143] eingesetzt. Die Wärmeaufnahme einer Enzymlösung wird gegen eine Referenz gemessen, so daß neben dem Schmelzpunkt des Proteins grundsätzlich auch thermodynamische Daten

(Schmelzenthalpie und Wärmekapaziät des Proteins) zugänglich sind. Die Zuverlässigkeit dieser Daten beruht jedoch auf der Reversibilität des Schmelzvorgangs, weil diese für die Ableitung der zur Auswertung der Schmelzkurven erforderlichen Gleichungen (siehe Appendix, Kapitel 8.5.2) vorausgesetzt wird. Die Schmelzprozesse aller untersuchten Thymidylatkinasen waren jedoch irreversibel, so daß die erhaltenen Schmelzenthalpien bestenfalls einen Anhaltspunkt geben konnten.

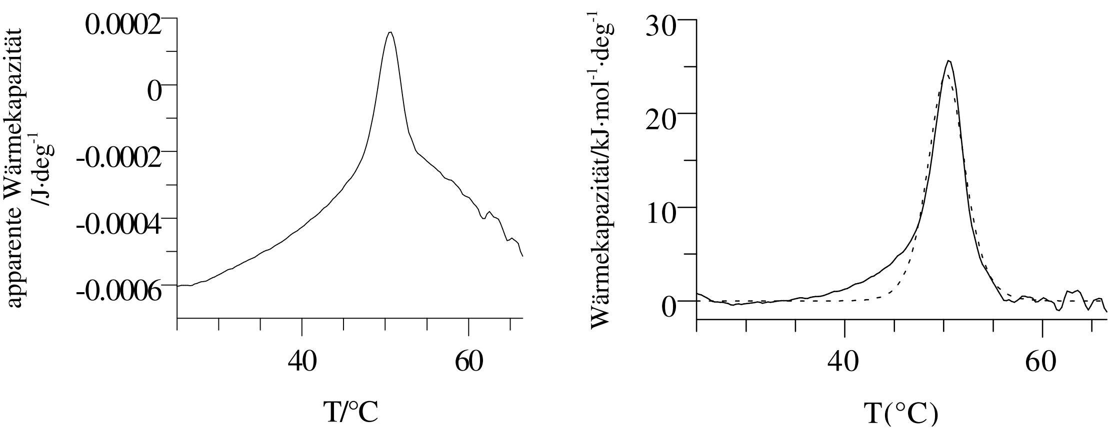


Abb. 51: DSC-Schmelzkurve von hsTmpK_{wt} in HEPES/NaOH-Puffer pH 7.5: Die Wärmeaufnahme des Proteins pro Grad Temperaturänderung wurde um den Beitrag des Puffers und die Basislinie korrigiert. Nach der Normalisierung auf die Enzymkonzentration (c_{TmpK} = 0.85 mg/ml = 36.6 µM) konnten die erhaltenen Schmelzkurven für verschiedene TmpK mit einem „Mehrübergangsmodell“ (siehe Appendix, Kapitel 8.5.2) ausgewertet werden ((—) Meßkurve; (····) mit dem „Mehrübergangsmodell“ angepaßte Schmelzkurve).

In der Abbildung 51 wurde die Originalschmelzkurve (links) und die auf die Enzymkonzentration normalisierte Schmelzkurve (rechts) von humaner wt-TmpK dargestellt. Der Unterschied in der Basislinie aller Schmelzkurven vor und nach der Denaturierung war ein Hinweis auf eine unterschiedliche Wärmekapazität der nativen und der denaturierten Proteine. Trotz dieser Unterschiede konnten die Messungen nicht mit einem Modell, das auch die Bestimmung der Wärmekapazität erlaubte, ausgewertet werden. Alle Messungen mußten mit einem „Mehrübergangsmodell“ (*non-two-state transition* Modell) ausgewertet werden. Grundsätzlich bedeutet dies, daß alle Proteine nicht abrupt kollabierten und ihre strukturellen und funktionellen Charakteristiken nicht gleichzeitig verloren gingen [138], der Schmelzvorgang also wenig kooperativ war. Dies war mit der dimeren Struktur und mehreren Bindungsstellen für Substrate in Einklang. Die erhaltenen Schmelzkurven unterstützen diese Einschätzung. Bei einem unendlich kooperativen Schmelzvorgang würde man unendlich hohe und schmale Schmelzpeaks erwarten, weil die Struktur des Enzyms bei einer scharf definierten Schmelztemperatur verloren gehen würden. Bei allen Proteinen war jedoch die van't Hoff'sche Enthalpie (effektive Enthalpie) wesentlich größer als die kalorimetrische (Tab. 27). Das Verhältnis $\Delta H_m^v / \Delta H_m^c$ beider Enthalpien gibt prinzipiell Auskunft über die Anzahl der Eduktmoleküle, die während eines thermisch induzierten strukturellen Übergangs miteinander kooperieren. Die großen Verhältnisse für TmpK deuteten, im Gegensatz zum verwendeten Modell und den Schmelzkurven, auf hoch kooperative Schmelzübergänge hin [143].

TmpK	human, wt	R200A/F105Y	Small Lid	E. coli, wt	S. cervisiae, wt	Maus, wt[a)]
T_m/°C	50	37	50	59	56	50
ΔH_m^v /kJ·mol^{-1}	752	515	859	670	758	637
ΔH_m^c /kJ·mol^{-1}	115	59	73	221	211	109
$\Delta H_m^v / \Delta H_m^c$	6.3	9.1	11.1	3.0	3.6	5.9

Tab. 27: Zusammenstellung der Schmelzpunkte und der van't Hoff'schen bzw. kalorimetrischen Enthalpien verschiedener Thymidylatkinasen ([a)]: enthielt ca. 20 Mol-% dTMP; alle anderen Kinasen waren nukleotidfrei).

Eine sinnvolle Erklärung für diesen Gegensatz ergibt sich aus der Irreversibilität der Schmelzvorgänge. Die thermische Entfaltung aller untersuchten TmpK führte zur Aggregation und Präzipitation der denaturierten Proteine. Die Aggregation ist aber ein kinetisch kontrollierter exothermer Prozess [143]. Die bei der TmpK-Aggregation freigesetzte Wärme unterstützte quasi intrinsisch im Sinne des Experiments den Schmelzprozeß des Enzyms, und die vom Kalorimeter aufgezeichnete zugeführte Wärmemenge, die durch die kalorimetrische Enthalpie ΔH_m^c beschrieben wird, war dadurch zu klein. Die van't Hoff'sche Enthalpie jedoch war als rein thermodynamische Größe, die sich aus der Temperaturabhänigigkeit der Gleichgewichtskonstanten ergibt, unabhängig von energetischen Beiträgen der Aggregation. Das Verhältnis $\Delta H_m^v / \Delta H_m^c$ war somit zu groß und konnte deshalb nicht als Hinweis auf hochkooperative Schmelzvorgänge interpretiert werden.

Bei den menschlichen Mutanten-Proteinen fielen -den gleichen energetischen Beitrag der Aggregation zur gemessenen Wärmeaufnahme bei verschiedenen TmpK vorausgesetzt- die reduzierten kalorimetrischen Enthalpien gegenüber dem Wildtyp auf. Die Phenylalanin- und die small lid-Mutante sind offensichtlich durch eine geringere Anzahl von intramolekularen Wechselwirkungen flexibler, worin ein möglicher Grund für die verbesserte katalytische Aktivität dieser Mutanten liegt. Die Schmelzpunkte der Enzyme lagen in der Regel im Bereich zwischen 50 °C und 60 °C. Nur die Phenylalanin-Mutante zeigte einen deutlich verringerten Schmelzpunkt von 37 °C. Trotzdem sollte diese Mutante für gentherapeutische Anwendungen geeignet sein, denn der Schmelzpunkt wird in einer Zelle durch die Anwesenheit von Nukleotiden sicherlich wesentlich höher sein.

4 Diskussion

4.1 Expression und Reinigung von TmpK

Die Expression von Thymidylatkinase als GST-Fusionsprotein in *E. coli* Zellen ergab eine sehr hohe Proteinausbeute (bis 800 mg pro 80 g Zellnaßgewicht). TmpK war offensichtlich für den Wirtsorganismus nicht toxisch. Die Standardreinigung für ein GST-Fusionsprotein (Ammoniumsulfatfällung, Glutathion-Sepharose 4B Affinitätssäule, Abspaltung des GST-Fusionsproteins und anschließende Größenausschlußchromatographie) führte zu einer sehr sauberen TmpK (> 99%), die in Abhängigkeit von der Herkunft und von der Mutation einen unterschiedlichen Restnukleotidgehalt (dTMP und ADP) hatte (humane wt-TmpK: ~ 15 %; R200A/F105Y-Mutante: ~60 %; R200A/R16G/*E. coli* small lid: ~ 40 %; murine wt-TmpK: ~ 30 %). Dieser Befund ist äußerst erstaunlich, denn Thymidylatkinasen aus *E. coli* und *S. cerevisiae* , deren Nukleotidaffinitäten mit denen der untersuchten TmpK vergleichbar sind (≈ 10 μM), sind nach chromatographischer Aufarbeitung ebenso nukleotidfrei wie AmpK aus *E. coli* und UmpK aus *D. discoideum* [144]. Dieser Befund zeigt aber auch, wie stark offensichtlich die Nukleotide das Enzym und speziell die *active site* beeinflussen. Möglicherweise ist die Expression der untersuchten TmpK als GST-Fusionsprotein indirekt für dieses Phänomen verantwortlich. Die Reinigungsprotokolle für nichtfusionierte NMP-Kinasen enthalten im Gegensatz zu dem für GST-TmpK ausgearbeiteten Protokoll jeweils einen chromatographischen Reinigungsschritt mit einem Anionentauscher. Ein unterschiedliches Elutionsverhalten von Nukleotiden und Enzym könnte die Nukleotidfreiheit dieser NMP-Kinasen zur Folge haben, während die Nukleotidbefreiung von humaner TmpK mit dem nukleotidabbauenden Enzym *Alkalische Phosphatase* erfolgen mußte.

Die Nukleotidfreiheit von Enzymen ist grundsätzlich für viele kinetische und strukturelle Untersuchungen von außerordentlicher Bedeutung, um eindeutig definierte Ratenkonstanten und strukurelle Zustände zu erhalten. So reduzierte sich beispielsweise die Assoziationsratenkonstante von TP_5A-mant für die Bindung an nukleotidhaltige humane wt-TmpK im Gegensatz zur Bindung an nukleotidfreie um einen Faktor 2 ($k_{\text{ass, nukleotidhaltig}} = 22\ \mu M^{-1} \cdot s^{-1}$ vs. $k_{\text{ass, nukleotidfrei}} = 51\ \mu M^{-1} \cdot s^{-1}$). Der Restnukleotidgehalt beeinflußte die Dissoziationsratenkonstante sogar um einen Faktor 20 ($k_{diss,\ nukleotidhaltig} = 1.5\ s^{-1}$ vs. $k_{diss,\ nukleotidfrei} = 26\ s^{-1}$), so daß sich zwischen den durch die Ratenkonstanten der Bindung berechneten Dissoziationskonstanten für TP_5A-mant ein 10-facher Unterschied ergab ($K_{d,\ nukleotidhaltig} = 68$ nM vs. $K_{d,\ nukleotidfrei} = 500$ nM). Die Dissoziationskonstante von 500 nM konnte in einem unabhängigen Gleichgewichtsexperiment mit nukleotidfreier TmpK ($K_d = 336$ nM) bestätigt werden. Die unter single turnover Bedingungen gemessenen Ratenkonstanten unterschieden sich ebenfalls erheblich für nukleotidhaltige und nukleotidfreie TmpK. Für nukleotidhaltige humane wt-TmpK war $k_{quench,vorwärts} = 4\ s^{-1}$ und $k_{quench,rückwärts} = 0.8\ s^{-1}$, während sich für nukleotidfreie TmpK die Ratenkonstanten $k_{quench,vorwärts} = 14\ s^{-1}$ und $k_{quench,rückwärts} = 3.3\ s^{-1}$ ergaben. Aufgrund des Restnukleotidgehalts konnten offensichtlich nur Mischratenkonstanten gemessen werden. Der Restnukleotidgehalt erschwerte auch die Interpretation der Elektronendichte bei Röntgenbeugungsexperimenten zur Bestimmung der Kristallstruktur. Für die Kristallisationsmutante $hsTmpK_{R200A}$ wurde in einem Komplex mit dTMP und dem nichthydrolysierbaren ATP-Analog AppNHp neben diesen beiden erwarteten Nukleotiden auch ADP gefunden. Dieses ADP stammte wahrscheinlich aus der Enzympräparation, die noch ohne den Einsatz von alkalischer Phosphatase durchgeführt wurde [110].

4.2 $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP

Fluoreszierende Verbindungen sind als Reporter für Gleichgewichtsstudien und kinetische Untersuchungen von nukleotidbindenden Proteinen von außerordentlicher Bedeutung. Dazu wurden Nukleotide und Nukleoside sowohl an der Base, wie bei Ethenoadenosin [145 - 147], 2-Aminopurinribosiden [148] oder C8-MABA-ADP [68], als auch an der Ribose, wie bei Trinitrophenyl- [149] und Mant-Nukleotiden [84], modifiziert. Auch phosphatmodifizierte Nukleotide sind bekannt, hauptsächlich als *caged*-Verbindungen [150 - 153], aber auch als Substratanaloge [82, 154] und fluoreszierende Sonden [155]. Die Entwicklung und Synthese eines phosphatmodifizierten fluoreszierenden CDP-Analogs für UmpK in unserer Arbeitsgruppe erlaubte die vorher nicht mögliche direkte Bestimmung von Bindungskonstanten der NMP/NDP-Bindestelle [76]. Der gewählte konvergente Syntheseweg, bei dem zunächst aus 1-Methyl-1,3-benzoxazin-2,4-dion und einem

Diaminoalkan ein fluoreszierendes Benzoylamid erzeugt wurde [75], eröffnet hinsichtlich des Fluorophors und des Linkers eine große Bandbreite von Variationsmöglichkeiten. Die einzige Anforderung an den Fluorophor besteht in der Zugänglichkeit für einen nukleophilen Angriff durch eine Aminogruppe des Linkers. Durch die Wahl verschiedener Linker sowie verschiedener Phosphate (Mono-, Di-, oder Triphosphat) können weitere strukturelle Erfordernisse anderer Proteine, bei denen die *active site* wie bei NMP-Kinasen „kanalartig" ist, berücksichtigt werden. Möglicherweise können phosphatmodifizierte fluoreszierende Sonden zur quantitativen Bestimmung von Affinitäten von *caged*-Verbindungen genutzt werden, weil die Modifizierung der Phosphatgruppe die Hydrolyse des Fluorophors verhindert.

Die vorgestellte Synthesestrategie [75, 76] wurde für die Präparation eines bei Raumtemperatur und neutralem pH-Wert stabilen fluoreszierenden dTDP-Analogs ($P_{(\beta)}$-MAHA-TDP) für TmpK erfolgreich übernommen und konnte auch hier für die erstmalige Bestimmung von Dissoziationskonstanten für die NMP/NDP-Bindestelle von TmpK angewendet werden. Ferner war mit $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP eine Abschätzung der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten für nichtfluoreszierende Nukleotide (dTMP, dTDP, AZTMP, AZTDP) möglich. Die Bestimmung von Dissoziationskonstanten gestaltete sich für humane wt-TmpK schwierig. Zum einen mußte bei den Nukleosiddiphosphaten dTDP und AZTDP darauf geachtet werden, daß alle Gleichgewichtsmessungen in Abwesenheit von Mg^{2+} durchgeführt wurden. Nukleosiddiphosphate binden in der magnesiumfreien Form an die NMP/NDP-Bindestelle von TmpK, in Gegenwart von Mg^{2+} findet zusätzlich die Kinasereaktion mit den Nukleosiddiphosphaten statt. Verdrängungsexperimente mit Monophosphaten wurden dagegen in Standardfluoreszenzpuffer mit Mg^{2+} durchgeführt. Deswegen mußten zwei Affinitäten für $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP mit und ohne Mg^{2+} bestimmt werden. Die größere Affinität von $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP zu TmpK in Abwesenheit von Mg^{2+} ($K_{d,\mathrm{hsTmpK}_{\mathrm{wt}}-\mathrm{Mg}^{2+}}^{P_{(\beta)}-\mathrm{MAHA}-\mathrm{TDP}} = 26\ \mu\mathrm{M}$ vs. $K_{d,\mathrm{hsTmpK}_{\mathrm{wt}}+\mathrm{Mg}^{2+}}^{P_{(\beta)}-\mathrm{MAHA}-\mathrm{TDP}} = 44\ \mu\mathrm{M}$) ist mit der Substratspezifität von TmpK erklärbar. Außerdem bereitete die vermutete Wechselwirkung des Diaminohexyllinkers von $P_{(\beta)}$-MAHA-TDP mit dem hydrophoben Interface eines TmpK-Dimers und vor allem die assoziative Verdrängung des Fluorophors erhebliche Probleme bei der Datenanalyse. Die Bildung eines ternären Komplexes aus TmpK, Fluorophor und Nukleotid, die nur aufgrund der dimeren Struktur des Enzyms möglich ist, erforderte die Anpassung der kubischen Gleichung [60] für einen kompetitven Verdrängungsmechanismus durch Einführung eines Korrekturfaktors. Die prinzipielle Anwendbarkeit des kompetitiven Modells mit dieser eingeführten Korrektur wurde jedoch durch die unabhängige Messung der Dissoziationskonstanten mittels isothermer Titrationskalorimetrie bestätigt.

Die präzise Konzentrationsbestimmung, die eine Voraussetzung für den Einsatz eines Fluorophors in quantitativen Messungen ist, gelang über den Extinktionskoeffizienten bei λ = 325 nm ($\varepsilon_{325\mathrm{nm}}^{\mathrm{pH}7.5} = 2.7 \cdot 10^{-3}\,\mu\mathrm{M}^{-1} \cdot \mathrm{cm}^{-1}$). Dieser Extinktionskoeffizient ist mit dem für C8-MABA-Nukleotide bei 325 nm vergleichbar [68]. Das Absorptionsmaxiumum für C8-MABA-Nukleotide liegt bei 335 nm, während dieselbe fluoreszierende mant-Gruppe an der Ribose ein Absorptionsmaximum um 350 nm zeigt [84]. Die Position der mant-Gruppe beeinflußt damit sehr stark das Absorptionsverhalten von fluoreszierenden Nukleotiden. Zudem ist der molare Extinktionskoeffizient im Absorptionsmaximum von Alkyl-Mant-Nukleotiden interessanterweise nur halb so groß wie der von Ribose-Mant-Nukleotiden ($2.7 \cdot 10^{-3}\,\mu\mathrm{M}^{-1}\,\mathrm{cm}^{-1}$ für $\mathrm{P}_{(\beta)}$-MABA-CDP [76] und C8-MABA-AMP [68] versus $5.7 \cdot 10^{-3}\,\mu\mathrm{M}^{-1} \cdot \mathrm{cm}^{-1}$ für mant-GTP und $5.8 \cdot 10^{-3}\,\mu\mathrm{M}^{-1} \cdot \mathrm{cm}^{-1}$ für mant-ATP [84]).

4.3 Nukleotidbindung von humaner wt-TmpK

4.3.1 Kooperative Nukleotidbindung von dTMP und AZTMP

Nach der Synthese des neuen spezifischen Fluorophors $\mathrm{P}_{(\beta)}$-MAHA-TDP konnten binäre TmpK-Nukleotid-Komplexe detailliert untersucht werden und mit den aus steady-state Messungen zugänglichen Bindungsaffinitäten im ternären Komplex verglichen werden. Die Dissoziationskonstanten für MgATP und MgADP sind in der Größenordnung vergleichbar mit anderen NMP-Kinasen, während die Bandbreite der Dissoziationskonstanten für NMP und NDP grundsätzlich größer ist. Die K_M-Werte von NMP-Kinasen im ternären Komplex mit den nativen Substraten variieren ebenfalls sehr stark. Eine Übersicht über ausgewählte literaturbekannte Daten verschiedener NMP-Kinasen gibt die Tabelle 28:

NMPK	TmpK *human*		AmpK *E. coli*		GmpK *S. cerevisiae*		UmpK *D. discoideum*		UmpK *E. coli*	
Zitat	diese Arbeit		[156]		[102]		[76]		[123]	
Konstante	K_d	K_M	K_d	K_M	K_d	K_M	K_d	K_M	K_d	K_M
Nukleotid	µM									
MgATP	16	5	85	71	90	204	23	--	--	120
MgADP	27	0.6	--	--	84	97	53	--	--	--
dTMP	26	5	--	--	--	--	--	--	--	--
dTDP	23	0.6	--	--	--	--	--	--	--	--
AMP	--	--	--	26	--	--	--	--	--	--
ADP	--	--	4	4	--	--	--	--	--	--
GMP	--	--	--	--	29	91	--	--	--	--
GDP	--	--	--	--	120	97	--	--	--	--
UMP	--	--	--	--	--	--	3000	--	--	50
UDP	--	--	--	--	--	--	640	--	--	--
CMP	--	--	--	--	--	--	140	--	--	--
CDP	--	--	--	--	--	--	68	--	--	--

Tab. 28: Übersicht über Dissoziations- und Michaelis-Konstanten verschiedener NMP-Kinasen mit den Substraten. Die angegebenen K_M-Werte beziehen sich auf den ternären Komplex mit den natürlichen Substraten.

Wurden für die Analyse der Nukleotidbindung noch die in dieser Arbeit erhaltenen Daten für AZTMP/AZTDP im Komplex mit humaner wt-TmpK herangezogen (Ergebnisse, Kapitel 3.6.2.7, Tab. 21), fiel sowohl mit dTMP als auch mit AZTMP eine deutliche Kooperativität auf. Für dTMP konnte eine synergistische und für AZTMP eine antagonistische Bindung ($\alpha_{dTMP} = 0.25$ und $\alpha_{AZTMP} = 3$) festgestellt werden. Möglicherweise gibt es einen „intrinsischen“ Mechanismus, der die Bindung der Substrate über die Lid-Region und den P-Loop miteinander koppelt. Eine Veränderung der Position des P-Loops (P-Loop-Shift), wie sie bei der Bindung von AZTMP an $\text{TmpK}_{\textit{S. cerevisiae}}$ beobachtet wurde [46], könnte so die negative Kooperativität für dieses Anti-HIV-Medikament erklären. Die Enzymstruktur ist gestört, und die „Kommunikation“ zwischen beiden Monomeren funktioniert nicht mehr. Denkbar ist auch eine durch die dimere Struktur von TmpK vermittelte allosterische Kontrolle, die für hexamere UmpK aus *E. coli* beschrieben wurde [123]. Die Bindung des natürlichen Substrats dTMP in Verbindung mit strukturellen Wechselwirkungen zwischen beiden Monomeren verbessert die Bindung des Phosphoryldonors aufgrund der optimalen

Geometrie des Enzyms, während infolge des durch AZTMP induzierten P-Loop-Shifts und der damit verbundenen gestörten Geometrie die allosterische Wechselwirkung zwischen beiden Monomeren unterbunden wird.

Bei der Rückreaktion war die Kooperativiät bei beiden Substraten ($\alpha_{dTDP} = 0.024$ und $\alpha_{AZTDP} = 0.06$) synergistisch. Der Synergismus für dTDP kann als Analogie zur Vorwärtsreaktion gesehen werden, während der synergistische Effekt bei der Bindung von AZTDP unerwartet war. Für eine genauere Erklärungen der kooperativen Substratbindungen von TmpK ist jedoch ein wesentlich detaillierteres Verständnis der Regulation dieser Kinase notwendig, denn der Oligomerisierungsgrad alleine bietet keine ausreichende Grundlage für eine mechanistische Interpretation der Kooperativität. Guanylatkinase aus *S. cerevisiae* [102] und Hühnchen-Adenylatkinase [117] sind Monomere und trotzdem ist die Substratbindung kooperativ, während andere monomere NMP-Kinasen ($\text{AmpK}_{\text{E. coli}}$ [156] oder $\text{UmpK}_{\text{D. discoideum}}$ [144]) keine kooperativen Substratbindungseigenschaften zeigen. Auf der anderen Seite sind oligomere Enzyme häufig kooperativ in ihrer Substratbindung, beispielsweise $\text{TmpK}_{\text{S. cerevisiae}}$ [46], $\text{GmpK}_{\text{E. coli}}$ [157] oder $\text{UmpK}_{\text{E. coli}}$ [123].

4.3.2 Akzeptanz anderer Nukleotide

Die Akzeptanz von FLTMP und d4TMP durch humane wt-TmpK ist, wie nicht anders erwartet, schlecht. Die maximale Umsatzzahl lag in der Größenordnung von AZTMP ($k_{cat} \approx 10^{-2}\ s^{-1}$), während die Michaelis-Konstanten für MgATP im ternären Komplex mit FLTMP und d4TMP größer waren als für MgATP im ternären Komplex mit dTMP. Grundsätzlich könnte hierfür, wie bei AZTMP, ein P-Loop-Shift verantwortlich sein [46], der in der Struktur des Thymidinderivats begründet liegt: FLTMP hat in der 3'-Position das stark elektronegative Fluoratom und bei d4TMP ist die Ribose durch die Einführung der Doppelbindung zwischen der 2' und der 3'-Position partiell planarisiert. Diese Anti-HIV-Medikamente verursachen wahrscheinlich ähnlich wie AZTMP eine Verzerrung der Enzymstruktur, die durch den P-Loop-Shift auf Kosten einer verminderten Aktivität ausgeglichen werden kann. Allerdings kann allein auf der Grundlage der steady-state Messungen nicht beurteilt werden, welcher enzymatische Teilschritt bei dem jeweiligen Thymidinderivat kinetisch beeinflußt wird.

Die Ergebnisse mit den offenkettigen Thymdinderivaten TGCVMP und AZTPCVMP (Ergebnisse, Kapitel 3.6.2, Abb. 36) waren nach den steady-state Messungen ohne Kenntnis des kinetischen Mechanismus ein Hinweis darauf, daß die Reduzierung der Aktivität mit AZTMP ihre Ursache nicht in einer Verlangsamung des chemischen Schritts hat. TGCVMP hat alle strukturellen Merkmale einer 2'-Deoxyribose (Ringsauerstoff und 3'-OH-Gruppe) und kann so die notwendigen Wechselwirkungen mit dem Enzym eingehen. Aufgrund der Flexibilität des Phosphatrests hätte man deshalb eine Aktivität in der Größenordnung von dTMP erwarten können, weil der frei bewegliche Phosphatrest durch das an der Reaktion beteiligte Magnesium und die damit vermittelten Enzym-Nukleotid-Wechselwirkungen optimal auf die Enzymstruktur hätte eingestellt werden können. Dennoch lag die Katalyserate nur im Bereich von AZTMP. Das offenkettige AZT-Derivat, AZTPCVMP, wurde anscheinend überhaupt nicht umgesetzt. Zwar fehlt bei diesem Derivat der Ether-Sauerstoff der Ribose, doch hätte die gewonnene Flexibilität der Kohlenwasserstoffkette sicherlich auch mit einem Ether-Sauerstoff nicht ausgereicht, um die Umsatzgeschwindigkeit wesentlich zu vergrößern.

Die steady-state-Messungen mit den AZTMP-Derivaten mit geblockter Konformation ließen keine eindeutige Bevorzugung einer bestimmten Ribosekonformation (2'-endo bzw. 3'-endo) erkennen. Im Falle einer Bevorzugung einer bestimmten Ribosestruktur wäre das Substrat mit der richtigen Konformation schneller umgesetzt worden als AZTMP, weil das Enzym die Ribose nicht mehr in eine für die Reaktion adäquate Konformation pressen muß. Eine solche Bevorzugung konnte jedoch nicht festgestellt werden, so daß der Grund für die verminderte AZTMP-Aktivierung nicht in einer falschen Ribosestruktur zu suchen ist. Möglicherweise ist aber der P-Loop-Shift durch die zusätzliche Methylengruppe an der Ribose so stark, daß eine höhere Spezifität für eine von beiden Konformationen gar nicht aufgefallen wäre. Die Verzerrung der Enzymstruktur und die dadurch verursachte Reduzierung der Geschwindigkeit eines enzymatischen Schritts würde in diesem Fall einer möglichen höheren Aktivität der humanen wt-TmpK mit dem einen oder anderen Substrat entgegenlaufen. Die Konformationen des 2'-endo und des 3'-endo Substrats stellen möglicherweise zu extreme Grenzstrukturen dar und die tatsächlich erforderliche Konformation der AZTMP-Ribose liegt zwischen beiden Grenzkonformationen.

4.4 Kinetischer Mechanismus humaner wt-TmpK

Mit der menschlichen Thymidylatkinase wurde zum ersten Mal eine NMP-Kinase nahezu vollständig bis auf die Geschwindigkeit des chemischen Schritts (Phosphoryltransfer) kinetisch charakterisiert und die durch die Nukleotidbindung induzierten strukturellen Änderungen aufgelöst. Die Kinetik von NMP-Kinasen wurde bisher fast ausschließlich auf der Grundlage von steady-state Experimenten untersucht, es sind keine kinetischen Daten für die bei NMP-Kinasen stattfindenden Konformationsänderungen bekannt. Für die bestcharakterisierte NMP-Kinase, die Adenylatkinase, sind beispielsweise nur Anhaltspunkte über Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten, die durch Isotopenaustauschexperimente [13, 158] oder ^{31}P-NMR-Studien [159] erhalten wurden, zugänglich, während bei UmpK$_{\textit{D. discoideum}}$ die Ratenkonstanten für die Nukleotidbindung ($k_{diss} > 20000\ s^{-1}$ für ATP [134]) zu groß sind, um mit kinetischen Methoden erfaßt werden zu können. Mit den erhaltenen kinetischen Daten konnte für menschliche wt-TmpK sowohl mit dTMP als auch mit AZTMP ein Mechanismus auf der Grundlage eines minimalen Reaktionsschemas mit offenen inaktiven und geschlossenen aktiven Enzymkonformationen (Ergebnisse, Kapitel 3.8.1.5, Abb. 48) abgeleitet werden. Die Benennung der Ratenkonstanten in den folgenden Kapiteln orientiert sich an der Abbildung 48.

4.4.1 Mechanismus mit dTMP/dTDP

Die Bildung der binären Nukleotid-Enzym-Komplexe erfolgt verhältnismäßig schnell. Die Bindung des zweiten Nukleotids (Entstehung des ternären Komplexes) ist sowohl für die Vor- als auch für die Rückwärtsreaktion synergistisch. Die Bestimmung der Ratenkonstanten für diesen enzymatischen Teilschritt war unmöglich, weil es kein kinetisch auswertbares Signal für die Bildung des ternären Komplexes gab. Deshalb kann der Synergismus entweder durch eine Erhöhung des Assoziationsrate in den ternären Komplex oder eine Verminderung der Dissoziationsrate aus dem ternären Komplex verursacht werden. Allerdings scheinen die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten im Vergleich mit anderen NMP-Kinasen wie UmpK$_{\textit{D. discoideum}}$ [134] eher niedrig zu sein.

Die Bindung von MgATP und dTMP führt zu einer Konformationsänderung, die das Enzym durch eine hauptsächliche Bewegung des Lids in Verbindung mit einer des P-Loops von der offenen in die aktive Form bringt. Diese Konformationsänderung ($k_{iso1} = 14\ s^{-1}$) wird ermöglicht durch den Zusammenbruch eines Netzwerks aus Wassermolekülen und eine Rotation der Seitenkette von Asp 15, die durch eine Interaktion mit dem γ-Phospat von MgATP ausgelöst wird. Die Stabilisierung der offenen Enzymkonformation geht verloren, und TmpK kann die aktive, geschlossene Konformation einnehmen. Im Übergangszustand gibt es eine Wechselwirkung von Arg 97 mit der Phosphatgruppe von dTMP. Diese Wechselwirkung bringt die γ-Phosphatgruppe von MgATP und die α-Phosphatgruppe von dTMP in eine optimale Geometrie für die folgende nukleophile Substitutionsreaktion. Die Interaktion von Arg 97 mit Asp 15, Gln 157 und der 3'-OH-Gruppe von dTMP wirkt wie eine Klammer, die die aktive Konformation aufrecht erhält [110]. Die deutlich kleinere Ratenkonstante $k_{iso-1} = 0.11\ s^{-1}$ für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Rückwärtsreaktion, mit der der aktive Eduktkomplex (mit MgATP und dTMP) in den inaktiven Eduktkomplex übergeht, kann mit dieser strukturellen Information erklärt werden. Die Klammerwirkung der miteinander wechselwirkenden Aminosäuren und der 3'-OH-Gruppe wird kinetisch durch die Verschiebung des Gleichgewichts zur geschlossenen Enzymkonformation hin deutlich ($K_{iso1} = \frac{E^{\ddagger}}{E^{\dagger}} = \frac{k_{iso-1}}{k_{iso1}} = 0.008$ für die Vorwärtsreaktion).

Die Strukturänderung, die vom geschlossenen zum offenen Produktkomplex mit MgADP und dTDP führt ($k_{iso2} = 0.7\ s^{-1}$), ist der ratenlimitierende Schritt bei der Phosphorylierung von dTMP, nicht der chemische Schritt. Der strukturelle Grund hierfür ist wiederum das Einfangen des Enzyms in der aktiven Konformation durch die Wechselwirkung von Asp15, Arg 97, Gln 157 und der 3'-OH-Gruppe des Produkts dTDP, wodurch sich auch hier das Gleichgewicht zum geschlossenen Komplex hin verschiebt ($K_{iso2} = \frac{E^{\ddagger}}{E^{\dagger}} = \frac{k_{iso2}}{k_{iso-2}} = 0.2$). Auch der Synergismus der Bindung von dTMP und MgATP ist möglicherweise eine Folge der beschriebenen Klammerwirkung und der damit verbundenen Stabilisierung der geschlossenen Enzymkonformation. In der Abbildung 52 ist die Struktur humaner wt-TmpK im ternären Komplex mit dem nichthydrolysierbaren ATP-Analog AppNHp und dTMP dargestellt [110]. Die wesentlichen Aminosäuren sowie die 3'-OH-Gruppe von dTMP sind zur Verdeutlichung der räumlichen Nähe besonders gekennzeichnet.

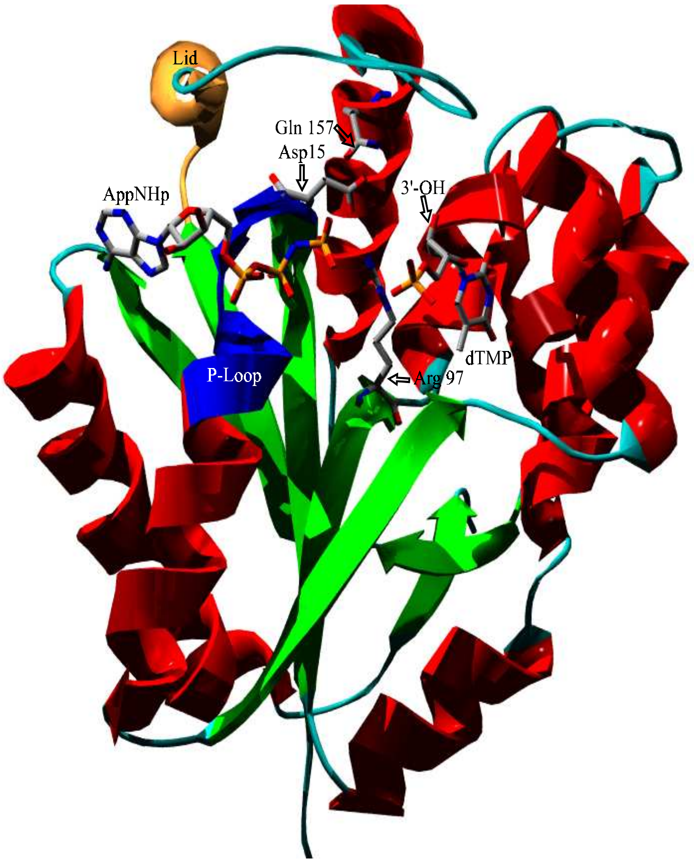


Abb. 52: Tertiärstruktur eines ternären Komplexes aus hsTmpK$_{wt}$-dTMP-AppNHp [110]: α-Helices sind rot, β-Faltblätter grün dargestellt, die die Strukturelemente verbindenden Loops sind cyan. Die Wechselwirkungen der Aminosäuren Asp 15 (im P-Loop), Arg 97, Gln 157 und der 3'OH-Gruppe von dTMP halten das Enzym wie eine Klammer in der aktiven Konformation, wodurch sich die Konformationsänderung vor der eigentlichen Produktfreisetzung als ratenlimitierender Schritt erklärt.

4.4.2 Mechanismus mit AZTMP/AZTDP

Die Bildung der binären Komplexe ist, wie bei dTMP bzw. dTDP, ebenfalls schnell. Interessanterweise zeigt AZTMP im Vergleich mit den vier untersuchten Thymidinnukleotiden die größte Affinität im binären Komplex zur humanen wt-TmpK. Im Gegensatz zur Bindung von dTMP ist die Bindung des monophosphorylierten Anti-HIV-Medikaments AZTMP im ternären Komplex jedoch antagonistisch. Der ratenlimitierende Schritt bei der Reaktion von AZTMP bzw. AZTDP mit MgATP bzw.

MgADP ist sowohl für die Umsetzung der Edukte als auch der Produkte das Schließen der Lid-Region des Enzyms, d. h. der Übergang in die aktive Konformation ($k_{iso1} = 0.012\ s^{-1}$ und $k_{iso-2} = 0.0012\ s^{-1}$). Demgegenüber werden die geschlossenen Edukt- und Produktkonformationen des Enzyms regelrecht gesprengt ($k_{iso-1} = 11\ s^{-1}$ und $k_{iso-2} = 1.1\ s^{-1}$). Die Gleichgewichtskonstanten für die Konformationsänderung liegen jeweils weit auf der Seite der inaktiven Konformationen ($K_{iso} = \frac{E^{\ddagger}}{E^{\dagger}} \approx 1000$).

Die kristallographische Analyse eines Komplexes aus $hsTmpK_{wt}$, AZTMP und dem nichthydrolysierbaren ATP-Analog AppNHp liefert die stukturelle Erklärung für diese kinetischen Befunde [136]. TmpK bleibt in diesem Komplex vorwiegend in einer offenen Konformation, weil das Schließen der Lid-Region eine Kollision zwischen Asp 15 und der 3'-Azidogruppe von AZTMP verursacht. Asp 15 behält im Komplex mit AZTMP und AppNHp dieselbe Position wie im offenen inaktiven Enzymzustand. Das Schließen der Lid-Region wird jedoch nicht völlig verhindert, wie die 60-fach reduzierte, aber meßbare Katalyserate mit AZTMP und MgATP beweist. Möglicherweise macht die Azidogruppe die geschlossene aktive Konformation lediglich energetisch ungünstiger, denn die wichtige Wechselwirkung von Asp 15 mit der 3'-OH-Gruppe von dTMP, die in AZTMP fehlt und zusammen mit anderen Wechselwirkungen bei der Bindung von dTMP wie eine Klammer wirkt, kann nicht stattfinden. Der Antagonismus bei der Bildung des ternären Komplexes ist wahrscheinlich mit diesem strukturellen Ergebnis erklärbar. Die Bindung eines der beiden Nukleotide MgATP bzw. AZTMP ruft eine Art halbgeschlossenen Zustand des Enzyms hervor. Die Bindung des zweiten Nukleotids verursacht die beschriebenen hindernden sterischen Wechselwirkungen: Das Enzym muß eine eher offene verzerrte Konformation, die energetisch ungünstig ist, einnehmen. Die verminderte Aktivierung von AZTMP beruht also nicht, wie in einer früheren Arbeit angenommen wurde [40], auf der Reduzierung der Geschwindigkeit der chemischen Reaktion durch eine Bewegung des P-Loops. Die Geschwindigkeit des Phosphoryltransfers bei der Aktivierung von AZTMP ist möglicherweise geringer als bei der Umsetzung von dTMP, sie wird aber nicht limitierend.

4.4.3 Der *induced fit* als ratenlimitierende Konformationsänderung

Bei der Aktivierung von AZTMP ist der ratenlimitierende Schritt eine als *induced fit* bezeichnete Konformationsänderung, also der Prozeß, an dessen Ende das aktive Zentrum von TmpK komplementär zum Substrat AZTMP ist. Dieses Phänomen wurde auch bei DNA-Polymerasen, z. B. bei DNA Polymerase 1 aus *E. coli* [160], bei bakteriophager T7 DNA Polymerase [161] und menschlicher DNA Polymerase β [162], beobachtet. Dabei bindet das 2‘-Deoxynukleosidtriphosphat (dNTP) in einem Zweischrittbindungsmechanismus an den binären Komplex aus DNA und der Polymerase. Der erste Bindungsschritt bringt das dNTP schnell in das aktive Zentrum der Polymerase. Durch die Substratbindung wird eine Konformationsänderung induziert, die die Polymerase in eine geschlossene aktive Form bringt. Diese Konformationsänderung ist der ratenlimitierende Schritt bei der DNA-Synthese [163]. Das primäre Kriterium für die Selektion des dNTP’s ist die korrekte Ausbildung aller Watson-Crick-Wechselwirkungen [163], wobei aber auch die durch die Ribose und die Triphosphatgruppe verursachten Wechselwirkungen eine Rolle spielen [164]. Erst nach der „Überprüfung“ aller Wechselwirkungen wird der Einbau des richtigen dNTP’s in die DNA erlaubt. Durch die Bindung eines falschen dNTP’s wird die Geschwindigkeit der Konformationsänderung noch einmal 2000 bis 4000-fach reduziert [163]. Die mit dieser Geschwindigkeitsreduzierung einhergehende Verschiebung der Verhältnisse der entsprechenden Ratenkonstanten (*kinetic partitioning*) gibt der Exonuclease-Untereinheit einer Polymerase genügend Zeit, das falsche dNTP durch Hydrolyse aus der wachsenden DNA-Kette zu entfernen. Befindet sich das richtige dNTP im aktiven Zentrum, ist die Geschwindigkeit der Konformationsänderung größer als die Exonukleaseaktivität und das dNTP wird polymerisiert [163]. Mit diesem Mechanismus unterscheiden wahrscheinlich menschliche Polymerasen zwischen dTTP und AZTTP und verhindern den Einbau von AZTTP in menschliche DNA und den daraus resultierenden Kettenabbruch. Die Reverse Transkriptase, die DNA-Polymerase des HIV, verfügt nicht über solch einen ausgeprägten „Korrekturmechanismus“. Bei Verwendung von RNA als Vorlage für die virale DNA-Synthese wurde keine ratenlimitierende Konformationsänderung, die eine genaue Überprüfung des dNTP’s und damit die Entfernung eines Mismatch-Paares möglich macht, festgestellt [165]. Der Grund hierfür ist möglicherweise, daß Reverse Transkriptase sowohl DNA/RNA- als auch DNA/DNA-Doppelhelices binden muß und deshalb die Geometrie der Basenpaarung nicht in demselben Maß zur Diskriminierung von falschen dTNP's nutzen kann wie menschliche Polymerasen, die nur für DNA-Replikation benötigt werden [163]. In der Konsequenz wird sowohl dTTP als auch AZTTP in die wachsende virale DNA-Kette eingebaut. Es ist interessant festzustellen, daß menschliche TmpK und menschliche Polymerase mit einem prinzipiell ähnlichen Mechanismus zwischen Thymidin und Azidothymidin unterscheiden.

4.5 Kinetischer Mechanismus der Mutantenproteine

4.5.1 hsTmpK$_{\mathbf{R200A/F105Y}}$

Der Austausch von Phenylalanin 105 gegen Tyrosin führt zu einer 30-fach schnelleren Phosphorylierung von AZTMP bei einer gleichzeitig 4-fach verminderten Phosphorylierungsgeschwindigkeit von dTMP. In diesem Zusammenhang erfüllt die Phenylalaninmutante die Anforderungen an ein Enzym, das möglicherweise zur Beschleunigung der AZT-Aktivierung bei HIV-Patienten dienen kann. Der kinetische Mechanismus bei der Umsetzung von dTMP bzw. dTDP hat sich gegenüber dem menschlichen wt-Enzym nicht grundsätzlich geändert. Das Schließen der Lid-Region geschieht schneller ($k_{iso1} = 130\ s^{-1}$ und $k_{iso-2} = 96\ s^{-1}$), während das Öffnen des Lids bei der Vorwärtsreaktion langsamer wird ($k_{iso2} = 0.17\ s^{-1}$). Der ratenlimitierende Schritt in der dTMP-Aktivierung ist die Konformationsänderung, die zur Produktfreisetzung führt. Die Gleichgewichtskonstanten für die Konformationsänderungen ($K_{iso} = \frac{E^{\ddagger}}{E^{\dagger}}$) liegen in der Größenordnung 10^{-3}.

Die F105Y-Mutation bewirkt mit AZTMP bzw. AZTDP im Vergleich zum wt-Enzym kinetisch eine Verschiebung des ratenlimitierenden Schritts. Bei dieser Mutante ist auch mit AZTMP bzw. AZTDP die Konformationsänderung, die vor der Produktfreisetzung liegt, geschwindigkeitsbestimmend ($k_{iso2} = 0.25\ s^{-1}$ und $k_{iso-1} = 0.018\ s^{-1}$). Das Schließen der Lid-Region ist wesentlich schneller geworden ($k_{iso1} = 4.8\ s^{-1}$ und $k_{iso-2} = 0.07\ s^{-1}$). Infolgedessen sind auch die Gleichgewichtskonstanten für die Konformationsänderungen deutlich zum geschlossenen Komplex hin verschoben. Der strukturelle Grund hierfür ist wahrscheinlich eine Destabilisierung der offenen und eine

Stabilisierung der geschlossenen Konformation [136]. Im wt-Enzym wird die offene Konformation durch ein Netzwerk von sieben Wassermolekülen stabilisiert. Die Hydroxylgruppe von Tyr 105 kommt sehr nahe an eines dieser Wassermoleküle heran und stört dieses Netzwerk, so daß die offene Enzymkonformation nicht mehr ausreichend stabilisiert werden kann. Zusätzlich verankert Tyr 105 durch eine Wechselwirkung der Hydroxylgruppe mit Gln 157 diese Aminosäure in einer Position, die eine besonders starke Wechselwirkung mit Asp 15 erlaubt. Die geschlossene Enzymkonformation ist nun auch mit AZTMP favorisiert, weil die möglichen Wechselwirkungen eine ähnliche Klammerwirkung haben wie bei wt-TmpK mit dTMP bzw. dTDP. Der gegenüber dem wt-Enzym deutlich verringerte Schmelzpunkt des nukleotidfreien Enzyms ($T_{m,F105Y} = 37°$ C vs. $T_{m,wt} = 50°$ C) deutet auf eine höhere Flexibilität der menschlichen F105Y-Mutante hin, was möglicherweise eine zusätzlich Erklärung für die verbesserte AZTMP-Aktivierung gibt. Die sterisch anspruchsvolle 3'-Azidogruppe kann von dem Enzym besser aufgenommen und in die Enzymstruktur eingebaut werden.

Die Einführung der Aminosäure Tyrosin ist eine Adaption von $\text{TmpK}_{S.\ cerevisiae}$ [49]. Hier wechselwirkt die OH-Gruppe von Tyr 102 (entspricht der Position 105 im menschlichen Enzym) mit einer für den katalytischen Mechanismus wichtigen Aminosäure (Asp 14). Die Beschleunigung der Schließbewegung durch die Aminosäure Tyrosin ist ein Hinweis darauf, daß bei $\text{TmpK}_{S.\ cerevisiae}$ die notwendigen Konformationsänderungen natürlicherweise schneller sind. Nimmt man für $\text{TmpK}_{S.\ cerevisiae}$ dieselbe Größenordung für die Isomerisierung wie bei der menschlichen F105Y-Mutante an ($k_{iso} \approx 10^2\ s^{-1}$) und vergleicht diese Geschwindigkeit mit der maximalen Katalysegeschwindigkeit ($k_{cat} \approx 10^1\ s^{-1}$), ist möglicherweise auch die Umsetzung von dTMP durch $\text{TmpK}_{S.\ cerevisiae}$ durch die vor der Produktfreisetzung notwendige Konformationsänderung limitiert.

4.5.2 hsTmpK$_{\text{R200A/R16G/}\textit{E. coli}\text{ small lid}}$

Der kinetische Mechanismus der „small lid"-Mutante mit dTMP bzw. dTDP unterscheidet sich bis auf eine 3-fache Beschleunigung der zum aktiven Komplex mit MgATP und dTMP führenden Konformationsänderung ($k_{iso1} = 36\ s^{-1}$) nicht von dem des wt-Enzyms. Die strukturelle Erklärung hierfür ist wiederum eine Stabilisierung der geschlossenen Enzymkonformation durch die Lid-Region von $\mathrm{TmpK}_{E.\ coli}$ [136]. Das Enzym scheint durch die Einführung des *E. coli* Lids flexibler geworden zu sein. Diese Hypothese wird zum einen durch die stärkere Proteaseempfindlichkeit der „small lid”-Mutante und zum anderen durch die geringere kalorimetrische Schmelzenthalpie im Vergleich zum Wildtyp gestützt. Erstaunlicherweise drückt sich die geringere Wärmeaufnahmefähigkeit dieser Mutante aber nicht in einem niedrigeren Schmelzpunkt aus. Die gewonnene Flexibilität dieser Mutante gleicht offenbar die sterische Hinderung durch die Azidogruppe von AZTMP aus. Die *E. coli*-Lidregion stabilisiert mit AZTMP die geschlossene, katalytisch aktive Enzymkonformation.

4.6 Ausblick

Menschliche TmpK wurde in dieser Arbeit nahezu vollständig kinetisch charakterisiert. Nicht näher untersucht wurde die Beeinflussung der Aktivität von humaner TmpK bei einem Austausch des notwendigen Mg^{2+}-Ions durch andere divalente Metallionen, die für TmpK aus vielen Organismen beschrieben wurde. Dabei ist die Austauschbarkeit des Metallions individuell von der TmpK abhängig [12, 165, 166]. Ungeklärt blieb auch die Relevanz der mit isothermer Titrationskalorimetrie erhaltenen Stöchiometrien, insbesondere mit dTMP und dTDP. Der erhaltene stöchiometrische Faktor 0.25 für beide Nukleotide bedeutet, daß zwei Dimere TmpK lediglich ein Nukleotidmolekül binden würden. Diese Bindungsstöchiometrie ist, speziell in einer Zelle, aufgrund der hohen Nukleotidaffinität von TmpK allerdings nur schwer vorstellbar und wurde möglicherweise nur mit isolierter TmpK im Experiment beobachtet. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der Regulation der TmpK-Aktivität. Die im Vergleich zu anderen NMP-Kinasen sehr geringe Gesamtaktivät ist ein Hinweis auf eine zelluläre Aktivitätsregulation. Diese Aktivitätsregulierung ist sicherlich notwendig, denn Thymidin wird als Triphosphat in einer Zelle nur für die Synthese von DNA gebraucht [167]. DNA-Synthese und damit eine verstärkte TmpK-Aktivität ist für eine Zelle aber nur während der Teilung notwendig, in allen anderen Stadien eines Zellebens wäre dTTP-Synthese eine Verschwendung von Resourcen. Für die Regulation der Aktiviät ist ein ähnlicher Mechanismus wie bei der Ribonukleotidreduktase denkbar. Dieses Enzym reduziert Ribonukleotide zu Deoxyribonukleotiden. Die Aktivität wird durch die Bindung von Ribo- oder Deoxyribonukleotiden gesteuert [168]. Die Bedeutung von TmpK für die DNA-Synthese läßt eine ähnliche Regulation der

Aktivität möglich erscheinen. Je mehr DNA-Bausteine wie beispielsweise 2'-dATP in einer Zelle sind, desto größer könnte die TmpK-Aktivität sein, um eine ausreichende Menge dTTP zur Verfügung zu stellen. Für die Beantwortung der Frage nach der TmpK-Regulation muß also systematisch die Spezifität verschiedener Phosporyldonoren und -akzeptoren untersucht werden, ferner muß auch die Bedeutung der dimeren TmpK-Struktur sowohl für die Regulation als auch für die Kooperativität, über deren mögliche Gründe schon spekuliert wurde, detailliert analysiert werden. Die oligomere Struktur von TmpK könnte Wechselwirkungen mit nukleotidischen oder enzymatischen Effektoren begünstigen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde menschliche Thymidylatkinase (TmpK) vollständig kinetisch charakterisiert. TmpK spielt sowohl bei der Therapie der HIV-Infektion als auch im Kampf gegen Krebs eine herausragende Rolle als Zielenzym für antivirale und cytostatische Medikamente. Die Aufmerksamkeit wurde speziell auf den kinetischen Mechanismus der Aktivierung des antiviralen Agens 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidinmonophosphat (AZTMP), dem monophosphorylierten Analog des bestbekannten Anti-HIV-Medikaments 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidin (AZT, Zidovudin, Retrovir), und des natürlichen Substrats 2'-Deoxythymidinmonophosphat (dTMP), dem Vorläufer des für die DNA-Synthese essentiellen 2'-Deoxythymidintriphosphats (dTTP), durch humane wt-TmpK gerichtet. Daneben wurde der kinetische Mechanismus von zwei Mutanten humaner TmpK ($\mathrm{hsTmpK}_{\mathrm{R200A/F105Y}}$ und $\mathrm{hsTmpK}_{\mathrm{R200A/R16G/145\text{-}148}\ \mathit{E.\ coli}\ \mathrm{lid}}$), die AZTMP besser aktivieren als der Wildtyp, untersucht. Die kinetischen Daten konnten auf der Grundlage eines für NMP-Kinasen akzeptierten minimalen Reaktionsschemas mit durch einen *induced fit* Mechanismus hervorgerufenen offenen und geschlossenen Konformationen interpretiert werden. Der Vergleich des kinetischen Mechanismus von humaner wt-TmpK mit dTMP und AZTMP ergab, daß der Grund für die schlechte Aktivierung von AZTMP in diesem *induced fit* Mechanismus zu suchen ist. Die Geschwindigkeit der für das Erreichen des geschlossenen aktiven Enzymzustands notwendigen Konformationsänderung ist bei der Umsetzung von AZTMP im Vergleich zu dTMP 1000-fach reduziert. Diese Konformationsänderungen konnten durch die eingeführten Mutationen wesentlich beschleunigt werden. In diesem Zusammenhang erlaubten quenched-flow Experimente in Vebindung mit steady-state Experimenten die erstmalige präzise Bestimmung der Geschwindigkeiten von Konformationsänderungen bei einer NMP-Kinase. Neben enzymdynamischen Ergebnissen konnten auch statische Gleichgewichtsdaten über die Nukleotidbindungseigenschaften von TmpK mit Hilfe kalorimetrischer (isotherme Titrationskalorimetrie, ITC) und fluoreszenzspektroskopischer Methoden erhalten werden. Für die fluoreszenzspektroskopische Bestimmung von Dissoziationskonstanten wurde neben dem bekannten fluoreszierenden Bisubstratanalog P^1-(5'-Thymidyl)-P^5-(5'-adenosyl-(2'-3'-N-methylanthraniloyl))pentaphosphat (TP_5A-mant) für die Untersuchung der ATP/ADP-Bindestelle von TmpK das in dieser Arbeit entwickelte und synthetisierte neue Fluorophor $P_{(\beta)}$-(N'-Methylanthraniloylaminohexyl)-aminothymidin-5'-diphosphat ($P_{(\beta)}$-MAHA-TDP) verwendet. Damit war erstmalig fluoreszenzspektroskopisch die Bestimmung von Dissoziationskonstanten für Substrate der NMP/NDP-Bindestelle möglich. Ferner konnten mit Hilfe dieser Fluorophore auch die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten für binäre Enzym-Nukleotid-Komplexe ermittelt werden. In Verbindung mit den Bindungsdaten für die ternären Komplexe (Michaelis-Konstanten) ergab sich für die Umsetzung von dTMP durch humane wt-TmpK eine positive und für AZTMP eine negative Kooperativität. Neben diesen detaillierten Studien an humaner TmpK konnten als Vergleich auch steady-state kinetische Parameter (K_M und k_{cat}-Werte) der partiell aktivierten Monophosphate von 3'-Fluoro-2',3'-dideoxythymidin (FLT, Alovudin) und 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidin (d4T, Stavudin) mit Thymidylatkinasen aus *E. coli*, *S. cerevisae* und Maus bestimmt werden.

6 Literaturverzeichnis

[1] I. Schlichting, J. Reinstein,
Nat. Struct. Biol. **6** (1999) 721.

[2] G. M. Rossolini, S. Schippa, M. L. Riccio, F. Berlutti, L. E. Macaskie, M. C. Thaller,
Cel. Mol. Life Sci. **54** (1998) 833.

[3] M. R. Pincus, D. W. Brandt-Rauf, J. Michl, R. P. Carty,
Cancer Invest. **18** (2000) 39.

[4] B. Kraal, L. A. H. Zeef, J. R. Mesters, K. Boon, E. L. H. Vorstenbosch, L. Bosch, P. H. Anborgh, A. Parmeggiani, R. Hilgenfeld,
Biochem. Cell Biol. **73** (1995) 1167.

[5] T. Hunter,
Cell **100** (2000) 113.

[6] D. Ron, M. G. Kazanietz,
FASEB Journal **13** (1999) 1658.

[7] M. Barile, D Valenti, E. Quagliariello, S. Passarella,
Gen. Pharmacol. **31** (1998) 531.

[8] B. D. Pilger, R. Perozzo, F. Alber, C. Wurth, G. Folkers, L. Scapozza,
J. Biol. Chem. **274** (1999) 31967.

[9] S. Schaertl, M. Konrad, M. A. Geeves,
J. Biol. Chem. **273** (1998) 5662.

[10] N. Mourad, R. E. Parks,
J. Biol. Chem. **241** (1966) 271.

[11] C. Dumas, L. Lascu, S. Morera, P. Glaser, R. Fourme, V. Wallet, M. L. Lacombe, M. Veron, J. Janin,
EMBO J. **11** (1992) 3203.

[12] A. Y. Jong, J. L. Campbell,
J. Biol. Chem. **259** (1984) 14394.

[13] D. G. Rhoads, J. M. Lowenstein,
J. Biol. Chem. **243** (1968) 3963.

[14] Y. C. Cheng, W. H. Prusoff,
Biochem. **12** (1973) 2612.

[15] J. P. Richard, P. A. Frey,
J. Am. Chem. Soc. **100** (1978) 7757.

[16] R. A. Cooper, S. Perry, T. R. Breitman,
Cancer Res. **26** (1966) 2267.

[17] P. Langen, G. Kowollik,
Eur. J. Biochem. **6** (1968) 344.

[18] S.-H. Huang, A. Tang, B. Drisco, S.-Q. Zhang, R. Seeger, C. Li, A. Jong,
DNA Cell Biol. **13** (1994) 461.

[19] M. S. Gottlieb, R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, F. A. Wolf, A. Saxon,
New Engl. J. Med. **305** (1981) 1425.

[20] H. Masur, M. A. Michelis, J. B. Greene, I. Onorato, R. A. Vande Stouwe, R. S. Holzman, G. Wormser, L. Brettman, M. Lange, H. W. Murray,S. Cunningham-Rundles,
New Engl. J. Med. **305** (1981) 1431.

[21] F. P. Siegal, C. Lopez, G. S. Hammer, A. E. Brown, S. J. Kornfeld, J. Gold, J. Hassell, S. Z. Hirschman, C. Cunningham-Rundles, B. R. Adelsberg, D. M. Parham, M. Siegal, S. Cunningham-Rundles, D. Armstrong,
New Engl. J. Med. **305** (1981) 1439.

[22] F. Barré-Sinoussi, J. C. Chermann, R. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Brun-Vézinet, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, L. Montagnier,
Science **220** (1983) 868.

[23] R. C. Gallo, S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Shearer, M. Kaplan, B. F. Heynes, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, G. White, P. Foster, P. D.Markham,
Science **224** (1984) 500.

[24] S. Broder, R. C. Gallo,
New Engl. J. Med. **311** (1984) 1292.

[25] M. Popovic, M. G. Sarngadharan, E. Read, R. C. Gallo,
Science **224** (1984) 497.

[26] H. Mitsuya, K. J. Weinhold, P. A. Furman, M. H. St. Clair, S. Nusinoff-Lehrman, R. C. Gallo, D. P. Bolognesi, D. W. Barry, S. Broder,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82** (1985) 7096.

[27] P. A. Furman, J. A. Fyfe, M. H. St. Clair, K. Weinhold, J. L. Rideout, G. A. Freeman, S. Nusinoff-Lehrman, D. P. Bolognesi, S. Broder, H. Mitsuya, D. W.Barry,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** (1986) 8333.

[28] J. P. Horwitz, J. Chua, M. Noel,
J. Org. Chem. **29** (1964) 2076.

[29] M. Nasr, C. Litterst, J. McGowan,
Antivir. Res. **14** (1990) 125.

[30] J. Balzarini, P. Herdewijn, C. E. DeClerq,
J. Biol. Chem. **264** (1989) 6127.

[31] G. L. Kenyon,
Nature Struct. Biol. **4** (1997) 595.

[32] M. A. Fischl, D. D. Richman, M. H. Grieco, M. S. Gottlieb, P. A. Volberding, O. L. Laskin, J. M. Leedom, J. E. Groopman, D. Mildvan, R. T. Schooley,
New Engl. J. Med. **317** (1987) 185.

[33] P. S. Kedar, J. Abbotts, T. Kovács, K. Lesiak, P. Torrence, S. H. Wilson,
Biochem. **29** (1990) 3603.

[34] J. E. Reardon, W. H. Miller,
J. Biol. Chem. **265** (1990) 20302.

[35] M. Qian, T. Bui, R. J. Ho, J. D. Unadkat,
Biochem. Pharmacol. **48** (1994) 383.

[36] L. Loubière, N. Guettari, M. Caruso, D. Klatzmann,
International Antiv. News **3** (1995) 161.

[37] J. P. Yan, D. D. Ilsley, C. Frohlick, R. Steet, E. T. Hall, R. D. Kuchta, P. Melancon,
J. Biol. Chem. **270** (1995) 22836.

[38] Y. Tornevik, B. Ullmann, J. Balzaini, B. Wahren, S. Eriksson,
Biochem. Pharmacol. **49** (1995) 829.

[39] E. G. Bridges, A. Faraj, J. P. Sommadossi,
Biochem. Pharmacol. **45** (1993) 1571.

[40] A. Lavie, I. Schlichting, I. R. Vetter, M. Konrad, J. Reinstein, R. S. Goody,
Nat. Med. **3** (1997) 922.

[41] J. P. Sommadossi, R. Carlisle, Z. Zhou,
Mol. Pharmacol. **36** (1989) 9.

[42] B. Müller, T. Restle, J. Reinstein, R. S. Goody,
Biochem. **30** (1991) 3709.

[43] R. S. Goody, B. Müller, T. Restle,
FEBS Lett. **291** (1991) 1.

[44] J.-F. Navé, B. Neises, A. Eschbach,
Nucleos. Nucleot. **15** (1996) 1469.

[45] L. K. Smith, R. E. Eakin,
Archiv. Biochem. Biophys. **167** (1975) 61.

[46] A. Lavie, M. Konrad, R. Brundiers, R. S. Goody, I. Schlichting, J. Reinstein,
Biochem. **37** (1998) 3677.

[47] V. Chenal-Francisque, L. Tourneux, E. Carniel, P. Christova, I. Li de la Siera, O. Bârzu, A.–M. Gilles,
Eur. J. Biochem. **265** (1999) 112.

[48] J. Balzarini, R. Pauwels, M. Baba, P. Herdewijn, E. de Clercq, S. Broder, D. G. Johns,
Biochem. Pharmacol. **37** (1988) 897.

[49] R. Brundiers, A. Lavie, T. Veit, J. Reinstein, I. Schlichting, N. Ostermann, R. S. Goody, M. Konrad,
J. Biol. Chem. **274** (1999) 35289.

[50] G. E Lienhard, I. I. Secemski,
J. Biol. Chem. **248** (1973) 1121.

[51] P. Feldhaus, T. Fröhlich, R. S. Goody, M. Isakov, R. H. Schirmer,
Eur. J. Biochem. **57** (1975) 197.

[52] A. Lavie, I. R. Vetter, M. Konrad, R. S. Goody, J. Reinstein, I. Schlichting,
Nat. Struc. Biol. **4** (1997) 601.

[53] A. Lavie, N. Ostermann, R. Brundiers, R. S. Goody, J. Reinstein, M. Konrad, I. Schlichting,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95** (1998) 14045.

[54] C. W. Müller, G. E. Schulz,
J. Mol. Biol. **224** (1992) 159.

[55] U. Abele, G. E. Schulz,
Protein Sci. **4** (1995) 1262.

[56] K. Scheffzek, W. Kliche, L. Wiesmüller, J. Reinstein,
Biochem. **35** (1996) 4609.

[57] M. Saraste, P. R. Sibbald, A. Wittinghofer,
Trends Biochem. Sci. **15** (1990) 430.

[58] C. Vonrhein, G. J. Schlauderer, G. E. Schulz,
Structure **3** (1995) 483.

[59] J. Reinstein, M. Brune, A. Wittinghofer,
Biochem. **27** (1988) 4712.

[60] J. Reinstein, I. R. Vetter, I. Schlichting, P. Rosch, A. Wittinghofer, R. S. Goody,
Biochem. **29** (1990) 7440.

[61] M.-D. Tsai, H. Yan,
Biochem. **30** (1991) 6806.

[62] L. J. Noda,
J. Biol. Chem **232** (1958) 237.

[63] U. K. Laemmli,
Nature **227** (1970) 680.

[64] M. Wilm, M. Mann,
Anal. Chem. **68** (1996) 1.

[65] M. M. Bradford,
Anal. Biochem. **72** (1976) 248.

[66] I. H. Segel,
Biochemical calculations, 2. Aufl., John Wiley & Sons, New York 1976.

[67] R. Bone, Y. C. Cheng, R. Wolfenden,
J. Biol. Chem. **261** (1986) 5731.

[68] H. Theyssen, H.–P. Schuster, L. Packschies, B. Bukau, J. Reinstein,
J. Mol. Biol. **263** (1996) 657.

[69] J. Berghäuser,
Biochim. Biophys. Acta **537** (1975) 370.

[70] R. A. Fildes, H. Harris,
Nature **209** (1966) 261.

[71] S. H. Thrall, J. Reinstein, B. M. Wöhrl, R. S. Goody,
Biochem. **35** (1996) 4609.

[72] W. H. Press, B. P. Flannery, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling,
Numerical recipes in Pascal: the Art of Scientific Computing, Cambridge University Press, Cambridge 1989.

[73] D. D. Perrin, L. F. Armarego,
Purification of laboratory chemicals, Pergamon Press Ltd., Oxford 1988.

[74] J. Ludwig,
Acta Biochem. et Biophys. Acad. Sci. Hung. **16** (1981) 131.

[75] T. Veit,
Diplomarbeit (1997) Universität Dortmund.

[76] M. G. Rudolph, T. Veit, J. Reinstein,
Protein Sci. **8** (1999) 2697.

[77] D. J. Pouchnik, L. E. Laverman, F. Janick-Spens, D. M. Jameson, G. D. Reinhart, C. R. Cremo,
Anal. Biochem. **255** (1996) 26.

[78] R. Brundiers,
Dissertation (1999) Universität Göttingen.

[79] M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi,
Bull. Chem. Soc. (Japan) **42** (1969) 3505.

[80] H. A. Tajmir-Riahi, S. Mesaoudi,
J. Biomolec. Struc. Dyn. **10** (1992) 345.

[81] D. E. Hoard, D. G. Ott,
J. Am. Chem. Soc. **87** (1965) 1785.

[82] T. Zor, M. Bar-Yaacov, S. Elgavish, , B. Shaanan, Z. Selinger,
Eur. J. Biochm. **249** (1997) 330.

[83] N. E. Geacintov,
Photochem. Photobiol. **45** (1987) 547.

[84] T. Hiratsuka,
Biochim. Biophys. Acta **734** (1983) 496.

[85] J. Reinstein, A- M. Gilles, T. Rose, A. Wittinghofer, I. Saint Girons, O. Bârzu, W. K. Surewicz, H. H. Mantsch,
J. Biol. Chem. **264** (1989) 8107.

[86] L. Wiesmüller, K. Scheffzek,W. Kliche, R. S. Goody, A. Wittinghofer, J. Reinstein,
FEBS Letters **363** (1995) 22.

[87] L. Packschies, H. Theyssen, A. Buchberger, B. Bukau, R. S. Goody, J. Reinstein,
Biochem. **36** (1997) 3419.

[88] D. Klostermeier, R. Seidel, J. Reinstein,
J. Mol. Biol. **279** (1998) 841.

[89] T. Weikl, P. Muschler, K. Richter, T. Veit, J. Reinstein, J. Buchner
J. Mol. Biol., **zur Veröffentlichung eingereicht.**

[90] J. E. Ladbury, B. Z. Chowdhry,
Chem. Biol. **3** (1996) 791.

[91] M. Gruen, H. Prinz, M. Gautel,
FEBS Letters **453** (1999) 254.

[92] A. K. Moorthy, B. Gopal, P. R. Satish, S. Bhattacharya,A. Bhattacharya, M. R. N. Murthy, A. Surolia,
FEBS Letters **461** (1999) 19.

[93] G. J. K. Praefcke, M. Geyer, M. Schwemmle, H. R. Kalbitzer, C. Herrmann,
J. Mol. Biol. **292** (1999) 321.

[94] T. Christensen, B. Svensson, B. W. Sigurskjold,
Biochem. **38** (1999) 6300.

[95] C. Trandum, P. Westh, K. Jorgensen, O. G. Mouritsen,
Thermochim. Acta **328** (1999) 129.

[96] T. dem Blaauwen, J. P. W. van der Wolk, C. van der Does, K. H. M. van Wely, A. J. M. Driessen,
FEBS Letters **458** (1999) 145.

[97] J. E. Ladbury, M. Hensmann, G. Panayotou, I. D. Campbell,
Biochem. **35** (1996) 11062.

[98] W. P. Jencks,
Prod. Natl. Acad. Sci. USA **78** (1981) 4046.

[99] C. H. Suelter, M. DeLuca,
Anal. Biochem. **135** (1983) 112.

[100] T. Ayabe, H. Takenaka, O. Takenaka, M. Sumida, H. Maruyama, T. Onitsuka, K. Shibata, S. Uesugi, M. Hamada,
Biochem. **36** (1997) 4027.

[101] T. Okajima, T. Fukamizo, S. Goto, T. Fukui, K. Tanizawa,
J. Biochem. **124** (1998) 359.

[102] Y. Li, Y. Zhang, H. Yan,
J. Biol. Chem. **271** (1996) 28038.

[103] D. B. Craig, C. J. Wallace,
Biochem. J. **279** (1991) 781.

[104] M. R. Boyd, E. R. Kern, S. Safrin,
Antiviral Chem. Chemother. **4** (1993) 3.

[105] S. A. Plotkin, W. L. Drew, D. Felsenstein, M. S. Hirsch,
J. Infect. Dis. **152** (1985) 833.

[106] M. A. Siddiqui, H. Ford Jr., C. George, V. E. Marquez,
Nucleos. Nucleot. **15** (1996) 235.

[107] V. E. Marquez, M. A. Siddiqui, A. Ezzitouni, P. Rusa, J. Wang
J. Med. Chem. **39** (1996) 3739.

[108] V. E. Marquez, A. Ezzitouni, P. Rusa, M. A. Siddiqui, H. Ford Jr., R. J. Feldman,
J. Med. Chem. **20** (1998) 2780.

[109] V. E. Marquez, A. Ezzitouni, P. Rusa, M. A. Siddiqui, H. Ford Jr., R. J. Feldman, H. Mitsuya, C. George, J. J. Barchi Jr.,
J. Am. Chem. Soc. **120** (1998) 2780.

[110] N. Ostermann, R. Brundiers, M. Konrad, J. Reinstein, T. Veit, R. S. Goody, I. Schlichting, A. Lavie,
Structure **8** (2000) 629.

[111] Haldane, J. B. S.,
Enzymes, M. I. T. Press, London 1965.

[112] I. H. Segal,
Enzyme Kinetics, John Wiley & Sons, New York 1993.

[113] F. S. Markland, C. L. Wadkins,
J. Biol. Chem. **241** (1966) 4136.

[114] J. F. Morrison, W. J. O'Sullivan, A. G. Ogston,
Biochim. Biophys. Acta **52** (1961) 82.

[115] D. V. Roberts,
Cambrigde University Press (1977) 231.

[116] K. E. Neet,
Method Enzymol. **249** (1995) 519.

[117] T. Okajima, K. Tanizawa, T. Yoneya, T. Fukui,
J. Biol. Chem. **266** (1991) 11442.

[118] T. Berman, H. Jornvall, S. Eriksson,
FEBS Lett. **443** (1999) 170.

[119] B. Munch-Petersen, L. Cloos, G. Tyrsted, S. Eriksson,
J. Biol. Chem. **266** (1991) 9032.

[120] J. C. White, R. L. Capizzi,
Cancer Res. **51** (1991) 2559.

[121] K. Krawiec, B. Kierdaszuk, S. Eriksson, B. Munch-Petersen, D. Shugar,
Biochem. Biophys. Res. Com. **216** (1995) 42.

[122] E. V. Usova, S. Eriksson,
Eur. J. Biochem. **248** (1997) 762.

[123] L. Serina, C. Blondin, E. Krim, O. Sismeiro, A. Danchin, H. Sukamoto, A. M. Gilles, O. Bârzu,
Biochem. **34** (1995) 5066.

[124] J. Seagrave, P. Reyes,
Arch. Biochem. Biophys. **245** (1987) 518.

[125] L. W. Frick, D. J. Nelson, M. H. St. Clair, P. A. Furman, T. A. Krenitsky,
Biochem. Biophys. Res. Commun. **154** (1988) 124.

[126] E. Nowak, R. S. Goody,
Biochem. **27** (1988) 8613.

[127] X. Wu, H. Gutfreund, P. B. Chock,
Biochem. **31** (1992) 2123.

[128] M. Hardt, H. Plattner,
J. Struc. Biol. **128** (1999) 187.

[129] G. Sasnauskas, A. Jeltsch. A. Pingoud, V. Siksnys,
Biochem. **38** (1999) 4028.

[130] M. A. Geeves, I. Chizhov,
Adv. Exp. Med. Biol. **453** (1998) 79.

[131] H. D. White, B. Belknap, M. R. Webb,
Biochem. **36** (1997) 11828.

[132] J. E. Mahaney, J. P. Froechlich, D. D. Thomas,
Biochem. **34** (1995) 4864.

[133] D. J. Carty, G. D. Jones, D. L. Freas, A. R. Gear,
J. Lab. Clin. Med. **112** (1988) 603.

[134] J. Reinstein, M. A. Geeves,
unveröffentlichte Ergebnisse.

[135] D. E. Koshland Jr.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **44** (1958) 98.

[136] N. Ostermann, A. Lavie, S. Padiyar, R. Brundiers, T. Veit, R. Reinstein, R. S. Goody, M. Konrad, I. Schlichting, J. Mol. Biol. **zur Veröffentlichung eingereicht.**

[137] P. Privalov,
Adv. Protein Chem. **33** (1979) 167.

[138] P. Privalov,
Adv. Protein Chem.**35** (1982) 1.

[139] M. C. Chakrabarti, F. P. Schwarz,
Nucleic Acids Res. **27** (1999) 4801.

[140] I. Jelesarov, H. R. Bosshard,
J. Mol. Recognit. **12** (1999) 3.

[141] G. T. De Koster, A. P. Robertson,
Biochem. **36** (1997) 2323.

[142] S. M. Leung, G. Senisterro, K. P. Ritchie, S. E. Sadis, J. R. Lepoch, L. E. Hightower,
Cell Stress Chaperon **1** (1996) 78.

[143] J. E. Lansbury, B. Z. Chowdry
Biocalorimetry, John Wiley & Sons, New York 1998.

[144] J. Reinstein,
persönliche Mitteilung.

[145] J. A. Secrist, J. Barrio, N. J. Leonard,
Science **175** (1972) 646.

[146] J. A. Secrist, J. Barrio, N. J. Leonard, G. Weber,
Biochem. **11** (1972) 3499.

[147] J. A. Secrist, J. Barrio, N. J. Leonard, C. Villar-Palasi, A. Gilman,
Science **177** (1972) 279.

[148] D. C. Ward, E. Reich, L. Stryer,
J. Biol. Chem **244** (1969) 1228.

[149] T. Hirasuka,
J. Biochem. **78** (1975) 1135.

[150] Y. E. Goldman, M. G. Hibberd, J. A. McCray, D. R. Trentham,
Nature **300** (1982) 701.

[151] I. Schlichting, S. C. Almo, G. Rapp, K. Wilson, K. Petratos, A. Lentfer, A. Wittinghofer, A. Kabsch, E. F. Pai, G. A. Petsko, R. S. Goody,
Nature **345** (1990) 309.

[152] S. Limmer, C. O. Reiser, N. K. Schirmer, N. W. Grillenbeck, M. Sprinzl,
Biochem. **31** (1992) 2970.

[153] A. J. Scheidig, S. M. Franken, J. E. T Corrie, G. P. Reid, A. Wittinghofer, E. F. Pai, R. S. Goody,
J. Mol. Biol. **253** (1995) 132.

[154] T. Zor, R. Andorn, I. Sofer, M. Chorev, Z. Selinger,
FEBS Lett. **433** (1998) 326.

[155] S. C. Tyagi, F. Y. Wu,
J. Biol. Chem. **262** (1987) 10684.

[156] J. Reinstein, I. Schlichting, A. Wittinghofer,
Biochem. **29** (1990) 7451.

[157] D. Gentry, C. Bengras, K. Ikehara, M. Cashel,
J. Biol.Chem. **268** (1993) 14316.

[158] S. Su, P. J. Russell,
J. Biol. Chem **243** (1968) 3826.

[159] T. R. Brown, S. Ogawa,
Proc. Natl. Acad. Scie. USA **74** (1977) 3627.

[160] M. W. Frey, L. C. Sowers, D. P. Millar, S. J. Benkovic,
Biochem. **34** (1995) 9185.

[161] S. S. Patel, I. Wong, K. A. Johnson,
Biochem. **30** (1991) 511.

[162] B. G. Werneburg, J. Ahn, X. Zhong, R. J. Hondal, V. Kraynov, M.-D. Tsai,
Biochem. **35** (1996) 7041.

[163] K. A. Johnson,
Annu. Rev. Biochem. **62** (1993) 685.

[164] H. Pelletier, M. R. Sawayam W. Wolfle, S. H. Wilson, J. Kraut,
Biochem. **35** (1996) 12762.

[165] L. L. Terentyev, N. A. Terentyeva, V. A. Rasskazov,
Biochem. (Moskau) **64** (1999) 80.

[166] D. J. Nelson, C. E. Carter,
J. Biol. Chem. **244** (1969) 52554.

[167] R. E. Wittes, W. R. Kidwell,
J. Mol. Biol. **78** (1973) 473.

[168] L. Stryer,
Biochemistry, 4th edition, W. H. Freeman and Company, New York 1975.

[169] R. S. Goody, K. C. Holmes,
Biochim. Biophys. Acta **726** (1993) 13.

[170] J. Reinstein,
Dissertation (1989) Universität Heidelberg.

7 Abkürzungsverzeichnis

α	Kooperativitätsfaktor
Abb	Abbildung
Å	Angstrøm
A	Absorption
ΔA	Absorptionsänderung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AIDS	*aquired immunodeficiency syndrome*
AmpK	Adenylatkinase
AP	alkalische Phosphatase
AppNHp	β,γ-Imidoadenosin-5'-triphosphat
AP$_5$A	P^1-(5'-Adenosyl)-P^5-(5'adenosyl)pentaphosphat
AP$_5$A-mant	P^1-(5'-Adenosyl)-P^5-(5'adenosyl-(2'-3'-N-methylanthraniloyl))pentaphosphat
APS	Ammoniumperoxosulfat
Arg	L-Arginin
Asp	L-Aspartat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AZT	3'-Azido-2',3'-dideoxythymidin
AZTDP	3'-Azido-2',3'-dideoxythymidin-5'-diphosphat
AZTMP	3'-Azido-2',3'-dideoxythymidin-5'-monophosphat
AZTP$_5$A	P^1-[5'-(3'-Azido-2',3'-dideoxythymidyl]-P^5-(5'-adenosyl)pentaphosphat
AZTTP	3'-Azido-2',3'-dideoxythymidin-5'-triphosphat
BSA	Albumin aus Rinderserum (*bovine serum albumine*)
c	Konzentration
C	Kohlenstoff
C8-MABA-AMP	8-(N'-Methylanthraniloylaminobutyl)aminoadenosin-5'-monophosphat
$CaSO_4$	Calciumsulfat
CDP	Cytidindiphosphat
c_p	Wärmekapazität bei konstantem Druck
d	Schichtdicke
D. discoideum	*Dictyostelium discoideum* (Schleimpilz)
2'-dATP	2'-Deoxyadenosintriphosphat
D_2O	Deuteriumoxid
DGS	Differentialgleichungssystem
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DMF	N,N-Dimethylformamid
DSC	*differential scanning calorimetry*
d4T	2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidin
dTDP	2'-Deoxythymidin-5'-diphosphat
d4TMP	2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidin-5'-monophospat
DTE	Dithioerythritol
dTMP	2'-Deoxythymidin-5'-monophosphat
DTT	Dithiotreitol
dTTP	2'-Deoxythymidin-5'-triphosphat
E	Enzym
ε-ATP	1,N^6-ethenoadenosin-5'-triphosphat
ε	Extinktionskoeffizient
E. coli	*Escherichia coli*
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
F	Fluoreszenz
FLT	3'-Fluoro-2',3'-dideoxythymidin
FLTMP	3'-Fluoro-2',3'-dideoxythymidin-5'-monophosphat
ΔG_B	freie Enthalpie (Gibbs'sche Bindungsenthalpie)
G6P-DH	Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase

Gl	Gleichung
Gln	L-Glutamin
Glu	L-Glutamat
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
ΔH	Enthalpie
ΔH_m^v	van't Hoff'sche Schmelzenthalpie
ΔH_m^c	kalorimetrische Schmelzenthalpie
H_3PO_4	Phosphorsäure
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIV	*human immunodeficiency virus*
HK	Hexokinase
HPLC	*high performance liquid chromatography*
hs	*homo sapiens*
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie *(isothermal titration calorimetry)*
i	Anzahl der strukturellen Domänen eines Proteins
i. Vak.	im Vakuum
φ	Amplitude
ϑ	Korrekturfaktor für hyperbolische Analyse der $K_{M,app}$-Werte
K_2HPO_4	Dikaliumhydrogenphosphat
K_3PO_4	Kaliumphosphat
k	Ratenkonstante allgemein
k_{app}	apparente (scheinbare) Ratenkonstante allgemein
K_a	Assoziationsgleichgewichtskonstante
k_{cat}	maximale Ratenkonstante bei mit zwei Substraten gesättigtem Enzym
$k_{cat,app}$	apparente Ratenkonstante bei mit einem Substrat gesättigtem Enzym
$\frac{k_{cat}}{K_M}$	katalytische Effizienz bei mit zwei Substraten gesättigtem Enzym
KCH_3COO	Kaliumacetat
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton (1kDa = 1000 $g \cdot mol^{-1}$)
K_d	Dissoziationsgleichgewichtskonstante
K_{eq}	Gleichgewichtskonstante allgemein
$K_{eq,\text{ freie Lösung}}$	Gleichgewichtskonstante in freier Lösung
$K_{eq,\text{ Enzym}}$	Gleichgewichtskonstante am Enzym
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
K_i	Inhibierungskonstante
kJ	Kilojoule
K_M	Michaelis-Konstante bei mit zwei Substraten gesättigtem Enzym
$K_{M,app}$	Michaelis-Konstante bei mit einem Substrat gesättigtem Enzym
$K_{m,i}$	Schmelzgleichgewichtskonstante der i-ten strukturellen Proteindomöne
KOH	Kaliumhydroxid
l	Länge
L	Ligand
LDH	Lactathedydrogenase
λ	Wellenlänge
Lys	L-Lysin
µM	Mikromolar
M	Molar
mA	Milliampère
mant-Gruppe	N-Methylanthraniloylgruppe
MES	2-(N-Morpholinoethan)sulfonsäure
Mg^{2+}	zweifach positiv geladenes Magnesiumion
MgADP	Magnesiumadenosin-5'-diphosphat

MgATP	Magnesiumadenosin-5’-triphosphat
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
min	Minuten
murin	Maus
MWCO	*moleclular weight cut off* (Ausschlußgröße bei der Proteinkonzentration)
n	Anzahl der pro Enzymmonomer gebundenen Nukleotidmoleküle
N	Stickstoff
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
NADP	Nicotinamidadenindinukleotid-phosphat, oxidierte Form
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotid-phosphat, reduzierte Form
NaOH	Natriumhydroxid
$(NH_4)_2SO_4$	Ammoniumsulfat
NDP	Nukleosiddiphosphat
NMP	Nukleosidmonophosphat
NTP	Nukleosidtriphosphat
nm	Nanometer
O	Sauerstoff
OD	optische Dichte
P	Produkt
P_2O_5	Diphosphorpentoxid
$P_{(\beta)}$-MABA-ADP	$P_{(\beta)}$-(N’-Methylanthraniloylaminobutyl)aminoadenosin-5’-diphosphat
$P_{(\beta)}$-MAHA-TDP	$P_{(\beta)}$-(N’-Methylanthraniloylaminohexyl)aminothymidin-5’-diphosphat
$P_{(\gamma)}$-MABA-ATP	$P_{(\gamma)}$-(N’-Methylanthraniloylaminobutyl)aminoadenosin-5’-triphosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvatkinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
$POCl_3$	Phosphorylchlorid
Q	Wärme
R	Universelle Gaskonstante (8.314 $J{\cdot}mol^{-1}{\cdot}K^{-1}$)
Rückwärtsreaktion	MgADP + NDP → MgATP + NMP
ΔS_B	Bindungsentropie
s	Sekunde
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Θ	Bindungsgrad
T	Temperatur
T_m	Schmelztemperatur
Tab	Tabelle
TBAB	Tetrabutylammoniumbromid
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N’,N’-Tetramethylethylendiamin
Thr	L-Threonin
TmpK	Thymidylatkinase
TP_5A	P^1-(5’-Thymidyl)-P^5-(5’adenosyl)pentaphosphat
TP_5A-mant	P^1-(5’-Thymidyl)-P^5-(5’adenosyl-(2’-3’-N-methylanthraniloyl))pentaphosphat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
TSP	Natrium-3-Trimethylsilyl-2,2,3,3-d_4-propionat
Tyr	L-Tyrosin
UmpK	Uridylatkinase
UP_5A	P^1-(5’-Uridyl)-P^5-(5’adenosyl)pentaphosphat
v	Reaktionsgeschwindigkeit
V	Volumen
ν	Verdünnungsfaktor
Vorwärtsreaktion	MgATP + NMP → MgADP + NDP
w/v	Masse pro Volumen (weight per volume)
wt	Wildtyp

8 Appendix

Im folgenden Kapitel sollen die Auswertungen von Messungen und die Herleitungen der verwendeten Gleichungen beschrieben werden. Zur besseren Übersicht soll zunächst noch einmal kurz beschrieben werden, welche Informationen man mit den verschiedenen Meßmethoden erhielt.

Die steady-state Messungen (Kapitel 8.1) ermöglichten die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für den ratenlimitierenden Schritt. Man erhielt eine „Gesamtgeschwindigkeitskonstante" k_{cat} und die Affinitäten der Nukleotide im ternären Komplex (K_M), so daß Aussagen über die katalytische Effizienz eines Proteins möglich wurden. Außerdem konnte bei einer Substratinhibierung die Inhibierungskonstante (K_i) berechnet werden. Die quenched-flow Messungen (Kapitel 8.2) schalteten die Produktfreisetzung als ratenlimitierenden Reaktionsschritt aus. Bei den untersuchten menschlichen Thymidylatkinasen konnten so die Geschwindigkeitskonstanten für die Konformationsänderungen, die zur offenen bzw. geschlossenen Enzymform führten, bestimmt werden. Mit den stopped-flow Messungen (Kapitel 8.3) wurde die Kinetik der Bindung von Fluorophoren an die menschliche wt-TmpK gemessen, woraus Informationen über den Bindungsmechanismus abgeleitet werden konnten. Verdrängungsexperimente ermöglichten mindestens die Abschätzung von Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten für Nichtfluorophore. In Gleichgewichtsmessungen konnte die Stärke einer Enzym-Ligand Wechselwirkung gemessen werden. Dazu wurden fluoreszenzspektroskopische (Kapitel 8.4) und kalorimetrische (Kapitel 8.5) Methoden verwendet. Bei der Equilibriumsfluoreszenzspektroskopie wurde mit Hilfe eines fluoreszierenden Liganden, der als Sonde diente, die Bindungsstärke für einen Nichtfluorophor bestimmt. Aus den Affinitäten im binären und ternären Komplex konnte die Kooperativität von Bindungsvorgängen bestimmt werden. Die isotherme kalorimetrische Titration (Kapitel 8.5) ermöglichte die direkte Messung der Affinität für Nichtfluorophore. Mit DSC-Experimenten (Kapitel 8.5) konnte die thermische Stabilität von Proteinen bestimmt werden. Außerdem ließen die Schmelzenthalpien Aussagen über die Kooperativität von Schmelzvorgängen zu.

8.1 Steady-state Messungen

8.1.1 Auswertung der steady-state Messungen („Replot-Methode”)

Nach Beendigung der Messung wurde die Anfangssteigung der erhaltenen Meßkurven (Abb. 53) bestimmt.

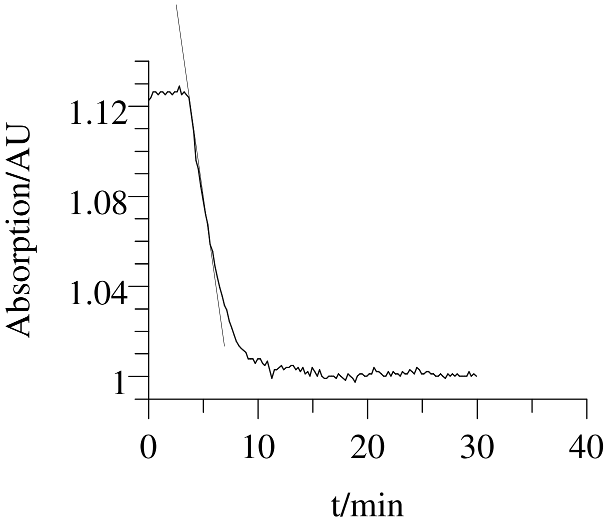


Abb. 53 Darstellung eines typischen steady-state Meßsignals für die Vorwärtsreaktion bei einer gegebenen MgATP-Konzentration (2 µM) und dTMP-Konzentration (10 µM): Nach der vollständigen Umsetzung des Nukleosidmonophosphats wurde keine Absorptionsänderung mehr beobachtet. Die Anfangssteigung in der Einheit min^{-1} wurde bestimmt und mit Gleichung 2 (Kapitel 2.2.7.1) in die für diese Kombination von Nukleotidkonzentrationen gültige Ratenkonstante k umgerechnet.

Für die Bestimmung der steady-state Parameter wurden für die Vorwärtsreaktion (Rückwärtsreaktion) sechs MgATP (MgADP) mit sechs NMP (NDP) Konzentrationen kombiniert („6x6-Matrix”). Zu jeder MgATP (MgADP) Konzentration und jeder NMP (NDP) Konzentration wurden so sechs, insgesamt also 36, k-Werte erhalten. Die Analyse dieser k-Werte mit der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 3, Kapitel 2.2.7.2) und dem Programm GraFit (Version 3.01, Erithacus Software, Staines, UK) lieferte dann die zu dieser Nukleotid-Konzentration gehörende apparente, katalytische Ratenkonstanten $k_{cat,app}$ sowie die apparente Michaelis-Konstante (Bindungskonstante für den ternären Komplex) $K_{M,app}$ (Abb. 54).

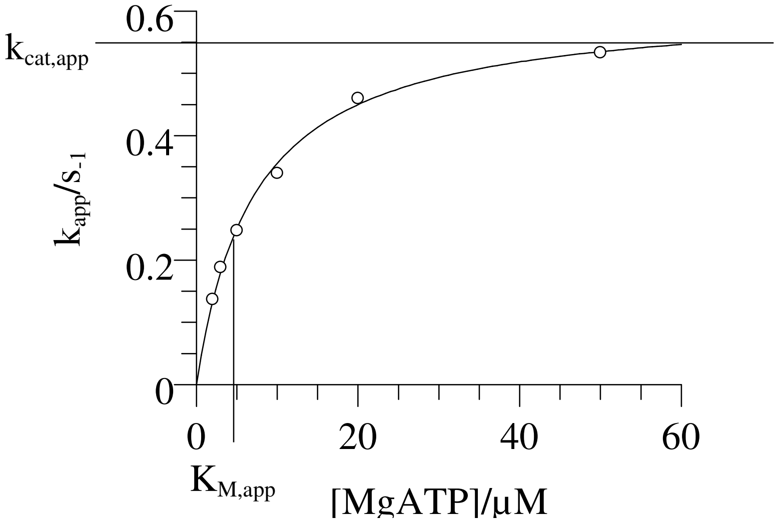


Abb. 54: Zu einer konstanten dTMP-Konzentration (50 µM) gehörten sechs apparente Ratenkonstanten (k_{app}) bei verschiedenen MgATP-Konzentrationen (2, 3, 5, 10, 20, 50 µM). Die Auswertung der k_{app}-Werte mit der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 3, Kapitel 2.2.7.2) lieferte einen apparenten $k_{cat,app}$-Wert und $K_{M,app}$-Wert für MgATP, die zu der vorgegebenen dTMP-Konzentration gehörten.

(Gl. 10)

$$K^{S_1}_{M,app} = K_{d,S_1} - \left(K_{d,S_1} - K_{M,S_1}\right) \cdot \frac{[S_2]}{[S_2] + \vartheta}$$

(Gl. 11)

$$K^{S_1}_{M,app} = K_{d,S_1} + \left(K_{M,S_1} - K_{d,S_1}\right) \cdot \frac{[S_2]}{[S_2] + \vartheta}$$

Die apparenten Raten- und Bindungskonstanten ($k_{cat,app}$ und $K_{M,app}$), die man so für ein Nukleotid erhielt (z. B. MgATP), konnten dann über der Konzentration des Nukleotids, dessen Konzentration konstant war (z. B. dTMP), aufgetragen werden (Abb. 55). Die erneute Anwendung der Michaelis-Menten-Gleichung auf die apparenten Ratenkonstanten lieferte den k_{cat}-Wert bei Sättigung des Enzyms mit beiden Substraten und den K_M-Wert für das Nukleotid im ternären Komplex. Die Auftragung der apparenten K_M-Werte für dieses Nukleotid ergab dann für unendliche Nukleotidkonzentrationen die Michaelis-Konstante K_M. Bei einer ausgeprägten Kooperativität konnten die Auftragungen der apparenten Michaeliskonstanten über einer Nukleotidkonzentration mit einer hyperbolischen Gleichung analysiert werden. Für synergistische Effekte gilt Gleichung 10, für antagonistische Gleichung 11, wobei

ϑ ein Korrekturfaktor für die hyperbolische Datenanalyse ist und die Krümmung der Kurve bestimmt.

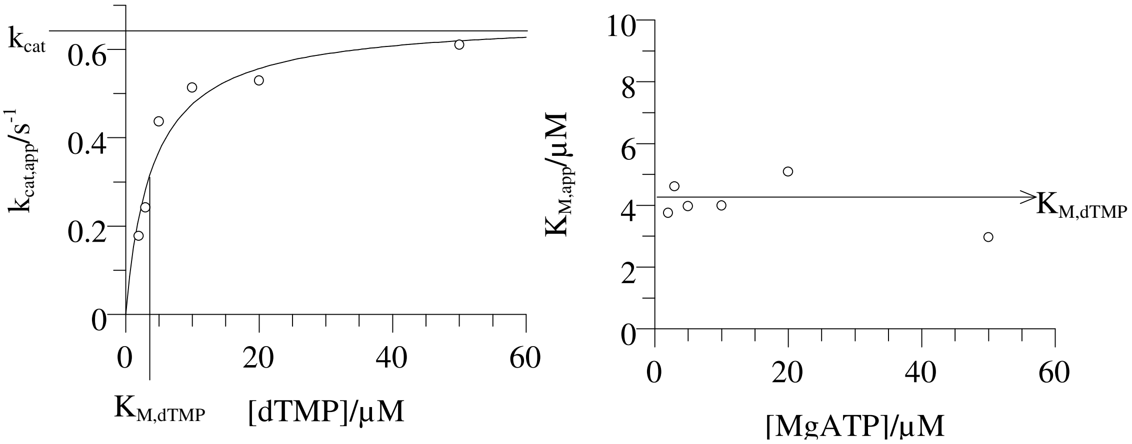


Abb. 55: Der linke Graph zeigt die Analyse der apparenten Ratenkonstanten $k_{cat,app}$. Zu den sechs dTMP-Konzentrationen gab es jeweils eine apparente Ratenkonstante. Die Extrapolation auf eine unendliche dTMP-Konzentration mit der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 3, Kapitel 2.2.7.2) ermöglichte dann die Bestimmung der maximalen Ratenkonstante bei Sättigung des Enzyms mit beiden Substraten (k_{cat}) und die der dTMP-Konzentration, bei der die Umsatzzahl halbmaximal war (K_M). Die apparenten Michaeliskonstanten ($K_{M,app}$) ergaben bei Extrapolation gegen unendliche MgATP-Konzentrationen ebenfalls die Konzentration von dTMP, bei der die Umsatzzahl halbmaximal war (rechter Graph). Bei ausgeprägten synergistischen oder antagonistischen Effekten konnte die Auftragung der apparenten Michaeliskonstanten hyperbolisch (Gleichungen 10 und 11) analysiert werden. In diesem Fall konnte der y-Achsenabschnitt als Bindungskonstante für den binären Komplex (hier TmpK-dTMP) und damit als K_d-Wert interpretiert werden.

Die steady-state kinetischen Konstanten wurden also durch doppelte Anwendung der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 3, Kapitel 2.2.7.2) erhalten. Bei der Ermittlung der apparenten maximalen Ratenkonstanten und Michaeliskonstanten ($k_{cat,app}$ und $K_{M,app}$) wurde die Sättigung des Enzyms mit einem Substrat berücksichtigt. Die Analyse der apparenten Raten-und Bindungskonstanten betrachtete dann die Sättigung des Enzyms mit dem zweiten Substrat (k_{cat} und K_M).

8.1.2 Analytische Michaelis-Menten-Gleichung

In diesem Abschnitt wird die Ableitung der analytischen Michaelis-Menten-Gleichung skizziert. Die einfachste enzymkatalysierte Reaktion beinhaltet die Substratbindung, die eigentliche Reaktion und die Produktdissoziation. Die Reaktionsfolge ist in Abbildung 56 dargestellt:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} EP \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} E{+}P$$

Abb 56: Das Substrat (S) bindet an das Enzym. Anschließend bildet sich der Enzym-Substrat-Komplex (ES), der durch die Reaktion in den Enzym-Produkt-Komplex (EP) übergeht. Danach dissoziiert das Produkt vom Enyzm, und es liegt wieder freies Enzym (E) und Produkt (P) vor. ES und EP werden als zentrale Komplexe bezeichnet.

Die experimentellen Randbedingungen werden so gewählt, daß drei vereinfachende Annahmen gemacht werden können:

1.) Zu Beginn der Reaktion liegt das Substrat in großem Überschuß vor ([S] » [E]) und kann somit als konstant betrachtet werden. Daher kann die lineare Anfangssteigung (Abb. 53) für diese Konzentrationen als maximale beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit angesehen werden.

2.) Das Produkt der Reaktion wird durch die experimentellen Bedingungen immer wieder aus dem Gleichgewicht entfernt, so daß die Reaktion des Produkts mit dem Enzym (k_{-3}) vernachlässigt werden kann.

3.) Durch den großen Überschuß des Substrats ([S] » [E]) können alle Differentialgleichungsterme, in denen die Änderung der Enzymkonzentration als Parameter steht, gleich 0 gesetzt werden (Bodenstein'sches Stationaritätsprinzip).

Das Differentialgleichungssystem (DGS) lautet:

(Gl. 12)
$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[ES] + k_3[EP] \overset{!}{=} 0$$

(Gl. 13)
$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[ES]$$

(Gl. 14) $$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] + k_{-2}[EP] \overset{!}{=} 0$$

(Gl. 15) $$\frac{d[EP]}{dt} = k_2[ES] - k_{-2}[EP] - k_3[EP] \overset{!}{=} 0$$

(Gl. 16) $$\frac{d[P]}{dt} = k_3[EP]$$

Die analytische Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 3, Kapitel 2.2.7.2) wird durch Auflösung dieses Differentialgleichungssystems (z. B. durch Gauß-Eliminierung) erhalten:

(Gl. 3) $$v_{app} = v_{max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

$$\text{mit } v_{app} = k_{app}[E]_0 \qquad \text{und } v_{max} = k_{cat}[E]_0$$

Die katalytische Ratenkonstante k_{cat} (Umsatzzahl bei Substratsättigung) ist definiert durch

(Gl. 17) $$k_{cat} = \frac{k_{+2}k_{+3}}{k_{+2} + k_{-2} + k_{+3}}$$

und für den K_M-Wert gilt die Beziehung:

(Gl. 18) $$K_M = \frac{k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_{+3} + k_{+2}k_{+3}}{k_{+1}(k_{+2} + k_{-2} + k_{+3})}$$

Streng genommen ist die vorangegangene Ableitung der Michaelis-Menten-Gleichung nur für ein unireaktantes System, d.h., ein System, bei dem das Enzym nur ein Substrat bindet, gültig. Für ein bireaktantes System wie TmpK führt eine ähnliche Betrachtung mit Hilfe der entsprechenden Differentialgleichungen zu der Gleichung 19:

(Gl. 19)
$$k_{app} = \frac{k_{cat}[S_1][S_2]}{\alpha K_{M,S1} K_{M,S2} + \alpha K_{M,S2}[S_1] + \alpha K_{M,S1}[S_2] + [S_1][S_2]}$$

α ist der Kooperativitätsfaktor, der den Einfluß des Substrats S_1 auf die Bindung des Substrats S_2 und umgekehrt beschreibt. Bei steady-state Experimenten mit einem bireaktanten Enzym wird die Konzentration eines Substrats (z. B. $[S_1]$) konstant gehalten, während die des anderen (z. B. $[S_2]$) variiert wird. Dadurch reduziert sich die Michaelis-Menten-Gleichung 19 für einen *random bi-bi* Mechanismus auf Gleichung 3. Dies soll im folgenden kurz dargestellt werden:

Zunächst wird Gleichung 19 durch $[S_1]$ gekürzt und umgestellt. Dies ergibt Gleichung 20:

(Gl. 20)
$$k_{app} = \frac{k_{cat}[S_2]}{\alpha K_{M,S2}\left(\frac{K_{M,S1}}{[S_1]} + 1\right) + [S_2]\left(\frac{\alpha K_{M,S1}}{[S_1]} + 1\right)}$$

Zähler und Nenner auf der rechten Seite der Gleichung werden durch $\frac{\alpha K_{M,S1}}{[S_1]} + 1$ gekürzt, es ergibt sich Gleichung 21:

(Gl. 21)
$$k_{app} = \frac{\overbrace{\frac{k_{cat}[S_1]}{\alpha K_{M,S1} + [S_1]}}^{k_{cat,app}}[S_2]}{\underbrace{\frac{\alpha[S_1]K_{M,S2}\left(\frac{K_{M,S1}}{[S_1]} + 1\right)}{\alpha K_{M,S1} + [S_1]}}_{K_{M,app}} + [S_2]}$$

Die mit Klammern gekennzeichneten Terme sind bei einer gegebenen Konzentration $[S_1]$ konstant und nach Umschreiben wird eine Gleichung (Gleichung 22) erhalten, die mit der analytischen Michaelis-Menten-Gleichung für ein Substrat identisch ist. Der einzige Unterschied ist, daß in der Gleichung 22 apparente Raten- und Bindungskonstanten stehen, die von der Konzentration $[S_1]$ abhängig sind.

(Gl. 22) $$k_{app} = k_{cat,app} \frac{[S_2]}{K_{M,app} + [S_2]}$$

8.1.3 Berechnung von Inhibierungskonstanten

Die Inhibierungskonstante K_i für ein Substrat (z. B. NMP) kann prinzipiell mit der Michaelis-Menten-Gleichung für einen *random bi-bi*-Mechanismus (Gl. 19) berechnet werden. Ist S_1 der Inhibitor, muß der K_M-Wert von S_2 mit einem Faktor multipliziert werden, der diese Inhibierung berücksichtigt. Dieser Faktor ist [112]

(Gl. 23) $$I = 1 + \frac{[S_1]}{K_{i,S1}}$$

K_i ist die Inhibierungskonstante, die die Stärke der Substratinhibierung beschreibt. Ist K_i klein, wird die Inhibierung schon bei kleinen S_1-Konzentrationen erreicht. Für steigende Substratkonzentrationen wird I damit schnell größer. Die Michaeliskonstante für das zweite Substrat erhöht sich um genau diesen Faktor I, was eine schlechtere Bindung des zweiten Substrats bedeutet. Bei einer sehr großen Inhibierungskonstante K_i ist der Zahlenwert des Faktors I praktisch 1. Die Bindung des zweiten Substrats wird kaum beeinflußt. Durch Multiplikation der K_M-Werte für das zweite Substrat ($K_{M,S2}$) in Gleichung 19 mit I ergibt sich:

(Gl. 24) $$k_{app} = \frac{k_{cat}[S_1][S_2]}{\alpha K_{M,S1} K_{M,S2}\left(1 + \frac{[S_1]}{K_{i,S1}}\right) + \alpha K_{M,S2}\left(1 + \frac{[S_1]}{K_{i,S1}}\right)[S_1] + \alpha K_{M,S1}[S_2] + [S_1][S_2]}$$

Ausklammern von $\alpha K_{M,S2}\left(1 + \frac{[S_1]}{K_{i,S1}}\right)$ und $[S_2]$ im Nenner liefert:

(Gl. 25) $$k_{app} = \frac{k_{cat}[S_1][S_2]}{\alpha K_{M,S2}\left(1 + \frac{[S_1]}{K_{i,S1}}\right)(K_{M,S1} + [S_1]) + [S_2](\alpha K_{M,S1} + [S_1])}$$

Die Michaelis-Menten-Gleichung 25 bei kompetitiver Inhibierung durch S_1 wurde als Scientist-Gleichungsdatei (Version 2.0, MicroMath Incorp., Salt Lake City, USA) geschrieben (Abb 57). Der Kooperativitätsfaktor α, der mit den erhaltenen Bindungsdaten für den binären und ternären Komplex berechnet werden konnte $\left(\alpha = \frac{K_{M,\text{Nukleotid}}}{K_{d,\text{Nukleotid}}}\right)$, wurde bei der Minimierungsprozedur konstant gehalten. Dadurch wurde die Zahl der Freiheitsgrade bei der Analyse der Daten um 1 vermindert, so daß die Anpassung der Parameter an die Datenpunkte besser wurde.

```
// NMP kinases substrate 1 is inhibitor
IndVars: S1,S2
DepVars: kobs
Params: Km1, Km2, Ki, kcat,alpha
kobs=(kcat*S1*S2)/(((alpha*Km2)*(1+(S1/Ki))*(Km1+S1))+(S2*((alpha*Km1)+S1)))
0<Km1
0<Km2
0<kcat
0<Ki
0<alpha
```

Abb 57: Scientist-Gleichungsdatei für die „global-fit"-Berechnung der Inhibierungskonstante K_i.

8.1.4 Nukleotidkonzentrationen in der Rückwärtsreaktion

Die Korrektur der Nukleotidkonzentrationen erfolgte mit der quadratischen Gleichung, die die Konzentration eines Komplexes in Abhängigkeit von den Konzentrationen und der Dissoziationskonstante angibt (Gleichung 26 bzw. 27).

(Gl. 26) $$[\text{MgADP}] = \frac{[\text{Mg}^{2+}]_0 + [\text{ADP}]_0 + 350\,\mu\text{M}}{2} \pm \sqrt{\frac{([\text{Mg}^{2+}]_0 + [\text{ADP}]_0 + 350\,\mu\text{M})^2}{4} - [\text{Mg}^{2+}]_0 \cdot [\text{ADP}]_0}$$

(Gl. 27) $$[\text{NDP}] = [\text{NDP}]_0 - [\text{MgNDP}] = [\text{NDP}]_0 - \frac{[\text{Mg}^{2+}]_0 + [\text{NDP}]_0 + 350\,\mu\text{M}}{2} \pm \sqrt{\frac{([\text{Mg}^{2+}]_0 + [\text{NDP}]_0 + 350\,\mu\text{M})^2}{4} - [\text{Mg}^{2+}]_0 \cdot [\text{NDP}]_0}$$

Die quadratische Gleichung ergibt sich durch Kombination der Massenerhaltung (Gl. 28) und des Massenwirkungsgesetzes (Gl. 29)

(Gl. 28) $$\begin{aligned}[\text{NDP}]_0 &= [\text{NDP}] + [\text{MgNDP}] \\ [\text{Mg}^{2+}]_0 &= [\text{Mg}^{2+}] + [\text{MgNDP}]\end{aligned}$$

(Gl. 29)
$$K_d = \frac{\left[Mg^{2+}\right] \cdot [NDP]}{[MgNDP]}$$

Einsetzen von Gl. 28 in Gl. 29 liefert dann:

(Gl. 30)
$$K_d = \frac{\left(\left[Mg^{2+}\right]_0 - [MgNDP]\right) \cdot \left([NDP]_0 - [MgNDP]\right)}{[MgNDP]}$$

Diese Gleichung kann zu einer quadratischen Gleichung umgeformt werden:

(Gl. 31)
$$[MgNDP]^2 - [MgNDP] \cdot \left(K_d + [Mg]_0 + [NDP]_0\right) + [Mg]_0 \cdot [NDP]_0 = 0$$

mit den beiden folgenden Lösungen für [MgNDP]:

(Gl. 32)
$$[MgNDP] = \frac{\left[Mg^{2+}\right]_0 + [NDP]_0 + K_d}{2} \pm \sqrt{\frac{\left(\left[Mg^{2+}\right]_0 + [NDP]_0 + K_d\right)^2}{4} - \left[Mg^{2+}\right]_0 \cdot [NDP]_0}$$

Nur die Gleichung mit dem negativen Vorzeichen vor der Wurzel ist physikalisch sinnvoll. Mit ihr kann die Konzentration von MgNDP berechnet werden.

8.1.5 Auswertung von steady-state Messungen mit dem DGS

Für die Überprüfung der Enzym-Nukleotid-Kombinationen, bei denen die steady-state Bedingungen, zumindest bei kleinen Nukleotidkonzentrationen, nicht erfüllt waren (Material und Methoden, Kapitel 2.2.7.2), wurde das DGS (Gleichungen 12 bis 16, Kapitel 8.1.2) in das Computerprogramm Scientist (Version 2.0, MicroMath Incorp., Salt Lake City, USA) eingegeben (Abb. 57). So konnte direkt die photometrische Originalmessung, also die Absorptionsänderung in Abhängigkeit von der Zeit, ausgewertet werden.

```
// MM-modell with differential equations
IndVars: t
DepVars:ODt, S, ES, P, E, EP
Params: k3, k1, k_1,k2,k_2, ODinit, Eo,So,ESo,Po,EPo
E'=-(k1*E*S)+(k_1*ES)+(k3*ES)
S'=-(k1*E*S)+(k_1*ES)
ES'=(k1*E*S)-(k_1*ES)-(k2*ES)+(k_2*EP)
EP'=(k2*ES)-(k_2*EP)-(k3*EP)
```

```
P’=(k3*EP)
ODt=ODinit-(P*0.00622)
//Parameter Values
k3=0.01
k1=.01
k_1=.05
k2=0.1
k_2=0.05
Eo=23.18
So=18.75
//Initial Values
t=0
E=Eo
S=So
ESo=0
ES=ESo
Po=0
P=Po
EPo=0
EP=EPo
//constraints
0<k3
0<k1
0<k_1
0<k2
0<k_2
0<ODinit
0<E<Eo
0<ES<Eo
0<S<So
0<P<So
0<Eo
0<So
0<Po
0<ESo
0<EP<Eo
0<EPo
```

Abb 57: Darstellung des DGS (Gleichungen 12 bis 16) für das Programm Scientist. Die optische Dichte zu Beginn der Messung sowie die Anfangskonzentrationen wurden während der Minimierungsprozedur konstant gehalten. Die Enzymkonzentration E_0 und die Konzentration des NMP/NDP (S_0) mußten entsprechend den Anfangsbedingungen variiert werden.

Die katalytische Ratenkonstante und die Michaelis-Konstante für NMP/NDP konnten dann mit den Gleichungen 17 und 18 berechnet werden.

8.1.6 Integrierte Michealis-Menten-Gleichung

Die integrierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung wird durch Integration der analytischen Gleichung erhalten:

(Gl. 3)
$$v_{app} = -\frac{d[S]}{dt} = v_{max}\frac{[S]}{K_M + [S]}$$

Eine Trennung der Variablen d[S] und dt sowie die Integration zwischen zwei beliebigen Zeitpunkten und den dazugehörigen Substratkonzentrationen führt zu Gleichung 33:

(Gl. 33)
$$v_{max}\int_{t_0}^{t} dt = -\int_{[S]_0}^{[S]_t}\frac{K_M + [S]}{[S]}d[S]$$

Der Term auf der rechten Gleichungsseite kann separiert werden,

(Gl. 34)
$$v_{max}\int_{t_0}^{t} dt = -K_M\int_{[S]_0}^{[S]_t}\frac{d[S]}{[S]} - \int_{[S]_0}^{[S]_t} d[S]$$

und nach Integration ergibt sich:

(Gl. 35)
$$v_{max}(t - t_0) = -K_M \ln\frac{[S]_t}{[S]_0} - ([S]_t - [S]_0)$$

Mit $\ln\frac{[S]_t}{[S]_0} = -\ln\frac{[S]_0}{[S]_t}$, $[S]_0 - [S]_t = [P]_t$, $v_{max} = k_{cat}[E]_0$ und $t_0 = 0$ lautet die integrierte Michaelis-Menten-Gleichung:

(Gl. 36)
$$k_{cat}[E]_0 t = K_M \ln\frac{[S]_0}{[S]_t} + [P]_t$$

Die Produktkonzentration kann leicht mit Hilfe der Absorptionsänderung und des Extinktionskoeffizienten der Nicotinamidadenindinukleotide ausgerechnet werden und als Scientist-Gleichungsdatei (Version 2.0, MicroMath Incorp., Salt Lake City, USA) geschrieben werden (Abb. 58).

(Gl. 37)
$$A_t = A_0 - [P]_t \cdot 0.00622\,\mu M^{-1}cm^{-1}$$

```
// Integrated Michaelis Menten Equation
IndVars: t
DepVars: ODt
Params: Km,kcat,ODinit,So,Eo
ODt=ODinit-Pt*0.00622
Km*(ln(So/(So-Pt)))+Pt=kcat*Eo*t
// parameter values and constraints
kcat=0.7
Km=10
ODinit=0.8
So=20
Eo=0.2
0<kcat
0<So
0<Pt<So
0<Km
0<ODinit<2
0<Eo
```

Abb 58: Scientist-Gleichungsdatei für die integrierte Michaelis-Menten-Gleichung.

8.2 Auswertung von quenched-flow Messungen

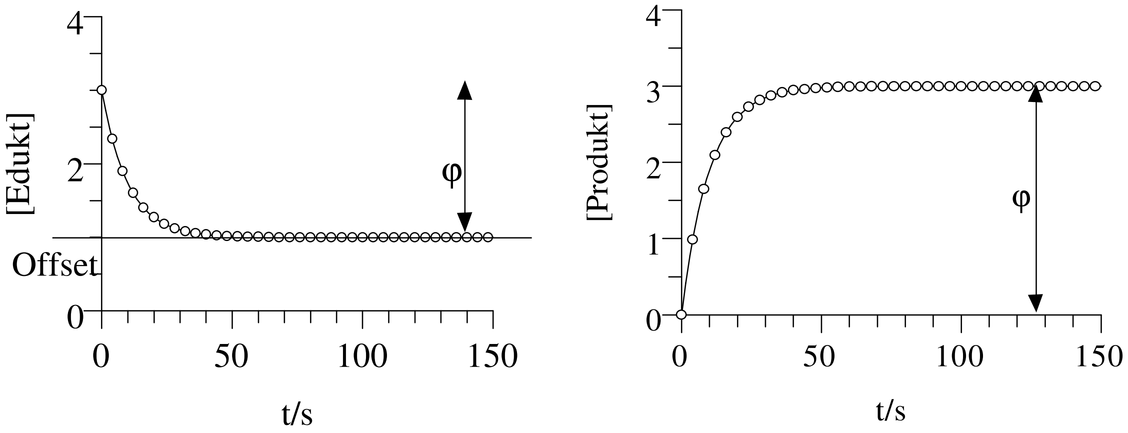


Abb. 59: Simulation des zeitlichen Verlaufs der Edukt- (links) und Produktkonzentration (rechts): Die Gleichung für die Edukte (Gl. 38) ist durch die drei Parameter Amplitude φ, Ratenkonstante k und den Minimalwert der Konzentration bei unendlicher Zeit (Offset) bestimmt. Die zeitliche Zunahme der Produktkonzentration (Gl. 39) wird durch die beiden Parameter Amplitude φ und Ratenkonstante k definiert

Die Konzentration von Eduktnukleotiden nimmt in quenched-flow Experimenten ab, die von Produktnukleotiden zu (Abb. 59). Deshalb sind zwei einfach exponentielle Gleichungen erforderlich: Mit der Gleichung 38 kann die Konzentration von Eduktnukleotiden und mit Gleichung 39 die von Produktnukleotiden analysiert werden.

Die Konzentration der Produkte zu Reaktionsbeginn ist 0, die entsprechende Gleichung muß also den Koordinatenursprung einschließen.

(Gl. 38) $$[\mathrm{Edukt}]_t = \varphi \cdot e^{-kt} + \mathrm{Offset}$$

(Gl. 39) $$[\mathrm{Produkt}]_t = \varphi \cdot \left(1 - e^{-kt}\right)$$

8.3 Auswertung von stopped-flow Messungen

Für die Einschrittbindung eines Liganden an ein Enzym gilt das in Abbildung 60 dargestellte Schema:

$$\mathrm{E} + \mathrm{L} \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}} \mathrm{EL}$$

Abb 60: Schematische Darstellung eines Einschrittbindungsmechanismus.

Wird als Ligand nun ein fluoreszierendes Nukleotid oder Bisubstratanalog verwendet, so wird die Konzentration dieses Signalgebers im stopped-flow Experiment konstant gehalten. Durch Variation der Enzymkonzentration erhält man ein Bindungssignal (Fluoreszenzzunahme), das für eine Einschrittbindung mit einer einfach exponentiellen Gleichung beschrieben werden kann. Dabei ist die beobachtete Ratenkonstante k_{app} abhängig von der Enzymkonzentration. Ist die Enzymkonzentration sehr viel größer als die Ligandenkonzentration ([E] » [L]], kann die Konzentration des freien Enzyms als nahezu konstant angesehen werden und in die Geschwindigkeitskonstante der Assoziationsreaktion k_{+1} eingerechnet werden, so daß sich eine Reaktion pseudo-erster Ordnung ergibt. Dann gilt näherungsweise:

$$\mathrm{L} \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}[\mathrm{E}]} \mathrm{EL}$$

Abb. 61: Reduzierung des Einschrittbindungsmechanismus auf eine Reaktion pseudo-erster Ordnung.

Mit $k_{+1}[E] = k$ ergeben sich folgende Geschwindigkeitsgesetze:

(Gl. 40)
$$\frac{d[L]}{dt} = -k[L] + k_{-1}[EL]$$

(Gl. 41)
$$\frac{d[EL]}{dt} = k[L] - k_{-1}[EL]$$

Die Gleichungen 40 und 41 können mit Hilfe einer Laplace-Transformation umgeformt werden. Es ergibt sich ein Ausdruck für [EL] in Anhängigkeit von der Zeit t:

(Gl. 42)
$$[EL] = \underbrace{[L]_0 \frac{k_{+1}[E]_0}{k_{+1}[E]_0 + k_{-1}}}_{\varphi} \left(1 - e^{-\overbrace{(k_{+1}[E]_0 + k_{-1})}^{k_{app}}t}\right)$$

Die Amplitude φ ist dabei genauso wie die beobachtete Ratenkonstante k_{app} ausschließlich von der Enzymkonzentration abhängig. Der Exponent der e-Funktion stellt eine Gerade mit folgender Gleichung dar:

(Gl. 43)
$$k_{app} = k_{+1}[E]_0 + k_{-1}$$

Bei der Auftragung der beobachteten Ratenkonstane k_{app} über der Enzymkonzentration $[E]_0$ kann bei einem Einschrittbindungsmechanismus also aus der Steigung der Geraden die Assoziationsratenkonstante k_{+1} und aus dem Achsenabschnitt die Dissoziationsratenkonstante k_{-1} berechnet werden. Die Gleichgewichtskonstante der Bindung eines Fluorophors an ein Enzym ist dann:

(Gl. 44)
$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

8.4 Auswertung von Gleichgewichtsmessungen

8.4.1 Bindung eines Enzyms an einen Fluorophor

Bei der Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten für die Bindung eines Enzyms an einen Fluorophor wird der fluoreszierende Ligand vorgelegt. Die Konzentration des Enzyms wird schrittweise erhöht und die Fluoreszenzzunahme gemessen. Die quadratische Gleichung für die Komplexbildung wurde schon abgeleitet (Gl. 32, Kapitel 8.1.). Jetzt muß nur noch die Meßgröße - die Zunahme der Fluoreszenzemission - zum Bindungsgrad $[EL]/[L]_0$ in Bezug gesetzt werden, weil davon die Fluoreszenzausbeute abhängt. Die Fluoreszenzzunahme ΔF pro Meßschritt ist proportional zum Bindungsgrad, wobei die Proportionalitätskonstante die Fluoreszenzzunahme ΔF_{max} ist, die bei Sättigung (Bindungsgrad = 1) gemessen wird (Gl. 45):

(Gl. 45)
$$\Delta F = \Delta F_{max} \frac{[EL]}{[L]_0}$$

Die gemessene Gesamtfluoreszenz bei jedem Meßschritt (F) setzt sich additiv aus der Grundfluoreszenz des freien fluoreszierenden Liganden (F_0) und der Fluoreszenzänderung bei jedem Meßschritt (ΔF) zusammen. Berücksichtigt man noch, daß ΔF_{max} die Differenz aus der Sättigungsfluoreszenz F_{max} und der Grundfluoreszenz ist, gilt Gleichung 46:

(Gl. 46)
$$F = F_0 + \Delta F = F_0 + \Delta F_{max} \frac{[EL]}{[L]_0} = F_0 + (F_{max} - F_0)\frac{[EL]}{[L]_0}$$

Formt man diese Gleichung nach [EL] um und setzt den erhaltenen Ausdruck in die quadratische Gleichung für die Komplexbildung ein, ergibt sich Gleichung 6 (Kapitel 2.2.9.1)

(Gl. 6)
$$F = F_0 + (F_{max} - F_0)\frac{\frac{[E]_0 + [L]_0 + K_d}{2} \pm \sqrt{\frac{([E]_0 + [L]_0 + K_d)^2}{4} - [E]_0 \cdot [L]_0}}{[L]_0}$$

8.4.2 Kompetitive Verdrängung eines Fluorophors

$$E + L_1 \rightleftharpoons EL_1 \qquad E + L_2 \rightleftharpoons EL_2$$

Abb 62: Schema für einen kompetitiven Verdrängungsmechanismus.

Die Abbildung 62 beschreibt ein System, bei dem zwei Liganden L_1 und L_2 um dieselbe Bindungsstelle eines Enzyms konkurrieren.

Die Gleichgewichtskonstanten für die beiden Reaktionen sind

(Gl. 47) $$K_{d,1} = \frac{[E][L_1]}{[EL_1]} \quad \text{und} \quad K_{d,2} = \frac{[E][L_2]}{[EL_2]},$$

wobei L_1 der fluoreszierende Ligand sei. Zur Auswertung der experimentellen Daten wird, wie bei der Bindung eines Enzyms an einen Fluorophor, ein expliziter Ausdruck für $[EL_1]$ benötigt. Unter Berücksichtigung der Massenerhaltung ergibt sich:

(Gl. 48) $$[E]_0 = [E] + [EL_1] + [EL_2]$$

(Gl. 49) $$[L_1]_0 = [L_1] + [EL_1]$$

(Gl. 50) $$[L_2]_0 = [L_2] + [EL_2]$$

Die Gleichungen 48 bis 50 führen mit den Dissoziationskonstanten aus Gleichung 47 zu einem Polynom dritten Grades der Form

(Gl. 51) $$[EL_1]^3 + a_1 [EL_1]^2 + a_2 [EL_1] + a_3 = 0$$

mit folgenden Koeffizienten a_1, a_2 und a_3

(Gl. 52) $$a_1 = \frac{[E]_0 (K_{d,2} - K_{d,1}) + [L_1]_0 (2K_{d,2} - K_{d,1}) + [L_2]_0 K_{d,1} - K_{d,1}^2 + K_{d,1}K_{d,2}}{K_{d,1} - K_{d,2}}$$

(Gl. 53) $$a_2 = \frac{[E]_0 [L_1]_0 (K_{d,1} - 2K_{d,2}) - [L_1]_0^2 K_{d,2} - [L_1]_0 K_{d,1} ([L_2]_0 + K_{d,2})}{K_{d,1} - K_{d,2}}$$

(Gl. 54) $$a_3 = \frac{[E]_0 [L_1]_0^2 K_{d,2}}{K_{d,1} - K_{d,2}}$$

Dieses Polynom dritten Grades hat drei Lösungen. Nach Einführung der folgenden Definitionen

(Gl. 55) $$Q \equiv \frac{a_1^2 + 3a_2}{9} \quad \text{und} \quad R \equiv \frac{2a_1^3 - 9a_1a_2 + 27a_3}{54}$$

müssen zwei Fälle unterschieden werden. Ist Q^3-$R^2 \geq 0$, ergeben sich mit folgender Definition

(Gl. 56) $$\Phi = \arccos\left(\frac{R}{\sqrt{Q^3}}\right)$$

die drei Lösungen der kubischen Gleichung zu

(Gl. 57) $$[EL_1]_1 = -2\sqrt{Q}\cos\left(\frac{\Phi}{3}\right) - \frac{a_1}{3}$$

(Gl. 58) $$[EL_1]_2 = -2\sqrt{Q}\cos\left(\frac{\Phi + 2\pi}{3}\right) - \frac{a_1}{3}$$

(Gl. 59) $$[EL_1]_3 = -2\sqrt{Q}\cos\left(\frac{\Phi + 4\pi}{3}\right) - \frac{a_1}{3}.$$

Für den Fall Q^3-$R^2 \leq 0$ existiert nur eine Lösung:

(Gl. 60) $$[EL_1] = -\mathrm{sign}(R)\left(\left(\sqrt{R^2 - Q^3} + |R|\right)^{\frac{1}{3}} + \frac{Q}{\left(\sqrt{R^2 - Q^3} + |R|\right)^{\frac{1}{3}}}\right) - \frac{a_1}{3}$$

8.5 Kalorimetrische Messungen

8.5.1 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Bei der isothermen kalorimetrischen Titration wird die Wärmeänderung während eines Bindungsprozesses gemessen. Diese Wärmeänderung ist über Gleichung 7, deren Ableitung beschrieben werden soll, mit der Assoziationsgleichgewichtskonstanten K_a, der Anzahl aktiver Ligandenbindungsstellen des Enzyms n und der molaren Ligandenbindungsenthalpie ΔH_B verknüpft.

In Abbildung 60 ist die Bindung eines Liganden an ein Enzym dargestellt. Die Assoziationsgleichgewichtskonstante für diese Bindung ist:

(Gl. 61)
$$K_a = \frac{[EL]}{[E][L]} = \frac{[EL]}{([E]_0 - [EL])[L]}$$

Nach Definition eines Bindungsgrads Θ mit

(Gl. 62)
$$\Theta = \frac{[EL]}{[E]_0}$$

kann die Gleichung 62 nach [EL] aufgelöst werden und in Gleichung 61 eingesetzt werden:

(Gl. 63)
$$K_a = \frac{\Theta}{(1-\Theta)[L]}$$

Für den Liganden L kann eine Massenbilanz unter Berücksichtigung der Zahl der aktiven Ligandenbindungsstellen n des Enzyms aufgestellt werden:

(Gl. 64)
$$[L]_0 = [L] + n[EL] = [L] + n\,\Theta\,E_0$$

Auflösung der Gleichungen 63 und 64 nach [L] auf und Gleichsetzen führt zu einer quadratischen Gleichung in Θ (Gl. 65):

(Gl. 65) $$\Theta^2 - \Theta\left(1 + \frac{[L]_0}{n[E]_0} + \frac{1}{n[E]_0 K_a}\right) + \frac{[L]_0}{n[E]_0} = 0$$

Die bei der Bindung gemessene Wärme Q ist proportional zur Stoffmenge des Makromoleküls ($[E]_0 \cdot V$) in der Meßzelle, wobei die Proportionalitätsfaktoren die molare Bindungsenthalpie ΔH_B, der Bindungsgrad Θ und die Anzahl der Ligandenbindungsstellen n sind (Gl. 66):

(Gl. 66) $$Q = n \cdot \Theta \cdot \Delta H_B \cdot [E]_0 \cdot V$$

Durch Auflösen der quadratischen Gleichung 65 nach dem Bindungsgrad Θ und Einsetzen in Gleichung 66 ergibt sich Gleichung 7:

(Gl. 7) $$Q = \frac{n \cdot [E] \cdot \Delta H_B \cdot V}{2} \cdot \left(1 + \frac{[L]}{n \cdot [E]} + \frac{1}{n \cdot K_a \cdot [E]} - \sqrt{\left(1 + \frac{[L]}{n \cdot [E]} + \frac{1}{n \cdot K_a \cdot [E]}\right)^2 - \frac{4 \cdot [L]}{n \cdot [E]}}\right)$$

K_a, ΔH_B und n können iterativ an die Daten der kalorimetrischen Messung angepaßt werden. Mit Hilfe von K_a kann auch die freie Bindungsenergie ΔG_B (Gibbs-Energie) berechnet werden (Gl. 67):

(Gl. 67) $$\Delta G_B = -RT \ln K_a$$

Mit ΔG_B und ΔH_B kann schließlich die Bindungsentropie berechnet werden (Gl. 68):

(Gl. 68) $$\Delta S_B = -\frac{\Delta G_B - \Delta H_B}{T}$$

Die Dissoziationskonstante K_d des Bindungsprozesses ist letztlich gegeben als der Kehrwert der Assoziationskonstanten K_a (Gl. 69):

(Gl. 69) $$K_d = \frac{1}{K_a}$$

8.5.2 Differential scanning calorimetry (DSC)

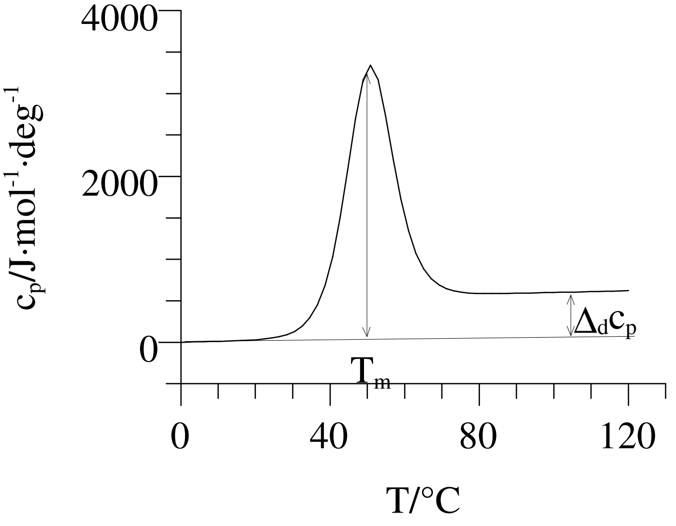


Abb 63: Darstellung einer simulierten DSC-Schmelzkurve: T_m gibt die Schmelztemperatur an, die aufgrund der Asymmetrie der Schmelzkurve nicht identisch ist mit der Temperatur, bei der die maximale Wärmeabsorption auftritt. $\Delta_d c_p$ ist die Schmelzwärmekapazität. Die Fläche unter dem Schmelzpeak beschreibt die gesamte kalorimetrische Enthalpie der Denaturierung, während das Produkt aus der Peakhöhe bei einer bestimmten Temperatur (z. B. T_m) und der entsprechenden Temperatur die van't Hoff'sche Enthalpie angibt.

Für Thymidylatkinasen wurde ein „Mehrübergangsmodell" (*non-two-state transition* Modell) ohne Änderung der Wärmekapazität ($\Delta_d c_p = 0$) bei dem Schmelzübergang für die thermisch induzierte Denaturierung zugrundegelegt. Nur für einige kleine globuläre Proteine kann ein „Zweiübergangsmodell" (*two-state transition* Modell) angenommen werden, welches das gesamte Protein als ein einheitliches, kooperatives System betrachtet [137, 138]. Die Ableitung der Gleichungen, die ein solches „Mehrübergangsmodell" iterativ beschreiben, soll skizziert werden.

Besteht ein Protein aus mehreren strukturellen Domänen A, B, C usw., die alle unabhängig voneinander vom gefalteten (A, B, C usw.) in den entfalteten (A', B', C' usw.) Zustand übergehen, kann die Gleichgewichtskonstante $K_{m,i}$ für den Schmelzübergang jeder Domäne durch das molare Verhältnis des entfalteten ($f_{A'}$) und des gefalteten Anteils (f_A) an der Gesamtproteinkonzentration beschrieben werden:

(Gl. 70) $$K_{m,A} = \frac{f_{A'}}{f_A}; K_{m,B} = \frac{f_{B'}}{f_B}; K_{m,C} = \frac{f_{C'}}{f_C} \text{ usw.}$$

Die Enthalpie ist eine extensive Größe, so daß die gesamte kalorimetrische molare Schmelzenthalpie für dieses System dann als die Summe aller kalorimetrischen Enthalpien der schon entfalteten Anteile der einzelnen Domänen gegeben ist:

(Gl. 71) $$H^c_m = H^c_N + f_{A'} \Delta H^c_{m,A} + f_{B'} \Delta H^c_{m,B} + \ldots$$

Der erste Term H^c_N bedeutet die Enthalpie des nativen Proteins, der berücksichtigt werden muß, weil alle Enthalpieänderungen ΔH^c_m relativ zum nativen gefalteten Protein gemessen werden. Durch Ableitung der Gleichung 71 nach der Temperatur berechnet sich die molare Wärmekapazität $c_{p,m}$ des Systems (Gl. 72)

(Gl. 72) $$c_{p,m} = \left(\frac{dH^c_m}{dT}\right)_p = \left(\frac{dH^c_{m,N}}{dT}\right) + \left(\frac{d\left(f_{A'} \Delta H^c_{m,A}\right)}{dT}\right) + \ldots = c_{p,m,N} + \left[f_{A'} \Delta c_{p,m,A} + \Delta H^c_{m,A}\left(\frac{df_{A'}}{dT}\right)\right] + \ldots$$

Wird nun berücksichtigt, daß $f_A = 1 - f_{A'}$ gilt, ergibt sich mit der Definition der Gleichgewichtskonstante aus Gleichung 70:

(Gl. 73) $$f_{A'} = \frac{K_{m,A}}{1 + K_{m,A}}$$

Die Ableitung von Gleichung 73 nach der Temperatur und Erweiterung mit $K_{m,A}$ liefert:

(Gl. 74) $$\left(\frac{df_{A'}}{dT}\right) = \frac{1}{\left(1 + K_{m,A}\right)^2}\left(\frac{dK_{m,A}}{dT}\right) = \frac{K_{m,A}}{\left(1 + K_{m,A}\right)^2}\left(\frac{dK_{m,A}}{K_{m,A}dT}\right) = \frac{K_{m,A}}{\left(1 + K_{m,A}\right)^2}\left(\frac{d\ln K_{m,A}}{dT}\right)$$

Die Ableitung auf der rechten Seite der Gleichung ist aus der elementaren Thermodynamik als „van't Hoff'sche Gleichung" bekannt:

(Gl. 75) $$\left(\frac{d\ln K_{m,A}}{dT}\right) = \frac{\Delta H^v_{m,A}}{RT^2}$$

Das Einsetzen der Gleichungen 73 bis 75 in Gleichung 72 ergibt dann die sowohl für das Zweiübergangsmodell als auch für das Mehrübergangsmodell gültige Gleichung 76, wenn alle Parameter bei derselben Temperatur bestimmt werden.

(Gl. 76) $$c_{p,m} = c_{p,N} + \left[\frac{K_{m,A} \Delta c_{p,m,A}}{1 + K_{m,A}} + \frac{K_{m,A} \Delta H^{v}_{m,A} \Delta H^{c}_{m,A}}{\left(1 + K_{m,A}\right)^2 RT^2} \right] + \ldots$$

Die Annahme, daß sich die Wärmekapazitäten des nativen und des entfalteten Proteins nicht unterscheiden, führt dazu, daß auf der rechten Seite der Gleichung alle Terme, in denen die Wärmekapazität auftritt, gleich 0 gesetzt werden können. Die zusätzliche Berücksichtigung der Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstante ergibt Gleichung 8:

(Gl. 8) $$c_{p,m}(T) = \sum_{i=A}^{Z} \frac{K_{m,i}(T) \Delta H^{v}_{m,i} H^{c}_{m,i}}{\left(1 + K_{m,i}(T)\right)^2 RT^2}$$

Die Gleichgewichtskonstante $K_{m,i}$ (Gl. 9) berechnet sich nach Variablentrennung durch Integration der van't Hoff'schen Gleichung 75 von einer beliebigen Temperatur T bis zur Schmelztemperatur T_m auf der einen Seite und den zugehörigen Schmelzgleichgewichtskonstanten $K_{m,i}$ und 1 auf der anderen Seite der Gleichung. Die zu T_m gehörende Schmelzgleichgewichtskonstante ist 1, weil bei Erreichen der Schmelztemperatur der Anteil von gefaltetem und entfaltetem Protein gleich ist:

(Gl. 9) $$K_{m,i}(T) = e^{\left(\frac{-\Delta H^{v}_{m,i}}{RT} \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) \right)}$$

Wichtig ist die Unterscheidung zwischen der molaren kalorimetrischen und der molaren van't Hoff'schen Enthalpieänderung. Die molare kalorimetrische Enthalpieänderung ist die Gesamtenthalpieänderung des Schmelzprozesses, die durch die Fläche unter dem auf die Proteinkonzentration normalisierten Schmelzpeak (Abb. 63) gegeben ist. Die molare van't Hoff'sche Enthalpie ist die bei einer gegebenen Temperatur absorbierte molare Wärme (z.B. bei der Schmelztemperatur das Produkt $\Delta c_p(T_m) \cdot T_m$) und damit ein direktes Maß für die temperaturinduzierte Reaktion.

8.6 Gleichgewichtskonstante für den Phosphoryltransfer

Die kinetischen Daten aller menschlichen TmpK-Mutanten konnten mit einem minimalen Reaktionsschema, das die notwendigen Konformationsänderungen und den chemischen Schritt enthält (Abb. 64), beschrieben werden. Für die Gleichgewichtskonstanten gilt:

(Gl. 78) $$K_{eq,iso1} = \frac{[A]}{[B]} = \frac{k_{iso-1}}{k_{iso1}} \; ; \; K_{eq,iso2} = \frac{[C]}{[D]} = \frac{k_{iso-2}}{k_{iso2}} \; ; \; K_C = \frac{[B]}{[C]} = \frac{k_{-c}}{k_c}$$

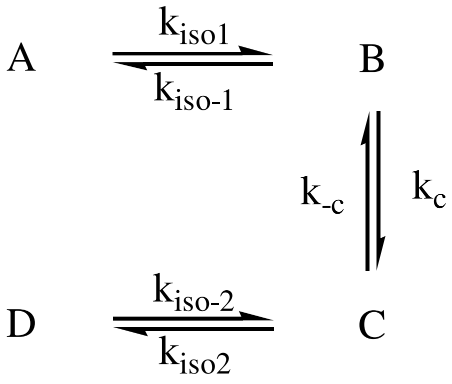


Abb. 64: Das minimale kinetische Reaktionsschema einer NMP-Kinase umfaßt vier Zustände: A und D sind die offenen, inaktiven Konformationen, B und C die geschlossenen, aktiven Konformationen. Alle vier Zustände haben Substrat gebunden. Zwischen den Zuständen A und B bzw. C und D finden jeweils reversible Konformationsänderungen statt, der eigentliche chemische Schritt liegt zwischen B und C.

Bei der Bestimmung der enzymatischen Gleichgewichtskonstante konnte nicht zwischen den einzelnen Konformationszuständen, sondern nur zwischen den Nukleotidzuständen unterschieden werden. A und B bzw. C und D haben dieselben Nukleotide gebunden (A und B MgATP und NMP bzw. C und D MgADP und NDP). Die Analyse der Nukleotidkonzentrationen am Enzym liefert somit die Summen der Konzentrationen von A und B bzw. C und D.

(Gl. 79) $$K_{eq,Enzym} = \frac{[A]+[B]}{[C]+[D]}$$

Mit Hilfe der Gleichgewichtskonstanten für die Konformationsänderungen ist:

(Gl. 80) $$[A]+[B]=[B]K_{eq,iso1}+[B] \quad \text{und} \quad [C]+[D]=[C]+\frac{[C]}{K_{eq,iso2}}$$

Einsetzen von Gleichung 80 in Gleichung 79 führt zu:

(Gl. 81) $$K_{eq,Enzym}=\frac{[A]+[B]}{[C]+[D]}=\frac{[B]K_{eq,iso1}+[B]}{[C]+\frac{[C]}{K_{eq,iso2}}}=\frac{[B](1+K_{eq,iso1})}{[C]\left(1+\frac{1}{K_{eq,iso2}}\right)}$$

Wird noch berücksichtigt, daß $\frac{[B]}{[C]}=K_C$ ist, kann Gleichung 81 nach K_C umgeformt werden:

(Gl. 82) $$K_C=K_{eq,Enzym}\cdot\frac{1+\frac{1}{K_{eq,iso2}}}{1+K_{eq,iso1}}$$

8.7 Bindungsverhalten eines Bisubstratanalogs

Die freie Bindungsenergie (ΔG_B) eines Bisubstratanalogs (z. B. TP_5A), das aus zwei Nukleotidteilen (ATP und dTMP) besteht, ergibt sich nicht additiv aus der freien Bindungsenergie der Einzelkomponenten. Die resultierende Dimension der Assoziationskonstante K_A wäre M^{-2}, was für die Bindungskonstante eines Liganden keinen physikalischen Sinn hat. Der thermodynamische Grund für die Unzulässigkeit dieses Ansatzes ist, daß zusätzlich zu den freien Bindungsenergien der Einzelkomponenten noch der energetische Beitrag des Linkers (Phosphatkette) berücksichtigt werden muß [98]. Um die Assoziationskonstante für ein ideales Bisubstratanalog zumindest abschätzen zu können, wurde ein Ansatz übernommen, der für die Bindung des zweiköpfigen Myosins an Aktin-Filamente vorgestellt wurde [169]. Unter der Annahme, daß zunächst ein Teil des Bisubstratanalogs mit der Affinitätskonstante des freien Nukleotids an das Enzym bindet und im zweiten Schritt der andere Teil des Analogs mit einer Gleichgewichtskonstante, die sich aus dem Produkt der Affinitätskonstante des freien Nukleotids und der effektiven Konzentration dieses Nukleotids berechnet, ergibt sich das in Abbildung 65 gezeigte Modell:

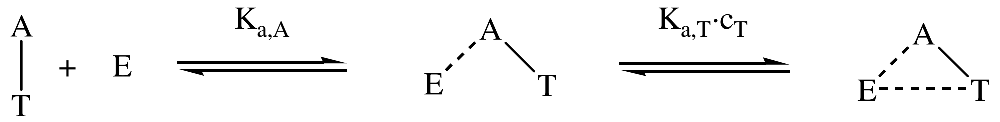
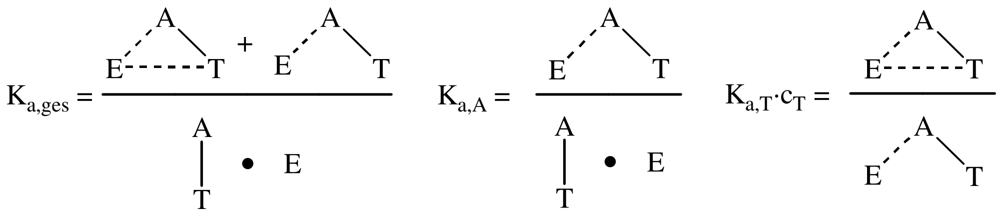


Abb. 65: Bindung von TP_5A (T▬A) an TmpK (E). $K_{a,A}$ ist die Assoziationskonstante von MgATP, $K_{a,T}$ die von dTMP und c_T ist die effektive Konzentration des T-Anteils von TP_5A. Durchgezogene Linien bedeuten kovalente, gestrichelte Linien nicht kovalente Bindungen.

Für die Assoziationskonstanten gilt:

(Gl. 83)



Durch Einsetzen von $K_{a,A}$ und $(K_{a,T}\cdot c_T)$ in $K_{a,ges}$ erhält man die Assoziationskonstante für die Bindung von TP_5A an TmpK (Gl. 84):

(Gl. 84)
$$K_{a,ges} = K_{a,A} \cdot \left(1 + K_{a,T} \cdot c_T\right)$$

Für die Berechung der effektiven T-Konzentration wurde ein Modell übernommen, bei dem eine funktionelle Komponente (z. B. A) des Bisubstratanalogs am Protein gebunden ist, während sich die zweite funktionelle Komponente (T) innerhalb eines Raumelements (Viertelkugel) befindet, dessen Volumen durch die halbe Länge r des Analogs bestimmt wird [170]. Mit Hilfe der Stoffmenge (n_T) der Komponente T, der Avogadrozahl N_{Av} und dem Volumen einer Viertelkugel (V) ergibt sich:

(Gl. 85)
$$c_T = \frac{n_T}{V} = \frac{\frac{N_T}{N_{Av}}}{\frac{1}{3}\pi r^3} = \frac{3N_T}{N_{Av}\pi r^3}$$

Die Anzahl N_T der T-Komponente in dieser Viertelkugel ist $N_T = 1$ und die nach Bindungswinkeln und -längen abgeschätzte halbe Länge r von AP_5A beträgt etwa 16 Å [170]. Diese halbe Länge wurde in guter Näherung für TP_5A übernommen, so daß sich eine effektive T-Konzentration $c_T = 0.387\cdot M$ und $K_d \approx 1$ nM ergibt.

Ich danke…

Prof. Dr. Roger S. Goody für die Aufnahme in seine Abteilung, die Übernahme des Erstgutachtens sowie die stets effektive Unterstützung meiner Arbeit.

Prof. Dr. W. Kreiser für die Übernahme des Zweitgutachtens und die stets wohlwollende Begleitung während des Studiums, der Diplomarbeit und der Promotion.

herzlich Dr. Joachim Reinstein für die Überlassung des sehr interessanten Themas und die hervorragende Betreuung. Sein stete Unterstützung und das Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie unzählige Tips, Tricks und Erklärungen in Sachen Kinetik haben mir als einem Doktoranden, der nur die Chemie kannte, sehr geholfen, „über den Tellerrand zu sehen“, was eine außerordentlich gute Erfahrung war.

Dr. Ralf Brundiers und Dr. Manfred Konrad vom MPI für physikalische Chemie in Göttingen für die bereitwillige Überlassung der nach vielen Versuchen erhaltenen TmpK-Klone, die eine Voraussetzung für das Gelingen dieser Arbeit waren, und deren Bereitschaft, mir eine kurze dreiwöchige Einführung in die Molekularbiologie zu geben.

herzlich meinen Gruppenkollegen - den ehemaligen und noch existierenden - Petra Herde, Yvonne Grömping, Sandra Schlee, Gina Dumitru und Lars Packschies für die gute Arbeitsatmosphäre und das bereitwillige Korrekturlesen. Besonderer Dank geht an Petra Herde für die Unterstützung bei kinetischen Messungen.

herzlich meinen Freunden The Hiep Nguyen und Dr. Frank Sobotka für die mittlerweile leider viel zu selten gewordenen Treffen und Telefonate aufgrund der doch durch verschiedene Gründe drastisch reduzierten wirklich freien Zeit, was der Freundschaft über Jahre hinweg aber keinen Abbruch getan hat.

sehr meiner Frau Natalja für Ihr ständiges Verständnis, wenn es „mal wieder ein bißchen später wurde“ und ihre Unterstützung, sowie meinem Sohn Julian für sehr viele sonnige und lustige Momente und dafür, daß mir bei der Beobachtung seiner Entwicklung stets bewußt wurde, warum sich „dieser ganze Zirkus“ über 9 Jahre hinweg trotz immer wieder aufkommender Zweifel am Ende doch gelohnt hat;

vergessen möchte ich an dieser Stelle nicht unser zweites Kind, das zu dem Zeitpunkt, zu dem diese Zeilen geschrieben wurden, zwar noch nicht geboren war, aber doch Papa „schon auf Trab gebracht hat“ und ihn dazu ermunterte, schnell und zügig mit der Arbeit fertig zu werden.

meiner Mutter, die mich nach zwischenzeitlich schwierigen zwischenmenschlichen Beziehungen gerade mit der Beseitigung dieser Schwierigkeiten sehr unterstützt hat und ganz ganz herzlich Onkel Horst, der nach dem Tode meines Vaters wie ein Vater zu mir war und mich in allem nur Denk- und Undenkbaren unterstützt hat, wobei ich eine Erinnerung an meinen Papa nicht vergessen möchte.

Onkel Viktor, Onkel Arnold, Onkel Arthur, (Schwieger)mama, Josef, Oma und und und… für die Unterstützung und dafür, daß ich auch während der stressigen Zeit nie das Wesentliche aus den Augen verloren habe: Entspannen und Abschalten sind genau so wichtig wie zügiges Arbeiten - in diesem Sinne давай поехали.

Lebenslauf

Name:	VEIT, Thomas Jürgen Holger
geboren:	19. Juni 1970 in Duisburg-Meiderich
Familienstand:	verheiratet, 1 Kind
1976 - 1980	Kastellgrundschule in Oberhausen
1980 - 1989	Sophie-Scholl-Gymnasium in Oberhausen
1989	Abitur
1989 - 1991	Zivildienst
1991 - 1997	Chemiestudium an der Universität Dortmund
Oktober 1993	Diplomvorprüfung in Chemie
Januar 1996	Diplomhauptprüfung
5.1996 - 3.1997	Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund; Diplomarbeit: Synthese des fluoreszierenden Nukleotid-analogons 8-(N'-Methylanthraniloylaminobutyl)amino-adenosin-5'-phosphat und Charakterisierung der Nukleotidbindungstasche des molekularen Chaperons DnaK aus *E. coli* (Betreuer: Prof. Dr. W. Kreiser, Dr. J. Reinstein, Prof. Dr. R. S. Goody)
8.1997 - 8.2000	Promotion am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund