

**Polyamine:**  
**Modulatoren der Protein-Protein-Wechselwirkungen**  
**im CYP11A1-abhängigen Steroidhydroxylase-System**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III  
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften  
der Universität des Saarlandes

von  
Frau Dipl. Chem. Anja Berwanger

Saarbrücken  
2009

Tag des Kolloquiums:	05. Juni 2009
Dekan:	Prof. Dr. S. Diebels
Berichterstatter:	
Vorsitzender:	Prof. Dr. M. Springborg
Gutachter:	Prof. Dr. R. Bernhardt
	Prof. Dr. V. Helms
Akademischer Mitarbeiter:	Dr. M. Ehses

**INHALTSVERZEICHNIS**

Abkürzungsverzeichnis .....	IV
Abkürzungen für Aminosäuren .....	V
Zusammenfassung .....	VI
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1    Allgemeine Aspekte .....	1
1.2    Elektronentransfertheorie .....	2
1.3    Enzymkinetik .....	4
1.4    Kinetik von Elektronentransferreaktionen .....	6
1.5    Cytochrome P450 .....	8
1.5.1    Allgemeine Aspekte .....	8
1.5.2    Die Bedeutung der steroidhydroxylierenden Cytochrome P450.....	13
1.5.3    CYP11A1 .....	17
1.6    Ferredoxine.....	18
1.6.1    Allgemeine Aspekte der Eisen-Schwefel Proteine.....	18
1.6.2    Unterteilung der [2Fe-2S] Ferredoxine .....	20
1.6.3    Adrenodoxin (Adx) .....	21
1.7    Die Adrenodoxin-Reduktase (AdR).....	25
1.8    Die Interaktion zwischen Adx und seinen Redoxpartnern.....	25
1.9    Polyamine .....	30
1.9.1    Allgemeine Aspekte und Metabolismus .....	30
1.9.2    Interaktionen der Polyamine .....	34
1.10    Aufgabenstellung .....	36
<b>2. Materialien und Methoden .....</b>	<b>38</b>
2.1.    Materialien .....	38
2.1.1    Chemikalien und Geräte.....	38
2.1.2    Verwendete Plasmide und <i>E.coli</i> Stämme .....	38
2.1.3    Proteine.....	38
2.2.    Methoden.....	39
2.2.1    Kultivierung und Transformation.....	39
2.2.2    Heterologe Proteinexpression .....	39

2.2.3	Proteinreinigung .....	39
2.2.4	UV/Vis Spektroskopie.....	42
2.2.5	Circulardichroismus .....	42
2.2.6	Redoxpotentialbestimmung.....	43
2.2.7	<i>In vitro</i> Rekonstitutionsassay .....	44
2.2.8	Cytochrom <i>c</i> Test .....	44
2.2.9	Optische Biosensor Messungen (Biacore) .....	45
2.2.10	Stopped-Flow Messungen .....	50
<b>3. Ergebnisse .....</b>		<b>53</b>
3.1	Einfluss der Polyamine auf das komplette CYP11A1 System.....	54
3.1.1	Effekte auf die Spektraleigenschaften des CYP11A1 .....	54
3.1.2	Effekte auf die Substratumwandlung des CYP11A1 Systems.....	56
3.1.3	Optische Biosensormessungen .....	62
3.1.4	Stopped-Flow Messungen .....	73
3.2	Docking .....	82
3.3	Einfluss der Polyamine auf die sekundäre Interaktionsdomäne.....	85
3.3.1	Spektroskopische Eigenschaften der verschiedenen Adx Mutanten.....	85
3.3.1.1	UV/Vis-Spektroskopie .....	85
3.3.1.2	CD-Spektroskopie .....	86
3.3.1.3	Thermische Denaturierung .....	88
3.3.2	Redoxpotentiale der verschiedenen Adx Mutanten .....	89
3.3.3	Optische Biosensormessungen .....	89
3.3.4	Interaktion der Adx-Mutanten mit der AdR.....	104
<b>4. Diskussion und Ausblick .....</b>		<b>109</b>
4.1.	Die vielfältigen Effekte der Polyamine auf das CYP11A1 System.....	113
4.1.1	Effekte der Polyamine auf die Spektraleigenschaften von CYP11A1 .....	113
4.1.2	Polyamine üben spezifische Einflüsse auf die Protein-Protein Anordnung im CYP11A1 System aus. ....	114
4.1.3	Polyamine beeinflussen den Elektronentransfer und die katalytische Aktivität .....	116
4.1.4	Effekte der Polyamine auf die Fähigkeit des CYP11A1-Systems zur Substratumwandlung .....	118

4.1.5	Putative Bindungsstellen der Polyamine an den Proteinen .....	118
4.2	Einfluss der Polyamine auf die sekundäre Interaktionsdomäne des Adx ..	123
4.3	Konkurrenz der verschiedenen Cytochrome um den gleichen Vorrat an Adx und AdR und möglicher Einfluss auf die biologische Funktion und Einsatz der Polyamine in anderen Elektronentransfersystemen .....	138
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>143</b>
<b>6.</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>161</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>162</b>
7.1.	Verwendete Geräte .....	162

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Akzeptor
A <sub>276</sub>	Absorption bei 276 nm
AdR	Adrenodoxin-Reduktase
Adx	Adrenodoxin
AdxD15K	Adx Mutante, deren Aspartat an der Stelle 15 durch Lysin substituiert wurde
AdxD15N	Adx Mutante, deren Aspartat an der Stelle 15 durch Asparagin substituiert wurde
AdxD39K	Adx Mutante, deren Aspartat an der Stelle 39 durch Lysin substituiert wurde
AdxD39N	Adx Mutante, deren Aspartat an der Stelle 39 durch Asparagin substituiert wurde
AdxWT	Adrenodoxin Wildtyp
bp	Basenpaare
CD	Circulardichroismus
CO	Carbonmonoxid
CYP	Cytochrom P450
CYP11A1	Cytochrom P450 <sub>scc</sub>
CYP11B1	Cytochrom P450-11 $\beta$
D	Donor
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminaminoethyl-(5' triphosphat)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOC	11-Desoxycorticosteron
DTE	Dithioerythritol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamtetraacetat
ET	Elektronentransfer
FAD	Flavinadeninucleotid (oxidierte Form)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-propansulfonsäure
HPLC	High performance liquid chromatographie
I	Ionenstärke
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
K <sub>A</sub>	Assoziationskonstante
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
K <sub>M</sub>	Michaelis-Menten Konstante
k <sub>obs,max</sub>	beobachtete, maximale Reduktionsrate
k <sub>off</sub>	Dissoziationsrate
k <sub>on</sub>	Assoziationsrate
MD	Molekuldynamische Computersimulationen
MS	Massenspektrometrie
NADPH	Nikotinamidadeninucleotidphosphat (reduzierte Form)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OD	optische Dichte
ox	oxidiert

PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDB	Protein Data Bank
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Q-Wert	Reinheitsgrad der Proteinlösung ( $A_{415}/A_{276}$ )
red	reduziert
RU	Resonanzeinheit (responce unit; Biacore)
s	Sekunde
SPR	Oberflächenplasmonresonanz (surface plasmon resonance)
SRS	Substraterkennungsseite (substrate recognition site)
T	Temperatur
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
UV/Vis	Ultravioletter und visueller Wellenlängenbereich
WT	Wildtyp

### Abkürzungen für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

### Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird beschrieben, wie Polyamine, gebunden an geladene Stellen der Proteingrenzflächen, als Modulatoren transienter Protein-Protein Interaktionen fungieren können. Die Fähigkeit von Putrescin, Spermidin und Spermin, die Protein-Protein Interaktionen zwischen Adrenodoxin Reduktase (AdR), Adrenodoxin (Adx) und CYP11A1 zu beeinflussen, wurde unter anderem mittels Oberflächenplasmonresonanz und Stopped-Flow analysiert. Die Ergebnisse zeigten modulierende Effekte der Polyamine auf einzelne Interaktionen und auf das gesamte System.

Computersimulationen der Polyamine an die Kristallstrukturen von oxidiertem Adx, AdR und dem oxidierten Adx – AdR Komplex, die von Frau M.Sc. S. Eyrisch, Universität des Saarlandes, durchgeführt wurden, deuten darauf hin, dass eine Modulation durch veränderte Protein-Protein Interaktionen möglich ist. Die Docking Experimente schlagen eine bevorzugte Bindestelle an der Region Asp-15, Asp-39 und Asp-41 des ungebundenen Adrenodoxins vor. Vier Adx-Mutanten (AdxD15K, AdxD15N, AdxD39K und AdxD39N) zeigten mit Ausnahme einer erhöhten thermischen Stabilität keine spektroskopischen Unterschiede zum Wildtyp. Die Mutanten verhielten sich in ihren Elektronentransfereigenschaften wie der Wildtyp in Anwesenheit der Polyamine.

Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Polyamine mit unterschiedlichen Komponenten transienter Proteinkomplexe interferieren und Proteinfunktionen kontrollieren können.

### Summary

This work describes the role of polyamines that could efficiently bind to charged spots at protein interfaces as modulators of transient protein-protein interactions. The capability of putrescine, spermidine, and spermine to affect the protein-protein interactions between adrenodoxin reductase (AdR), adrenodoxin (Adx), and CYP11A1 was analysed using techniques like surface plasmon resonance or stopped flow. These studies revealed modulating effects of polyamines on distinct interactions and on the entire system.

Computer simulations of the polyamines docked into the crystal structures of oxidized Adx, AdR, and the oxidized Adx – AdR complex performed by M.Sc. S. Eyrisch (Saarland University) suggested that modulation via changed protein-protein interactions appear plausible. On Adx, the docking experiments suggested one favourable high-affinity binding site of polyamines, the region around Asp-15, Asp-39, and Asp-41 of free Adx.

Four Adx mutants (AdxD15K, AdxD15N, AdxD39K, and AdxD39N) showed, except a higher thermo-stability, no differences regarding their spectroscopic characteristics to the adrenodoxin wildtype. In their electron transfer properties the mutants were comparable to AdxWT in presence of the polyamines.

These findings imply for the first time that small endogenous compounds are capable of interfering with distinct components of transient protein complexes and might control protein functions.

## 1. Einleitung

### 1.1 Allgemeine Aspekte

Essentielle Zellprozesse wie Signalkaskaden und metabolische Wege hängen von der Bildung spezifischer Komplexe zwischen unterschiedlichen Proteinen ab. Durch Annäherung ihrer aktiven Zentren sind Protein-Protein Komplexe in der Lage, präzise und sehr geregelt geladene Partikel in Redoxprozessen bzw. Intermediate in komplexen biochemischen Prozessen zu übertragen. Grundlage vieler biochemischer Prozesse sind Elektrontransfer (ET) Reaktionen zwischen Donor- und Akzeptorproteinen mit Redoxzentren, die relativ weit voneinander entfernt sind. Diese Redoxprozesse durchlaufen im Allgemeinen eine Vielzahl unterschiedlicher Reaktionen wie zum Beispiel die spezifische Bindung von Proteinen, die Neuordnung der Proteine und den Elektronentransfer selbst (Lehninger, 1994; Stryer, 1994). Betrachtet man nun die Kräfte, die Proteine zusammenhalten, zeigen Strukturanalysen und Mutationsstudien, dass elektrostatische Interaktionen dabei eine bedeutende Rolle spielen (Sheinerman *et al.*, 2000). Die Schnittstellen der Proteine gleichen geladenen Proteinoberflächen. Diese Grenzflächen sind sehr polar und ihre Fähigkeit zur Bildung von intermolekularen Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen bestimmt nach heutigen Erkenntnissen die Genauigkeit der Assoziation. Proteinschnittstellen können somit als wichtige neuartige Angriffsstellen für Moleküle, die Protein-Protein Komplexe und die daraus resultierenden Funktionen modulieren, angesehen werden (Cochran, 2000; Zutshi *et al.*, 1998). Es wird angenommen, dass kleine interferierende Moleküle ein enormes Potential sowohl für das Verständnis von molekularen Erkennungsprozessen als auch für die Kontrolle von Signal- oder metabolischen Kaskaden und als Arzneimittel in der pharmazeutischen Anwendung besitzen. Bis heute findet man in der Literatur jedoch erst wenige Beispiele für kleine Antagonisten der Protein-Protein Interaktion (Cochran, 2000, 2001; Toogood, 2002; Berg, 2003), welche die folgenden Kriterien für eine Untersuchung auf zellulärer Ebene oder im gesamten Organismus erfüllen. Besonders im Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Einsatz sind hohe Wirksamkeit, Selektivität und biologische Verfügbarkeit verbunden mit geringer Toxizität unentbehrliche Eigenschaften. Erstaunlicherweise wurde das Potential kleiner, endogener, organischer Moleküle, wie den Polyaminen, die elektrostatische Anziehungskraft zwischen Proteinen zu modulieren, bisher noch nicht erforscht.

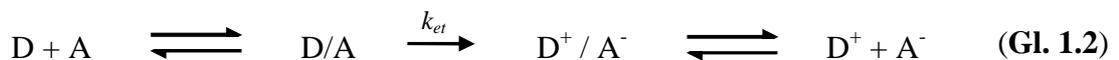
## 1.2 Elektronentransfertheorie

In biologischen Systemen erfolgen Redoxreaktionen durch sukzessive Verschiebung der Elektronen über mehrere Moleküle. Verließen diese Reaktionen nicht spezifisch, so würde ein direkter Elektronenübergang vom Donormolekül, als stärkstem Reduktionsmittel, auf das am leichtesten zu reduzierende Akzeptormolekül die Zwischenschritte und die daran gekoppelten Vorgänge kurzschließen. Die Elektronenübertragung erfolgt im Allgemeinen über Protein-Protein Komplexe mit Elektronen-Trägern. Diese Proteine müssen in den Komplexen zwei gegensätzliche Voraussetzungen erfüllen. Zum einen müssen sie spezifisch und der Komplex ausreichend stabil sein, so dass eine Erkennung des richtigen Partners möglich ist. Zum anderen dürfen die Komplexe nicht zu stabil sein, um den Gesamtelektronenfluss nicht zu hemmen. Wegen der strukturellen Voraussetzungen eines solchen Vorgangs müssen biologische Elektronenübertragungsreaktionen, die mit anderen biologischen Vorgängen wie einem Protonentransport gekoppelt sind, häufig über relativ große Abstände zwischen Donor und Akzeptor ( $> 10 \text{ \AA}$ ) hinweg erfolgen.

Während eines Elektronentransfers bewegt sich ein Elektron von einem Donormolekül (D) auf einen Akzeptor (A) (**Gleichung 1.1**).



Neben dem aktuellen Elektronentransferprozess aus **Gleichung 1.1** beinhaltet die Reaktion auch noch Diffusionsprozesse, die beide Moleküle zusammenbringt oder voneinander trennt (**Gleichung 1.2**).



Die Theorien der Elektronenübertragung machen Voraussagen über die Abhängigkeit der Elektronenübertragungsrates von Unterschieden in der Struktur der oxidierten und reduzierten Spezies, vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor sowie von der Triebkraft einer Elektronenübertragungsreaktion. Diese Theorien beruhen auf einfachen quantenmechanischen Ausdrücken für die Wellenfunktionen, die an der Abgabe und Aufnahme des Elektrons beteiligt sind. Das dazwischen liegende Medium koppelt diese beiden Wellenfunktionen schwach miteinander (Lippard & Berg, 1995). Die Geschwindigkeit einer nicht-adiabatischen

Elektronentransferreaktion wird durch **Gleichung 1.3** beschrieben (Marcus & Siders, 1982; Marcus & Sutin, 1985).

$$k_{et} = (4\pi^2/h) T_{DA}^2 (FC) \quad (\text{Gl. 1.3})$$

Dabei ist  $h$  die Planck-Konstante,  $T_{DA}$  das Tunnelmatrixelement, ein Mass für die elektronische Kopplung zwischen dem Reduktionsmittel (Donor D) und dem Oxidationsmittel (Akzeptor A) und FC der sogenannte Franck-Condon-Faktor, ein Mass für die Bewegung der Atomkerne, die mit dem Vorgang der Elektronenübertragung verbunden ist. Jeder dieser Faktoren lässt sich auf unterschiedliche Weise annähern. Die einfachste Darstellung von  $T_{DA}^2$ , die durch die **Gleichung 1.4** beschrieben wird, zeigt einen exponentiellen Abfall mit dem Abstand. Dabei bedeuten  $T_{DA}^0$  das Tunnelmatrixelement bei  $R = R_0$ ,  $R$  den Abstand zwischen den nächstliegenden Atomen des Donors und des Akzeptors und  $R_0$  den van-der-Waals-Abstand (im Allgemeinen 3,6 Å).  $\beta$  ist ein Parameter, der den Einfluss des Zwischenmediums wiedergibt.

$$T_{DA}^2 = T_{DA}^0{}^2 \exp(-\beta(R-R_0)) \quad (\text{Gl. 1.4})$$

$T_{DA}$  beschreibt die Wahrscheinlichkeit eines Elektronentransfers und ist sowohl von der Entfernung zwischen Donor und Akzeptor als auch von der Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine abhängig. Es wurden auch komplexere Formen dieses Ausdrucks entwickelt, die die Struktur des Zwischenmediums explizit berücksichtigen.

Die einfachste Form des FC-Terms bildet die Grundlage der Marcus-Theorie. Der klassische Ausdruck ist in **Gleichung 1.5** wiedergegeben.

$$FC = (4 \pi \lambda kT)^{-1/2} \exp(-(-\Delta G^0 - \lambda)^2 / 4 \lambda kT) \quad (\text{Gl. 1.5})$$

$k$  ist die Boltzmann-Konstante,  $T$  die absolute Temperatur und  $\Delta G^0$  die Freie Standardreaktionsenthalpie, die experimentell auch aus der Differenz der Redoxpotentiale für die Elektronentransfer (ET) Reaktion berechnet werden kann (Davidson, 2002). Die Reorganisationsenergie  $\lambda$  ist die Energie, die das gesamte System aufbringen muss, um vom Edukt- in den Produktzustand überzugehen. In polaren Lösemitteln beschreibt  $\lambda$  hauptsächlich die Reorganization der Lösemittelmoleküle aufgrund der Ladungsverteilung der Reaktanden (Bergethon, 1998). **Gleichung 1.5** hat mehrere Konsequenzen. Ein interessanter Aspekt, der

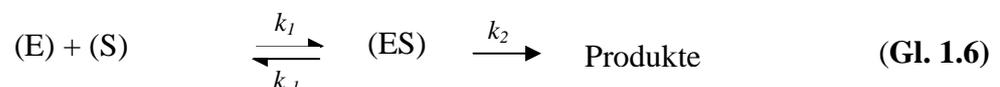
zunächst widersprüchlich erscheint, ist die Erkenntnis, dass die Elektronenübertragungsraten bei einer bestimmten Triebkraft ein Maximum erreichen und dann, wenn die Triebkraft darüber hinaus ansteigt, wieder abnehmen sollte. Wie aus **Gleichung 1.4** und **1.5** zu erwarten ist, beobachtet man einen nahezu linearen Abfall des Logarithmus der Geschwindigkeit mit dem Abstand, obwohl einige der gemessenen Übertragungsraten um eine oder zwei Größenordnungen von den berechneten Werten abweichen. Der Exponent  $\beta$ , den man aus der Steigung der Kurve erhält, beträgt  $1,4 \text{ \AA}^{-1}$ ; dies entspricht einer Abnahme der Geschwindigkeit auf ein Zehntel alle  $1,7 \text{ \AA}$  (Hopfield, 1974). Allerdings berücksichtigt dieses eindimensionale Barriere-Modell nicht die Proteinstruktur. Neuere Modelle wie zum Beispiel das Pathway Modell beziehen die komplette Proteinstruktur mit ein und unterscheiden dabei zwischen Abnahme des Elektronentransfers durch kovalente Bindungen, durch Wasserstoffbrückenbindungen und durch das Vakuum (Beratan *et al.*, 1992). Die Abnahmefaktoren in Verbindung mit diesen unterschiedlichen Elektronentransferpfaden sind:  $e_C = 0,6$  für einen ET über eine kovalente Bindung,  $e_H = (0,6)^2 e^{-1,7(R-2,8)}$  für einen ET über Wasserstoffbrückenbindungen und  $e_S = \frac{1}{2} 0,6 e^{-1,7(R-1,4)}$  für einen ET durch das Vakuum, wobei R der Abstand zwischen den Oberflächenatomen der jeweiligen Proteine ist (Beratan *et al.*, 1992; Beratan & Skourtis, 1998; Jones *et al.*, 2002). Diese Werte wurden experimentell bestimmt, um Parameter für die verschiedenen Möglichkeiten des Elektrontunnels zu erhalten.

Da Protein-Protein Interaktionen hydrophobe, einschließlich der strukturellen Neugestaltung ihrer Grenzflächen, und elektrostatische Kräfte miteinander kombinieren, konnte mit Hilfe des elektrostatischen Dockings gezeigt werden, dass auch Änderungen von geladenen Gruppen in der Nähe der Redox Cofaktoren die Elektronentransferrate um Größenordnungen verändern (Liang & Newton, 1992). Um den Mechanismus, der der Interaktion zwischen Proteinen zu Grunde liegt, zu verstehen, ist es wichtig, die Prinzipien der Enzymkinetik, welche im folgenden Abschnitt angesprochen werden, zu verstehen.

### 1.3 Enzymkinetik

Die Basis für die Enzymkinetik schuf 1903 der französische Physiko-Chemiker Victor Henri (1872/1882-1940). Darauf aufbauend entwickelten der deutsche Mediziner und Bakteriologe Leonard Michaelis (1875-1949) und die kanadische Medizinerin Maud Menten (1879-1960) 1913 ein Modell, welches mit Hilfe der Beschreibung eines Fließgleichgewichtes oder eines quasi-stationären Zustandes (steady-state) enzymatische Reaktionen charakterisiert (Lehninger, 1994; Stryer, 1994).

Das Fließgleichgewicht beschreibt das Zeitintervall, in dem die Reaktionsrate annähernd konstant ist. Kurz nachdem das Enzym mit einem großen Substratüberschuß vermischt worden ist, gibt es eine Anfangsperiode (pre-steady-state), während der sich die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes aufbaut. Dieser Zeitraum ist normalerweise zu kurz für herkömmliche Meßmethoden. Die Reaktion erreicht schnell ein Fließgleichgewicht, d.h. der Enzym-Substrat-Komplex bleibt über die Zeit konstant. Allerdings ändern sich die Konzentrationen von Substrat und Produkt während der Reaktion wesentlich. Die Herleitung der Michaelis-Menten-Gleichung beginnt mit zwei fundamentalen Reaktionen, der Bildung und dem Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes. Die Enzymreaktion kann somit in **Gleichung 1.6** zusammengefasst werden:



(E)= Enzymkonzentration, (S)= Substratkonzentration, (ES)= Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes,  $k_1$  = Assoziationsrate des Komplexes,  $k_{-1}$  = Dissoziationsrate des Komplexes,  $k_2$  = molekulare Aktivität oder turnover number

Die Anwendung des Steady-state Kriteriums (die Konzentration von (ES) ändert sich nicht während der Reaktion und die im Vergleich zur Enzymmenge angestiegene Substratkonzentration kann die Umsatzgeschwindigkeit  $V$  nicht weiter steigern (Substratsättigung)) führt zu einer Vereinfachung der Michaelis-Menten Gleichung auf folgende Form (**Gleichung 1.7**).

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_M} \quad (\text{Gl. 1.7})$$

$V_{\max}$  und  $K_M$  stellen gut etablierte Parameter dar, die die Reaktion eines Enzyms mit seinem Substrat charakterisieren. Diese Werte liefern Informationen sowohl zur Gesamtgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion als auch für die Bindung des Substrates. Die Michaeliskonstante, die Substratkonzentration, bei der Halbsättigung vorliegt (bei der die Umsatzgeschwindigkeit also  $V = V_{\max}/2$  beträgt), ergibt sich allgemein zu

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (\text{Gl. 1.8})$$

$K_M$  reflektiert also im einfachsten Fall die Stärke der Bindung des Substrates an das Enzym. Im Gegensatz zur Kinetik chemischer Reaktionen gibt es in der Enzymkinetik das Phänomen der Sättigung, d.h. trotz steigender Substratkonzentrationen kann die Umsatzgeschwindigkeit  $V$  nicht weiter erhöht werden, es wird also ein  $V_{max}$  erreicht. Im Gegensatz dazu beschäftigt sich die pre-steady state Kinetik mit der Analyse der Prozesse, die stattfinden, bevor der Enzym-Substrat-Komplex ein chemisches Gleichgewicht erreicht hat (Lehninger, 1994; Fersht, 1998). Somit werden Informationen zur Affinität der Reaktionspartner, z.B. die Komplexbildung und die Anfangsgeschwindigkeit der Substratumwandlung, zur Verfügung gestellt. Eine allgemein verwendete Methode zur Untersuchung von pre-steady-state Kinetiken ist die Stopped-Flow Technik. Diese Methode wird angewendet, um zeitabhängige Absorptionsänderungen sichtbar zu machen, die z.B. als Folge einer chemischen Reaktion zwischen zwei Proteinen die spektralen Eigenschaften eines der Reaktanden verändert.

#### 1.4 Kinetik von Elektronentransferreaktionen

Nach dieser allgemeineren Betrachtungsweise ist es nun interessant, die verschiedenen Kinetiken von ET Reaktionen genauer zu untersuchen. In dieser Form von Redoxreaktion werden die Produkte erst dann gebildet, nachdem die Elektronen vom Donor auf das Akzeptorprotein übertragen wurden. Berücksichtigt man das im vorherigen Abschnitt gezeigte Reaktionsschema kann die Umsatzrate,  $k_2$ , durch die Elektronentransferrate,  $k_{ET}$  ersetzt werden. Die Geschwindigkeit der Produktbildung kann unter Steady-state Bedingungen mit einer bimolekularen Reaktionsrate  $k_{bi}$  (Attkins, 1996) beschrieben werden (**Gleichung 1.9**).

$$k_{bi} = \frac{k_1 k_{ET}}{k_{-1} + k_{ET}} \quad (\text{Gl. 1.9})$$

Nach der Art des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts der Reaktion kann zwischen drei unterschiedlichen Klassen von Elektronentransferreaktionen unterschieden werden: Ist der langsamste Schritt einer Redoxreaktion der eigentliche Elektronentransfer, kann  $k_{bi}$ , da  $k_{ET} \ll k_{-1}$  ist, auch mit folgender **Gleichung 1.10** wiedergegeben werden,

$$k_{bi} = \frac{k_1 k_{ET}}{k_{-1}} = K_A k_{ET} \quad (\text{Gl. 1.10})$$

mit der Assoziationskonstante  $K_A$  ( $K_A = k_1/k_{-1}$ ), die die Bindungsaffinität zwischen den interagierenden Proteinen beschreibt. In diesem Fall wird  $k_{bi}$  durch die Gleichgewichtskonzentration des Elektronendonator/-Akzeptor Komplexes und die Geschwindigkeit, die zur Überquerung der Aktivierungsbarriere benötigt wird, bestimmt (Gabdouline & Wade, 1998; Davidson, 2000). Dies ist dann der Fall, wenn Reaktionen sehr große Aktivierungsenergie besitzen ( $> 20$  kJ/mol in Wasser; (Gabdouline & Wade, 1998)).

Ist  $k_{ET} \gg k_{-1}$  wird die Interaktion zwischen den Proteinen als diffusionskontrolliert beschrieben. Das bedeutet, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Annäherung der beiden Reaktanden ist und daher  $k_{bi} = k_1$  gilt. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn sich die Proteine in einem viskosen Lösungsmittel befinden oder die Reaktion eine geringe Aktivierungsenergie besitzt (Gabdouline & Wade, 1998; Davidson, 2000).

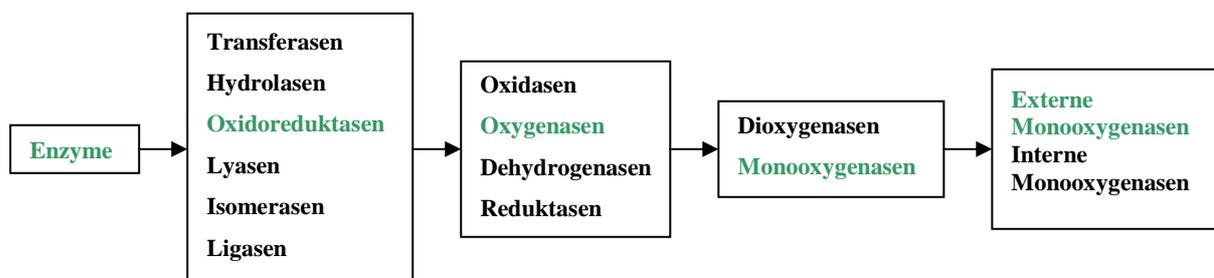
Der dritte Fall tritt dann ein, wenn die Elektronentransferreaktion durch einen langsameren Prozess als den des Elektronentransfers oder durch die Assoziation der Redoxpartner eingeschränkt ist. Hier ist der geschwindigkeitbestimmende Schritt die konformelle Reorientierung der Proteine innerhalb eines ET Komplexes, welche zu einer Optimierung von Position und Geometrie der Redoxzentren vor der Elektronenübertragung führt (Davidson, 2002). Eine andere Form dieses ET sind Reaktionen, deren Rate durch chemische, adiabatische Prozesse wie zum Beispiel der Ausbildung und Spaltung von Bindungen vor dem Elektronentransfer bestimmt wird.

Da Elektronentransferprozesse von fundamentaler Bedeutung z.B. für die Atmungskette, für die Photosynthese und eine Vielzahl anderer unterschiedlicher metabolischer Wege sind, ist es für die Forschung immer interessant, die Prozesse, die während solcher Reaktionen stattfinden, zu verstehen. Mittels der Genomsequenzierung, die fast augenblicklich die gesamte Bandbreite an Genprodukten zugänglich macht, konzentrieren sich heutzutage immer mehr Wissenschaftler auf die umfassende Analyse von komplexen Protein-Protein Wechselwirkungen und deren Funktionen, wie sie z.B. in den von den Cytochromen P450 katalysierten Reaktionen stattfinden.

## 1.5 Cytochrome P450

### 1.5.1 Allgemeine Aspekte

Mitte der 50er Jahre begann die Erforschung der Cytochrome P450, als Mason (Mason *et al.*, 1955) erstmals eine NADPH-abhängige Monooxygenaseaktivität in Mikrosomen aus Leberzelllysat nachweisen konnte. Später wiesen Garfinkel (Garfinkel, 1958) und Klingenberg (Klingenberg, 1958) in Lebermikrosomen ein Kohlenmonoxid-bindendes Pigment nach, welches im reduzierten CO-gebundenen Zustand ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei 450 nm besitzt. Da dieses Verhalten einzigartig für Häm-Proteine des b-Typs (sie besitzen eine nicht kovalent gebundene Häm Gruppe) ist, führte es schließlich zu ihrer Namensgebung Cytochrom P450, wobei P für Pigment steht (Omura & Sato, 1964 a, b). Gewöhnlicherweise zeigen Proteine, die eine Fe Protoporphyrin IX prosthetische Gruppe besitzen, ein Absorptionsmaximum bei 420 nm (Omura & Sato, 1964 a, b). Die ungewöhnlichen Spektraleigenschaften der P450s werden auf den fünften axialen Häm-Liganden zurückgeführt, der ein Cystein und nicht, wie in anderen Protoporphyrin IX beinhaltenden Proteinen, ein Histidin ist (Ouzounis & Melvin, 1991). Nach Art der katalysierten Reaktion werden die Enzyme in sechs Hauptklassen eingeteilt (**Abbildung 1.1**).



**Abb. 1.1: Einordnung der Cytochrome P450 in Enzymgruppen.**

Die Cytochrome P450 sind den grün markierten Enzymgruppen zuzuordnen.

Die Cytochrome P450 werden zu den Oxidoreduktasen gezählt. Der Name Oxidase ist den Enzymen vorbehalten, die Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen. Die von den Cytochromen P450 katalysierte Reaktion bewirkt eine Reduktion von Sauerstoff, wobei eines der Sauerstoffatome in das Substrat eingebaut wird und das zweite als Wasser aus der Reaktion austritt. Somit gehören sie zu den Oxygenasen, genauer zu der Untergruppe der Monooxygenasen, da sie im Gegensatz zu den Dioxygenasen nur eines der beiden Sauerstoffatome ins Substrat einführen. Da die Cytochrome P450 ihre Reduktionsäquivalente

in der Regel von externen Elektronendonoren beziehen und nicht vom Substrat selbst, bezeichnet man sie als externe Monooxygenasen (Hayaishi & Nozaki, 1969).

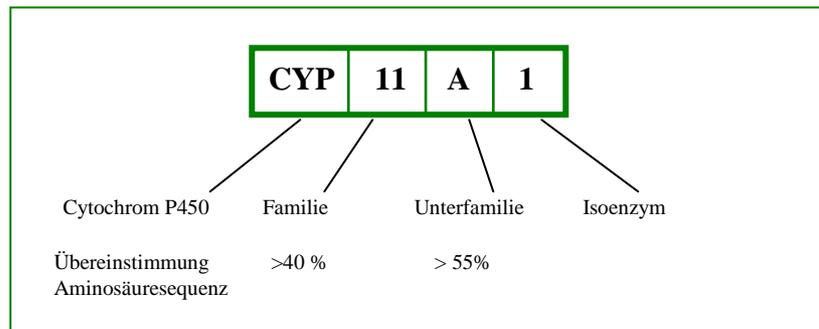
Die Multienzymfamilie der Cytochrome P450 stellt die wohl vielfältigste und am weitesten verbreitete Proteinfamilie dar (Nelson *et al.*, 1996; Nelson, 2006). Im Dezember 2008 waren bereits über 7230 verschiedene Cytochrom-P450-Sequenzen (ausgenommen Varianten und Pseudogene) aus 781 unterschiedlichen Familien bekannt und es ist zu erwarten, dass diese Anzahl im Rahmen der weltweiten Genomsequenzierungen weiterhin stark anwächst (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>; Nelson *et al.*, 2004).

Cytochrome P450 wurden in Bakterien, Pilzen, Pflanzen, Würmern, Insekten, Fischen und Säugetieren nachgewiesen. In Säugetieren (Waterman, 1992) findet man sie in nahezu allen Organen, hauptsächlich aber in der Leber und in der Nebenniere. Während sie in der Leber eine wichtige Rolle im Metabolismus von Fremdstoffen, wie zum Beispiel von Arzneimitteln und Umweltgiften, sowie vieler körpereigener Stoffe spielen (Paine, 1981; Porter & Coon, 1991), sind sie in der Nebenniere an der Biosynthese vieler Hormone beteiligt (Bernhardt, 1996). Sie wurden aber auch im Herz (Rudolph *et al.*, 2000; Yoshimura *et al.*, 2002), in der Lunge (Smith *et al.*, 1982; Arinc, 1993; Price *et al.*, 2004; Gamielien & Maritz, 2004), in der Haut (Mukhtar & Khan, 1989; Jugert *et al.*, 1994), in der Plazenta (Pasanen & Pelkonen, 1989), in den Gonaden und im Gehirn (Warner *et al.*, 1991; Erdmann *et al.*, 1996) vorgefunden, wobei ihre Rolle in diesen Organen zum Teil noch nicht vollständig geklärt ist (Seliskar & Rozman, 2007).

Da Cytochrome P450 in fast allen Lebewesen zu finden sind, geht man heute davon aus, dass sie sich evolutionär gesehen aus einem einzigen, gemeinsamen „Vorläufer-Molekül“, der Lanosterol-14 $\alpha$ -demethylase CYP51, entwickelt haben (Nebert *et al.*, 1989; Aoyama *et al.*, 1996; Noshiro *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1997). Diese Annahme beruht auf der Tatsache, dass die Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase als einziges Cytochrom P450 in Tieren, Pflanzen, Pilzen und Bakterien, somit in allen lebenden Systemen gefunden wurde (Nelson *et al.*, 1996). Die große strukturelle Ähnlichkeit innerhalb der Enzymgruppe stützt weiterhin diese Annahme.

Die große Anzahl der Cytochrome P450 verlangte eine systematische Nomenklatur, die von Nebert 1987 eingeführt und stetig weiterentwickelt wurde (Nebert *et al.*, 1987, 1989; Nebert & Nelson, 1991; Nebert *et al.*, 1991; Nelson *et al.*, 1993, 1996, 2004; Nelson, 2006). Dieser Nomenklatur entsprechend steht CYP für Cytochrom P450, die erste arabische Ziffer definiert die Genfamilie, der darauf folgende Buchstabe die Unterfamilie und die letzte Zahl das Enzym selbst (**Abbildung 1.2**). Mitglieder einer P450-Familie haben mehr als 40 %

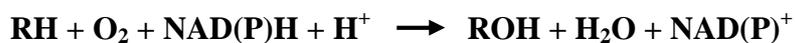
Sequenzidentität. Beträgt die Sequenzidentität mehr als 55%, gehören sie zur selben Unterfamilie. P450s von unterschiedlichen Familien zeigen normalerweise eine Sequenzübereinstimmung von unter 30%, was sich zum Teil in der großen Anzahl an unterschiedlichen Substraten dieser Enzyme widerspiegelt (Nelson *et al.*, 1993).



**Abb. 1.2: Nomenklatur der Cytochrom P450 Enzyme am Beispiel von CYP11A1.**

Cytochrome P450 spielen eine wichtige Rolle in der Metabolisierung von vielen Pharmazeutika, Karzinogenen, Alkaloiden, Pestiziden und anderen wichtigen Fremdstoffen (Porter & Coon, 1991). Zusätzlich sind diese Proteine in eine Vielzahl von unterschiedlichen physiologisch relevanten Prozessen wie der Biosynthese der Steroidhormone, des Vitamin D und der Gallensäure involviert. So ist es nicht überraschend, dass diese Enzyme mittlerweile die Aufmerksamkeit so vieler unterschiedlicher Forschungsgebiete wie zum Beispiel der Biochemie, der Pharmakologie, der Physiologie, der organischen Chemie und der Biotechnologie erregt haben (Bernhardt, 1996).

Die allgemeine von Cytochromen P450 katalysierte Hydroxylierungsreaktion lautet:



Dabei ist RH ein organisches Substrat (z.B. Steroide, Terpene, Fettsäuren, Arzneimittel), NAD(P)H, H<sup>+</sup> der externe Elektronendonator und ROH das hydroxylierte Produkt.

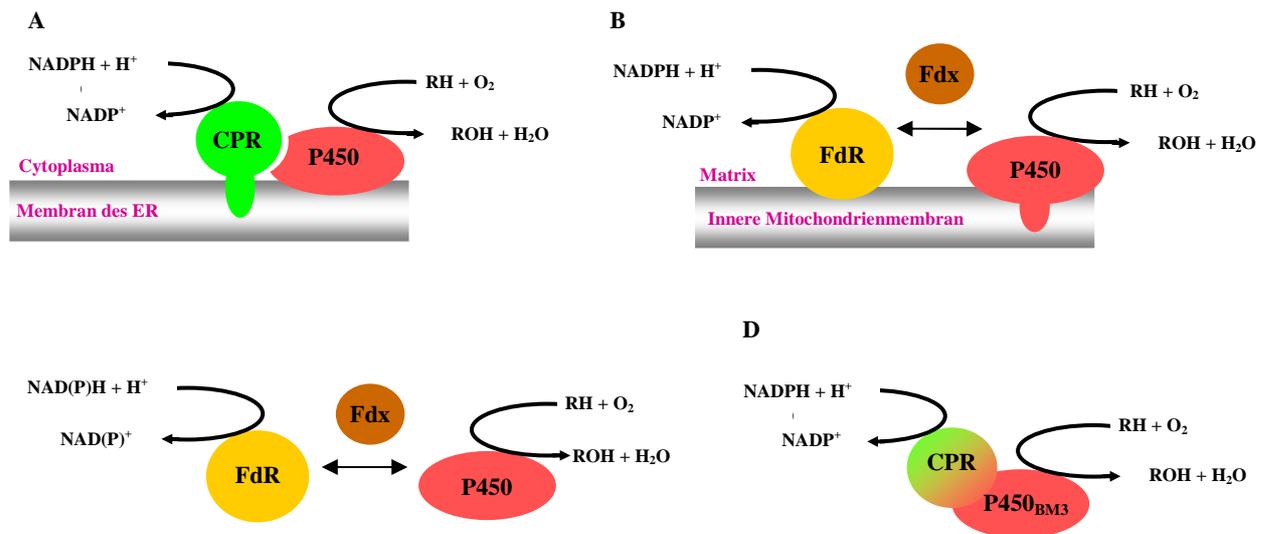
Neben Hydroxylierungen katalysieren sie auch N-, O- und S-Dealkylierungen, Sulfoxidierungen, Epoxidierungen, Peroxidierungen, Desulfurierungen, Deaminierungen, Dehalogenierungen und die Reduktion von N-Oxiden (Ruckpaul, 1993; Ortiz de Montellano, 1995; Bernhardt, 1996).

Je nach Elektronentransportweg werden die Cytochrom P450 Systeme mittlerweile in zehn Klassen unterteilt (Hannemann *et al.*, 2007). Hier sollen aber nur die beiden bedeutendsten und

verbreitetsten, das mikrosomale und das mitochondriale/bakterielle System, genauer vorgestellt werden (**Abbildung 1.3**).

Im Falle der mikrosomalen P450s (**Abbildung 1.3 A**) handelt es sich immer um membrangebundene Enzyme, die ihre Elektronen von einer NAD(P)H-abhängigen, FAD- und FMN-haltigen Cytochrom P450 Reduktase erhalten, die ebenfalls membranassoziiert ist (Bernhardt, 1996, 2006). Ein Sonderfall dieser Klasse sind die CYP102-Enzyme, deren bekanntestes Beispiel CYP102A1 (P450BM-3) aus *Bacillus megaterium* ist (**Abbildung 1.3 D**). Hierbei handelt es sich um ein fettsäurehydroxylierendes Cytochrom P450, bei dem die NADPH-abhängige FAD- und FMN-haltige P450-Reduktase zusammen mit dem Cytochrom P450 auf einer einzigen Peptidkette lokalisiert ist. Reduktase und Cytochrom stellen somit ein natürliches Fusionsprotein dar (Ruettinger *et al.*, 1989). Die zweite Klasse der Cytochrome P450 umfasst die mitochondrialen (**Abbildung 1.3 B**) und eine Reihe bakterieller (**Abbildung 1.3 C**) Cytochrome P450. Sie benötigen ein zusätzliches Elektronentransportprotein. In diesen Systemen fließen die Elektronen von NAD(P)H über eine FAD-haltige Reduktase zu einem löslichen Ferredoxin, einem Eisen-Schwefel-Protein, das die Elektronen zum Cytochrom P450 überträgt. Während die Proteinkomponenten der bakteriellen Systeme durchweg löslich sind, ist in den mitochondrialen Systemen die Reduktase membranassoziiert und das Cytochrom P450 an die Membran gebunden (Bernhardt, 1996). Diese Klasse von Cytochromen ist verantwortlich für die Biosynthese von Steroiden, Vitamin D und Gallensäuren (Ruckpaul, 1990).

Eine weitaus seltenere Klasse der Cytochrome P450 bezieht ihre Elektronen aus dem Substrat selbst, da sie Hydro- und Endoperoxide als Substrat umsetzen. Somit sind sie nicht auf externe Elektronendonatoren angewiesen und gehören daher als Spezialfall auch nicht der Gruppe der externen Monooxygenasen an. Die einzigen bekannten Beispiele bisher sind die Thromboxansynthase CYP5 (Yokoyama *et al.*, 1991) und die drei Enzyme der CYP74 Familie (Song *et al.*, 1993). Es gibt des weiteren ein bekanntes Cytochrom P450, welches in der Lage ist, Elektronen direkt von NADH aufzunehmen. Der einzige bekannte Vertreter dieser Klasse ist CYP55A1 (P450<sub>nor</sub>) aus *Fusarium oxysporum* (Nakahara *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1997; Daiber *et al.*, 2005) und den Pilzen *Cylindrocarpon tonkinense* (Kudo *et al.*, 1996) und *Trichosporum cutaneum* (Zhang *et al.*, 2001).



**Abb. 1.3: Schematischer Aufbau verschiedener Cytochrom P450 Systeme.**

(A) mikrosomales System: P450 /CPR an der cytoplasmatischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums (ER) membrangebunden; (B) mitochondriales System: FdR membran-assoziiert, P450 membrangebunden, Fdx löslich in der Matrix; (C) bakterielles System: löslich im Cytosol; (D) CYP102 (P450<sub>BM-3</sub>): autarkes, fusioniertes bakterielles System (*Bacillus megaterium*), löslich im Cytosol.

Informationen über die Struktur von Cytochromen P450 sind nur in geringem Maße vorhanden. Bis jetzt ist es Kristallographen gelungen die Struktur von mehreren bakteriellen und von löslichen mikrosomalen Cytochromen P450, CYP2B4 (Scott *et al.*, 2003), CYP2C5 (Wester *et al.*, 2003), CYP2C8 (Schoch *et al.*, 2004), CYP2C9 (Williams *et al.*, 2003) und CYP3A4 (Williams *et al.*, 2004) sowie von Komplexen aufzuklären. Die Analyse dieser Strukturen zeigte, dass auch wenn die Sequenzübereinstimmung zwischen den verschiedenen Cytochromen P450 ziemlich gering ist, alle Cytochrome eine charakteristische Faltung und Topologie besitzen. P450s zeigen in der Anordnung der N-terminalen und C-terminalen Sequenzen um das Häm herum ein interessantes Faltungsmuster. Die C-terminale Hälfte des Moleküls bildet den inneren Kern, speziell die beiden Schlüsselhelices I und L, die jeweils eine Seite des Häm einklammern (Ortiz de Montellano, 1995). Allerdings befindet sich die C-terminale  $\beta$  Struktur an der Oberfläche des Moleküls. Die N-terminale Hälfte des Proteins besteht hauptsächlich aus Helices, die die C-terminalen Sequenzen umgeben. Die Konservierung der Häm Bindeseite in den P450s scheint eine strukturelle Eigenschaft zu sein, die für die Funktion als Monooxygenasen notwendig ist und in allen bekannten Kristallstrukturen aufzufinden ist (Ortiz de Montellano, 1995; Graham & Peterson, 1999). Trotzdem gibt es, basierend auf dem Vergleich unterschiedlicher Cytochrome P450,

drastische Unterschiede in der Primärstruktur des aktiven Zentrums, obwohl die Sekundärstruktur bei allen Cytochromen im Großen und Ganzen dieselbe ist. Dieser Unterschied scheint die Selektivität der Enzyme für unterschiedliche Substrate zu bestimmen (Williams *et al.*, 2000). Da bis jetzt keine Kristallstrukturen von mitochondrialen Cytochromen P450 vorhanden sind, leiten sich die momentanen Erkenntnisse über ihre Struktur neben den bereits veröffentlichten Strukturen mikrosomaler und bakterieller P450 hauptsächlich von Mutagenesestudien und Homologiemodelling ab. Eines der am intensivsten untersuchten Systeme ist die Elektronentransferkette der mitochondrialen Steroidhydroxylierung. In diesem Redoxsystem werden die benötigten Elektronen von einer NADPH-abhängigen FAD-haltigen **Adrenodoxin-Reduktase** (AdR) zu **Adrenodoxin** (Adx) einem Ein-Elektronen-Carrier, übertragen, welches schließlich eines der Cytochrome P450 aus der CYP11A oder CYP11B Familie reduziert (Grinberg *et al.*, 2000). Diese Enzyme spielen eine essentielle Rolle in der Synthese von Steroidhormonen.

### 1.5.2 Die Bedeutung der steroidhydroxylierenden Cytochrome P450

Steroide sind in der Natur weit verbreitet. Einige haben Bedeutung als Hormone, andere treten als Gallensäuren oder als Bestandteile von Membranen auf. Darüber hinaus dienen Steroide als Medikamente, zum Beispiel als Anabolika, Diuretika und Kontrazeptiva (Mutschler *et al.*, 2001).

Die Steroidhormone (Glucocorticoide, Mineralocorticoide und Sexualhormone) werden in mehreren Stufen gebildet, an denen bis zu sechs unterschiedliche Cytochrome P450s beteiligt sind: CYP11A1 (cholesterol side chain cleavage Cytochrom P450, P450<sub>scc</sub>), CYP11B1 (11 $\beta$ -Hydroxylase Cytochrom P450 oder P450<sub>11 $\beta$</sub> ), CYP11B2 (Aldosteronsynthase Cytochrom P450 oder P450<sub>aldo</sub>), CYP17 (17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-lyase Cytochrom P450 oder P450<sub>c17</sub>), CYP21 (21-Hydroxylase Cytochrom P450 oder P450<sub>c21</sub>), und CYP19 (Aromatase Cytochrom P450 oder P450<sub>arom</sub>) (Bernhardt, 1996). Glucocorticoide, Mineralocorticoide und Androgene werden primär in den Nebennieren, die Sexualhormone Testosteron und Östrogen in den Gonaden produziert. Der Syntheseweg aller Steroidhormone beginnt mit der Abspaltung der Seitenkette von Cholesterol durch CYP11A1 zur Bildung von Pregnenolon (**Abbildung 1.4**). Bei dieser dreistufigen Reaktion werden insgesamt sechs Elektronen verbraucht. Die Seitenkettenabspaltung ist gleichzeitig der limitierende Schritt der Steroidhormonbiosynthese (Lambeth, 1990).

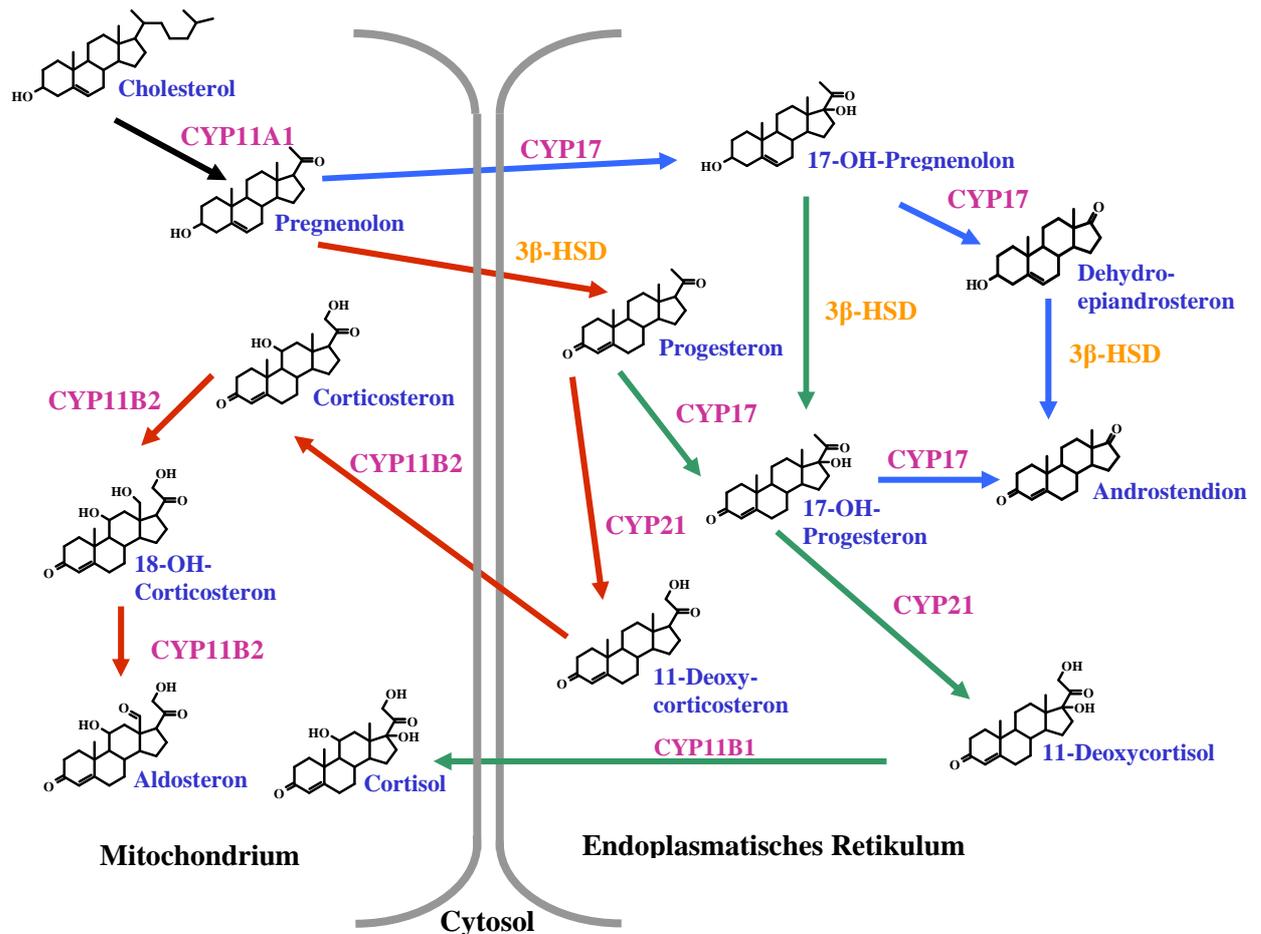
Der adrenale Cortex ist der Ort der Bildung der Glucocorticoide und Mineralocorticoide. CYP11B1 katalysiert die 11 $\beta$ -Hydroxylierung von 11-Desoxycortisol zu Cortisol in der *Zona*

*fasciculata/reticularis* (White *et al.*, 1992; Erdmann *et al.*, 1995 a, b; Young *et al.*, 2003; Hakki *et al.*, 2008). Cortisol ist an der Regulation vieler biologischer Prozesse beteiligt. So fördert es zum Beispiel die Gluconeogenese und die Glycogenbildung in der Leber, sorgt für einen gesteigerten Fett- und Proteinabbau und ist unentbehrlich für die Bewältigung von Stresssituationen. Cortisol ist auch ein Ausgangsprodukt für die Herstellung entzündungshemmender Pharmaka (z.B. Prednisolon). CYP11B2, das in seiner Aminosäuresequenz mit CYP11B1 zu 93 % identisch ist (Mornet *et al.*, 1989), katalysiert in der *Zona glomerulosa* die Aldosteronsynthese durch 11 $\beta$ -Hydroxylierung und anschließende 18-Hydroxylierung und 18-Oxidation von 11-Desoxycorticosteron (Yanagibashi *et al.*, 1986; Young *et al.*, 2003). Die Inaktivierung der Steroidhormone erfolgt in der Leber hauptsächlich durch die CYP3A-Subfamilie über 6 $\beta$ -Hydroxylierung. Allerdings konnten auch 2 $\beta$ -, 15 $\beta$ - und 16 $\alpha$ -Hydroxyderivate nachgewiesen werden (Waxman *et al.*, 1988).

Fehlfunktionen der gluco- und mineralocorticoidsynthetisierenden Cytochrome P450 sind mit einer Vielzahl von Krankheiten verknüpft. Die 11 $\beta$ -Hydroxylasedefizienz ist nach der 21-Hydroxylasedefizienz die zweithäufigste Ursache der Congenitalen Adrenalen Hyperplasie (CAH), einer Erbkrankheit, bei der die Cortisolproduktion gestört ist. Dieses Leiden führt zu einer Anhäufung der Zwischenprodukte der Androgenproduktion und zu Bluthochdruck. CYP11B2 Gendefekte können zu Aldosteronsynthese-Defizienzen des Typs 1 und 2 führen (Portrat-Doyen *et al.*, 1998; Nguyen *et al.*, 2008; Riedl *et al.*, 2008). Diese Leiden führen zu Hypoaldosteronismus, was mit einer verminderten Natriumresorption und einer erhöhten Kaliumsekretion einhergeht. Erhöhte Konzentrationen des Steroidhormons Aldosteron führen dagegen zu Bluthochdruck und Herzerkrankungen, wohingegen erhöhte Cortisolkonzentrationen beim metabolischen Syndrom (u.a. gekennzeichnet durch zentrale Fettleibigkeit) nachgewiesen wurden. Durch *Crossing-Over* der homologen Gene für CYP11B1 und CYP11B2 kann ein Aldosteron-synthetisierendes Enzym unter den regulatorischen Elementen von CYP11B1 entstehen. Dieses Leiden wurde bekannt unter dem Namen Supprimierbarer Hyperaldosteronismus (Lifton *et al.*, 1992; MacConnachie *et al.*, 1998; Seeman *et al.*, 1999). Es ist geprägt von einer Hypersekretion von Aldosteron. Die Symptome dieser Krankheit können durch Dexamethason oder andere Glucocorticoide, die die ACTH-Produktion unterdrücken, gelindert werden.

Neben den Gluco- und Mineralocorticoiden kommen auch die Sexualhormone als wichtige Arzneistoffe in Betracht. Das wichtige weibliche Sexualhormon Progesteron ist zur Erhaltung der Schwangerschaft unentbehrlich (Schindler *et al.*, 2003). Es wird im *Corpus luteum*, in der Plazenta, in der Nebennierenrinde, aber auch in den Hoden synthetisiert. Progesteron spielt

eine Rolle als Zwischenprodukt bei der Synthese der Nebennierenrinden-Hormone, der Androgene und der Estrogene (**Abbildung 1.4**). Steroidhormone sind somit nicht nur wichtige Ausgangsprodukte für Pharmaka, sondern steroidproduzierende Enzyme und Steroidhormon-Rezeptoren sind auch als Targets von großer Bedeutung für die Arzneimittelforschung. Einen Überblick über die verschiedenen Reaktionen der Steroidbiosynthese gibt **Abbildung 1.4**.



**Abb. 1.4: Steroidbiosynthese in der Nebennierenrinde.**

Das Diagramm zeigt die verschiedenen Reaktionen des Steroidhydroxylierungssystems der menschlichen Nebenniere, die ausgehend von Cholesterol zu Cortisol (grüne Pfeile), Aldosteron (rote Pfeile) und Androstendion (blaue Pfeile) führen. Ebenfalls dargestellt sind die Namen der entsprechenden Enzyme und der Organellen, in denen diese Reaktionen stattfinden. Cytochrome P450 sind violett, die 3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3β-HSD) ist orange markiert.

Der allgemein anerkannte Katalysemechanismus der Cytochrome P450 verläuft über verschiedene Zwischenstufen (**Abbildung 1.5**). Im ersten Schritt des katalytischen Zyklus wird das Substrat (RH) im aktiven Zentrum aufgrund von hydrophoben Interaktionen gebunden (1). Die Substratbindung geht im Allgemeinen mit erheblichen

Konformationsänderungen des Proteins und der Verdrängung eines Wassermoleküls von der sechsten Koordinationsstelle des Häm-Eisens einher. Die Verdrängung des Wassers (2) führt zu einer Spinumkehr des Häm-Eisens vom low-spin- in den high-spin-Zustand und zu einer Verminderung des Redoxpotenzials. Durch das positivere Redoxpotential kann das Eisen leichter zur Ferri-Form reduziert werden (3). Der Sauerstoff wird dann an die sechste Koordinationsstelle des Eisens gebunden (4). Da dieser Sauerstoff-P450-Komplex das instabilste Zwischenprodukt des Zyklus ist, führt seine Reduktion zuerst zu einer Peroxo-Ferric-Zwischenstufe (5) und dann zu der protonierten Hydroperoxo-Ferri-Form (6). Durch eine zweite Protonierung kommt es zur heterologen Spaltung von Sauerstoff, der Freisetzung eines Moleküls Wasser und der Bildung eines Radikal-Intermediates (7). Das zweite Sauerstoffatom wird auf das Substrat übertragen und das hydroxylierte Produkt dissoziiert anschließend ab (8). Von einigen stabilen Zwischenstufen, wie zum Beispiel dem substratgebundenen Fe(III)-Komplex (Poulos *et al.*, 1985), dem substratfreien Fe(III)-Komplex mit Wasser an der sechsten Koordinationsstelle (Poulos *et al.*, 1986) und dem Fe(III)-Produktkomplex (Poulos & Raag, 1992), waren die Kristallstrukturen am Beispiel von CYP101 (P450cam) aus *Pseudomonas putida* schon länger bekannt. In den letzten Jahren konnten aber sogar die Kristallstrukturen von einigen der unter Normalbedingungen nur sehr kurzlebigen Intermediate, wie dem Fe(II)-Substratkomplex, dem Fe(III)-Substrat-Sauerstoff-Ternärkomplex und dem aktivierten Sauerstoffkomplex, bestimmt werden (Schlichting *et al.*, 2000; Denisov *et al.*, 2005).

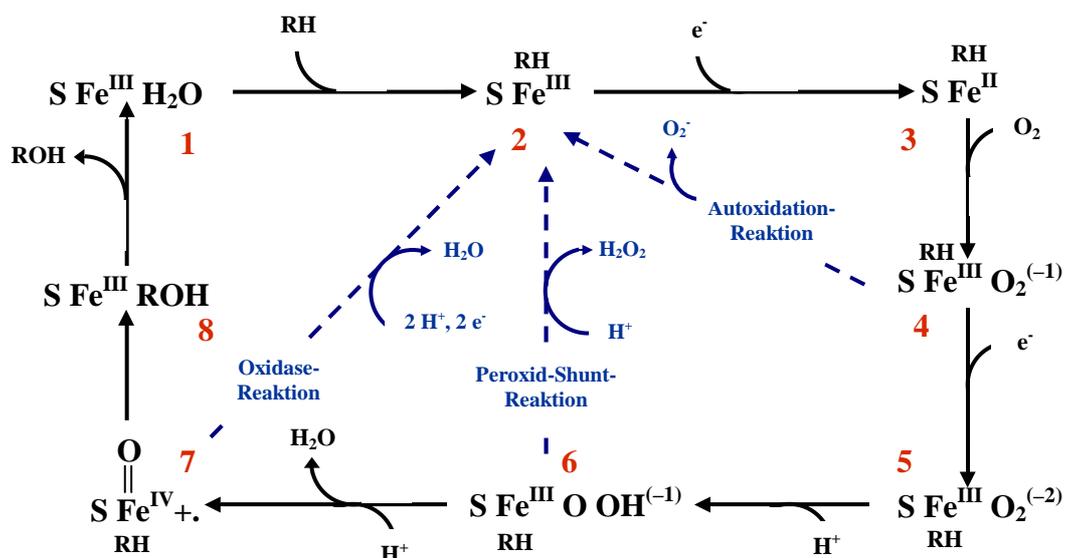


Abb. 1.5: Katalytischer Zyklus der Cytochrome P450.

Darüber hinaus enthält der P450 Reaktionszyklus mindestens drei Stationen, an denen eine Vielzahl von Nebenreaktionen möglich ist und unter physiologischen Bedingungen häufig auftreten. (Bernhardt, 1996, 2006). Diese drei Hauptreaktionen sind (i) die Autoxidation des oxy-ferro Enzyms (**4**) mit gleichzeitiger Bildung eines Superoxidanions und der Rückkehr des Enzyms in den Ruhezustand (**2**), (ii) die Peroxidreaktion, in der das koordinierte Peroxid oder Hydroperoxid-Anion (**5**, **6**) vom Eisen dissoziiert und Wasserstoffperoxid bildet, (iii) die Oxidase-Reaktion in der die Ferryl-oxo Zwischenstufe (**7**) durch eine Vier-Elektronen Reduktion letztendlich zu zwei Molekülen Wasser oxidiert wird. Diese Prozesse werden oft zusammen eingestuft und als Uncoupling bezeichnet (Denisov *et al.*, 2005). In der Abwesenheit geeigneter Substrate produzieren einige reduzierte P450 Enzyme durch Autoxidation *in vitro* und *in vivo* so genannte Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS), die in Säugern zur Apoptose führen können (Nordblom *et al.*, 1976; Nordblom & Coon, 1977; Hanukoglu *et al.*, 1993; Derouet-Hümbert *et al.*, 2005).

### 1.5.3 CYP11A1

CYP11A1 katalysiert den ersten und (nach Aufnahme von Cholesterol in die Mitochondrien) geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Biosynthese aller Steroidhormone, nämlich die Umwandlung von Cholesterol zu Pregnenolon. Dieses Enzym, auch P450<sub>scc</sub> (side chain cleavage Enzym) genannt, ist ein membrangebundenes Protein, welches in der inneren mitochondrialen Membran des steroidogenen Gewebes, wie zum Beispiel der Nebennieren und den Gonaden zu finden ist.

Frühere Studien zeigten, dass die *in vivo* Pregnenolon-Synthese durch das **S**teroidogenic **A**cute **R**egulatory Protein (StAR, (Clark *et al.*, 1994)) stimuliert wird. Dieses Protein ist in den Cholesteroltransport von der äußeren in die innere Mitochondrienmembran involviert. Die Wirkungsweise von StAR ist noch nicht vollständig geklärt und bleibt ein Gegenstand kontroverser Diskussion (Miller, 2007 a, b).

Durch seine Aufnahme in das aktive Zentrum von CYP11A1 verdrängt Cholesterol den sechsten Häm-Liganden (ein Wassermolekül) des Ferrieisens (siehe **Kapitel 1.5.2**). Dies führt zu einem Spin-shift des Ferrieisens von low spin zu dem fünffach koordinierten high spin Zustand. Dieser low nach high spin Shift wird durch die Anwesenheit des Elektronendonors Adx begünstigt (Lambeth & Pember, 1983). Die Reduktion des high spin Eisens im Cytochrom durch ein einzelnes Elektron ermöglicht es, O<sub>2</sub> (oder CO) als einen sechsten Liganden ans Häm zu koordinieren. Durch die Übertragung eines zweiten Elektrons wird dann die Hydroxylierungsreaktion initiiert (Ortiz de Montellano, 1995). Die Pregnenolon-

Bildung erfolgt in drei Schritten (Lambeth, 1990). Zuerst wird Cholesterol an Position 22 hydroxyliert, was zur Bildung von 22R-Hydroxycholesterol führt. Durch eine zweite Hydroxylierung an Position 20 entsteht 20,22R-Dihydroxycholesterol. Eine Anhäufung dieser Zwischenprodukte wurde bislang nicht beobachtet, was zu der Schlussfolgerung führte, dass sie im aktiven Zentrum des Cytochromes gebunden bleiben und unter normalen Umständen nicht vom Enzym dissoziieren. Der letzte Schritt in der Pregnenolonsynthese ist die 20,22-Lyase Reaktion, welche die Cholesterol-Seitenkette abspaltet. Für eine komplette Umwandlung von Cholesterol zu Pregnenolon müssen dem Cytochrom somit sechs Elektronen zur Verfügung gestellt werden. Die Abspaltung der Cholesterol-Seitenkette stellt den ersten und entscheidenden Schritt in der Steroidbiosynthese dar, da Pregnenolon die Vorstufe zu allen Steroidhormonen ist. Neuere Studien haben gezeigt, dass CYP11A1 auch in der Lage ist, Vitamin D<sub>3</sub> zu metabolisieren, welches zur Bildung und Anreicherung zweier Hauptprodukte (20-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> und 20,22-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (Guryev *et al.*, 2003)) führt. Die physiologische Rolle dieser Produkte ist allerdings immer noch weitestgehend unbekannt.

Für alle diese Reaktionen werden Elektronen benötigt, die von dem [2Fe-2S] Cluster-Ferredoxin der Nebennieren, dem Adrenodoxin, an das CYP11A1 übertragen werden.

## 1.6 Ferredoxine

### 1.6.1 Allgemeine Aspekte der Eisen-Schwefel Proteine

Eisen-Schwefel Proteine repräsentieren eine ubiquitär verteilte Proteinklasse. Der Name „Ferredoxin“ wurde erstmals in den frühen sechziger Jahren bei der Isolierung eines Proteins aus *Clostridium pasteurianum* verwendet, welches an der Stickstoff-Fixierung beteiligt ist (Mortenson, 1962). Mitglieder dieser Proteinfamilie fungieren gewöhnlich als Einzel-Elektronen-Überträger in komplexen Redoxreaktionen. Aufgrund des im Cluster vorhandenen anorganischen Schwefels, müssen sich diese Proteine in einer frühen Altersstufe des Lebens entwickelt haben, was auch die bedeutende Rolle dieser Proteinklasse unterstreicht. Dieser Schwefel kann durch Ansäuern aus dem Cluster freigesetzt werden, was zu biologisch inaktiven und in der Regel auch sehr instabilen Apo-Proteinen führt. Dies wiederum weist auf eine stabilisierenden Wirkung des Clusters auf die Gesamtproteinstruktur hin (Grinberg *et al.*, 2000).

Eisen-Schwefel-Proteine werden gewöhnlich nach der Anzahl der Eisenatome im Cluster, nach den Aminosäuren, die den Cluster koordinieren, dem Redoxpotential und der Anwesenheit von zusätzlichen prosthetischen Gruppen in verschiedene Gruppen unterteilt.

**Tabelle 1.1: Klassifizierung der Eisen-Schwefel Proteine nach der Clusterzusammensetzung**

Typ	Clusteraufbau	Redoxpotential	Vorkommen, Beispiele	Referenz
Rubredoxin	1 Fe, koordiniert durch 4 Cys	-37 mV bis -57 mV	anaerobe Bakterien	Verhagen <i>et al.</i> , 1993
Ferredoxin	[2Fe-2S]; 2Fe und 2S $\gamma$ , meist koordiniert von 4 Cys	-233 mV bis -455 mV	Mitochondrien, Chloroplasten, Blaualgen, einige andere Bakterien	Bezkorovainy, 1980
	[4Fe-4S]; 4Fe und 4S $\gamma$ , meist koordiniert von 4 Cys	-250 mV bis -650 mV	Bakterien	Bruschi & Guerlesquin, 1988
	[3Fe-4S]; 3Fe und 4S $\gamma$ , meist koordiniert von 4 Cys	ungefähr -130 mV	Bakterien und Archeobakterium	Bruschi & Guerlesquin, 1988
Rieske-Protein	[2Fe-2S]; 2Fe und 2S $\gamma$ , koordiniert von 4 Cys	-150 mV bis +350 mV	Bakterien, Atmungskettenkomplex III	Lovenberg, 1977
HiPIP	[4Fe-4S]; 4Fe und 4S $\gamma$ , koordiniert von 4 Cys	+50 mV bis +470 mV	Purpurbakterien	Bartsch, 1991
komplexe Eisen-Schwefel-Proteine	[2Fe-2S], [4Fe-4S] oder [3Fe-4S] und weitere aktive Zentren, z.B. Flavin, Häm und andere Metalle	[3Fe-4S] ca. +100 mV	Bakterien, Atmungskettenkomplexe I und II	Bezkorovainy, 1980

Unter Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte wurden fünf Klassen gebildet: die niedermolekularen Rubredoxine, die Ferredoxine, die Rieske-Typ Proteine, HiPIP's (high potential iron proteins) sowie die komplexen Eisen-Schwefel Proteine (Kimura, 1968).

**Tabelle 1.1** gibt einen Überblick über die unterschiedlichen Klassen der Eisen-Schwefel Proteine.

Die Gruppe der Ferredoxine unterteilt sich wiederum nach der Konformation des Eisen-Schwefel-Clusters in [2Fe-2S], [3Fe-4S] und [4Fe-4S] Cluster-Ferredoxine.

### 1.6.2 Unterteilung der [2Fe-2S] Ferredoxine

Die [2Fe-2S] Cluster Ferredoxine bilden eine Familie von niedrig-molekularen Eisen-Schwefel Proteinen, welche sowohl in Bakterien als auch in Tieren und Pflanzen vorkommen. Wie schon erwähnt, agieren diese Proteine als Elektronen-Überträger. Während des Elektronentransfer-Prozesses wechselt eines der Eisenatome des Clusters vom dreiwertigen (+3, Ferriform) in den reduzierten zweiwertigen Zustand (+2, Ferroform) über.

Anhand der Aminosäuresequenz, der NMR- bzw. EPR-Spektren und des Redoxpotentials werden diese Proteine in zwei Untergruppen unterteilt: auf der einen Seite die Pflanzenferredoxine mit einem Redoxpotential von  $-305$  mV bis  $-455$  mV und den Ferredoxinen, die in Vertebraten und Bakterien vorkommen (Redoxpotential von  $-235$  mV bis  $-274$  mV), auf der anderen Seite (Sligar & Gunsalus, 1976; Cammack *et al.*, 1977; Skjeldal *et al.*, 1991 a, b).

Analysen der Kristallstruktur beider Ferredoxinklassen zeigten, dass die Gesamtfaltung der [2Fe-2S] Ferredoxine grundlegend die gleiche ist. Sie zeigt die für diese Proteinklasse charakteristische kompakte ( $\alpha+\beta$ ) Faltung (Overington *et al.*, 1992). In allen Ferredoxinen lassen sich zwei bedeutende Hauptdomänen, nämlich die konservierte, hydrophobe Kerndomäne, die den Eisen-Schwefel-Cluster trägt, und die sehr flexible Interaktionsdomäne, die bedeutend für die spezifische Bindung der Redoxpartner ist (Holden *et al.*, 1994), finden. Berücksichtigt man, dass alle Ferredoxine Elektronentransportproteine sind, so ist es nicht überraschend, dass die den Eisen-Schwefel-Cluster umgebende Kerndomäne äußerst gut konserviert ist. Dennoch gibt es geringe Unterschiede in der Kernregion des Vertebraten- und des Pflanzentyps. So ist zum Beispiel bei den Pflanzen-Ferredoxinen die den Eisen-Schwefel-Cluster umgebende Schleife mit vier Aminosäuren um eine Aminosäure kürzer als bei den Vertebraten. Es fehlt ihnen ein konserviertes Serin oder Threonin, das in der Mitte der Vertebraten-Schleife sitzt. Die Deletion dieser Aminosäure in einem Vertebraten-Ferredoxin, wie zum Beispiel dem Adrenodoxin, führte sowohl zu einer verringerten thermischen

Stabilität als auch zu einer verminderten Fähigkeit, mit den Redoxpartnern zu interagieren (Hannemann *et al.*, 2001). Die relativ geringe Sequenzhomologie zwischen Pflanzen- und Vertebratentyp (unter 23 %; (Bruschi & Guerlesquin, 1988; Holden *et al.*, 1994)) kann hauptsächlich auf die signifikanten Unterschiede in den Interaktionsdomänen zurückgeführt werden. Diese Region ist für die korrekte und spezifische Bindung der entsprechenden Redoxpartner verantwortlich. Dies ist jedoch nicht überraschend, wenn man berücksichtigt, dass die Ferredoxine mit vielen verschiedenen Redoxpartnern zur Ausübung ihrer vielfältigen zellulären Funktionen interagieren müssen.

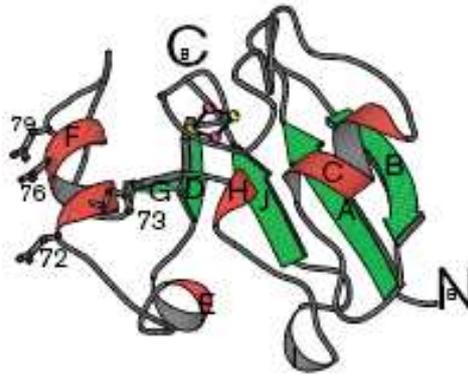
In Vertebraten lassen sich die Ferredoxine der [2Fe-2S] Proteinfamilie in der Nebenniere, in der Plazenta, in der Leber und im Gehirn nachweisen (Ichikawa *et al.*, 1987; Tuckey *et al.*, 2001; Tuckey & Headlam, 2002; Tuckey, 2005) Sie kommen fast ausschließlich in den Mitochondrien dieser Organe vor und nehmen dort an der durch die Cytochrome P450 katalysierten Hydroxylierungsreaktionen zur Produktion von Steroidhormonen, Vitamin D Metaboliten und Gallensäure teil (Omura & Sato, 1964 a, b). Eines der am intensivsten untersuchten Ferredoxine der Vertebraten ist das Nebennieren-Ferredoxin, Adrenodoxin.

### 1.6.3 Adrenodoxin (Adx)

Das bovine Ferredoxin Adrenodoxin (14,4 kDa) ist in den Mitochondrien der Nebennieren lokalisiert, wo es in den mitochondrialen Cytochrom P450 Steroidhydroxylierungssystemen als Elektronenüberträger dient.

Das für Adrenodoxin kodierende Gen befindet sich im Zellkern. Die Adrenodoxin-mRNA wird in Form eines hochmolekularen Präproteins mit einer N-terminalen Signalsequenz im Cytoplasma synthetisiert. Diese Präsequenz besteht aus 58 Aminosäuren, die vor Eintritt in die Mitochondrien durch endoproteolytische Spaltung entfernt wird (Matocha & Waterman, 1984). Das von seiner Präsequenz abgespaltene, in die Mitochondrien importierte, mature Protein besteht aus 128 Aminosäuren und besitzt als redox-aktive prosthetische Gruppe einen [2Fe-2S]-Cluster (Grinberg *et al.*, 2000).

1998 gelang es, eine verkürzte Adx-Form (bovines Adx 4-108) zu kristallisieren (**Abbildung 1.6**) (Müller *et al.*, 1998). Aufgrund des zu vermutenden proteolytischen Abbaus des Rinderadrenodoxins wurden die Aminosäuren Ser1-Ser3 und Asp109-Glu128 entfernt.



**Abb. 1.6: Molekülstruktur des bAdx4-108 (Müller *et al.*, 1998).**

Der Eisen-Cluster ist als „balls and sticks“-Modell dargestellt.  $\alpha$ -Helices (rot) und  $\beta$ -Faltblätter (grün) sind mit großen Buchstaben gekennzeichnet.

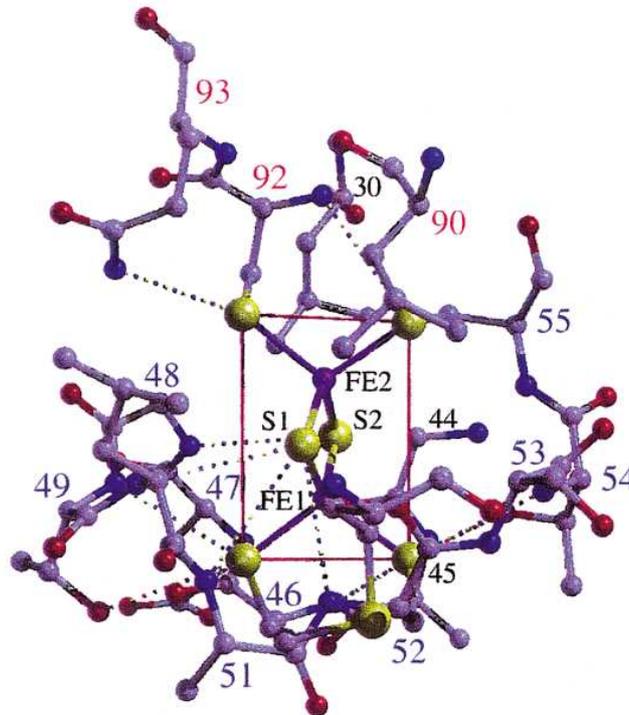
Die Strukturanalyse bestätigte die für Ferredoxine typische kompakte Faltung bestehend zu etwa 22 % aus  $\beta$  - Faltblättern, zu 17 % aus  $\alpha$  - Helices und zu 6 % aus  $3_{10}$ -Helices (Müller *et al.*, 1998, Müller *et al.*, 1999, Pikuleva *et al.*, 2000). Fünf  $\beta$ -Faltblätter und fünf Helices (drei  $\alpha$  und zwei  $3_{10}$ ) wurden identifiziert und benannt (Müller *et al.*, 1998).

Die strukturelle Anordnung der in dem Adx4-108 deletierten 20 Aminosäuren des C-Terminus des Adrenodoxin Wildtyps (Adx WT) konnte im Jahre 2000 geklärt werden, als Pikuleva und Mitarbeiter die Struktur des maturen Proteins in ganzer Länge vorstellten (Pikuleva *et al.*, 2000). Es zeigte sich, dass die Aminosäuren Asp-109 bis Val-111 eine kurze Schleife bilden, die ins Medium gerichtet ist, während der restliche C-Terminus (Aminosäuren 112 bis 128) eine sehr flexible Region darstellt, die im Medium frei beweglich ist und im Kristall keine Elektronendichte aufweist (Pikuleva *et al.*, 2000).

Adrenodoxin enthält zwei strukturelle Domänen, die essentiell für seine Funktion sind. Die Reste Asp-5 bis Cys-55 und Gly-91 bis Pro-108 gehören zur größeren, hydrophoben Kerndomäne. Die Reste His-56 bis Leu-90 bilden die kleinere, stark negativ geladene Wechselwirkungsdomäne.

In der Kerndomäne befindet sich der Eisen-Schwefel-Cluster als redoxaktives Zentrum auf der Moleküloberfläche. Obwohl die Reste Leu-30, Phe-43 bis Thr-54, Met-77 und Cys-92 bis Ile-94 den Cluster umgeben, ist er von vier Seiten lösungsmittelzugänglich (Müller *et al.*, 1998). Im oxidierten Adrenodoxin ist dieser [2Fe-2S]-Cluster sowohl für die charakteristische rotbräunliche Färbung als auch für die Absorptionsmaxima bei 325 nm, 414 nm und 455 nm verantwortlich (Kimura, 1968). In der prosthetischen Gruppe werden die beiden nicht Häm-Eisenatome durch die Schwefelatome von vier Cysteinen des Polypeptids (Cys-46, Cys-52,

Cys-55 und Cys-92) und durch zwei zentral positionierte, säurelabile Schwefelatome tetraedrisch koordiniert. Die Verankerung am Protein erfolgt dabei über die Fe-S $\gamma$ -Bindungen (**Abbildung 1.7**).



**Abb. 1.7 : Region des Adx(4-108), die den Eisen-Schwefel Cluster umgibt.**

Die S $\gamma$  Atome der den [2Fe-2S] Cluster bindenden Cysteine 46, 52, 55, und 92 bilden eine durch rote Linien gekennzeichnete Ebene. Die Atome sind als Kugel-Stab-Modell und die Wasserstoffbrücken als gepunktete Linien dargestellt (Grinberg *et al.*, 2000).

Der anorganische Schwefel sowie die den Cluster bindenden vier Schwefelatome der Cysteine bilden ein asymmetrisches Wasserstoffbrücken-Netzwerk, wodurch die Stabilisierung des Clusters gewährleistet wird. Die S $\gamma$ - Atome definieren eine Ebene in die der Cluster vertikal eingebettet ist (Müller *et al.*, 1998). Eine Seite des Clusters ist der Interaktionsdomäne zugewandt und wird durch Wechselwirkungen von Glu-74 und Gln-93 mit Leu-50, Met-77, Leu-78 und Leu-90 an den hydrophoben Kernbereich des Proteins gekoppelt (Müller *et al.*, 1998). In Elektronentransferprozessen scheint das Eisenatom Fe1 gegenüber dem zweiten Eisenatom (Fe2) bevorzugt zu werden. Fe1 hat eine polarere Umgebung und ist im Vergleich zu Fe2 näher an der Oberfläche des Moleküls lokalisiert. Dadurch ist es wahrscheinlicher, dass dieses Atom einen engeren Kontakt mit den Redoxpartnern eingeht (Dugad *et al.*, 1990). Im Gegensatz zu der in allen Ferredoxinen in

hohem Maße konservierte Kernregion, konnte nachgewiesen werden, dass die Interaktionsdomäne eine sehr variable Region ist, die an der Bindung und Erkennung der Redoxpartner beteiligt ist (Müller *et al.*, 1999). Im Falle von Adx steuert die Interaktionsdomäne die Bindung des Ferredoxins zu AdR, CYP11A1 und CYP11B1 (Müller *et al.*, 1999).

Zahlreiche intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen wie auch Salzbrücken sind essentiell für die konformative Stabilität dieses Proteins (Grinberg *et al.*, 2000). Eine wichtige Rolle für die korrekte Faltung des Adx sowie für den Einbau des [2Fe-2S]-Clusters spielt Pro-108 (Uhlmann *et al.*, 1994). Diese Aminosäure geht zum einen bevorzugt hydrophobische Wechselwirkungen mit His-56, Ile-58 und Tyr-82 ein, zum anderen bildet sie eine Wasserstoffbrücke zu Arg-14 (Grinberg *et al.*, 2000). Die Substitution sowie Deletion von Prolin 108 führten zu einer signifikanten Destabilisierung des Proteins (Uhlmann *et al.*, 1994; Grinberg *et al.*, 2000). Die Aminosäure His-56 wird vor allem durch die Wasserstoffbrückenbindungen zu Tyr-82 und Ser-88 stabilisiert. Mutationen von His-56 zu Arginin, Glutamin oder Threonin führten zu einem Verlust der thermischen Stabilität des Proteins (Burova *et al.*, 1996).

Untersuchungen mittels ortsgerichteter Mutagenese weisen auch auf andere Aminosäuren hin, die für die konformative und thermische Stabilität des Adx von Bedeutung sind, wie zum Beispiel die Salzbrücke zwischen Glu-74 und Arg-89 (Grinberg & Bernhardt, 2001) und die den Cluster stabilisierende Wasserstoffbrückenbindung zwischen Cys-52 und Thr-54 (Uhlmann *et al.*, 1992).

Die Wechselwirkung mit den Redoxpartnern wird hauptsächlich durch elektrostatische Prozesse hervorgerufen, wie Messungen der Ionenkraftfelder zeigten (Vickery, 1997).

Als Maß für die Affinität von Proteinen, Elektronen in einer Reaktion aufzunehmen oder abzugeben, dient das Redoxpotential. In einer Redoxreaktion werden die Elektronen jeweils von dem Protein mit dem negativeren Potential auf den anderen Reaktionspartner übertragen. Das Redoxpotential von Adx WT beträgt ca.  $-273$  mV (Uhlmann & Bernhardt, 1995).

In den mitochondrialen Steroidhydroxylasesystemen der Nebennierenrinde fungiert Adrenodoxin als Einzel-Elektronen-Überträger. Es erhält die Elektronen von der NADPH-abhängigen FAD-besitzenden Adrenodoxin-Reduktase und überträgt sie auf die mitochondrialen Cytochrome P450 (Grinberg *et al.*, 2000).

### 1.7 Die Adrenodoxin-Reduktase (AdR)

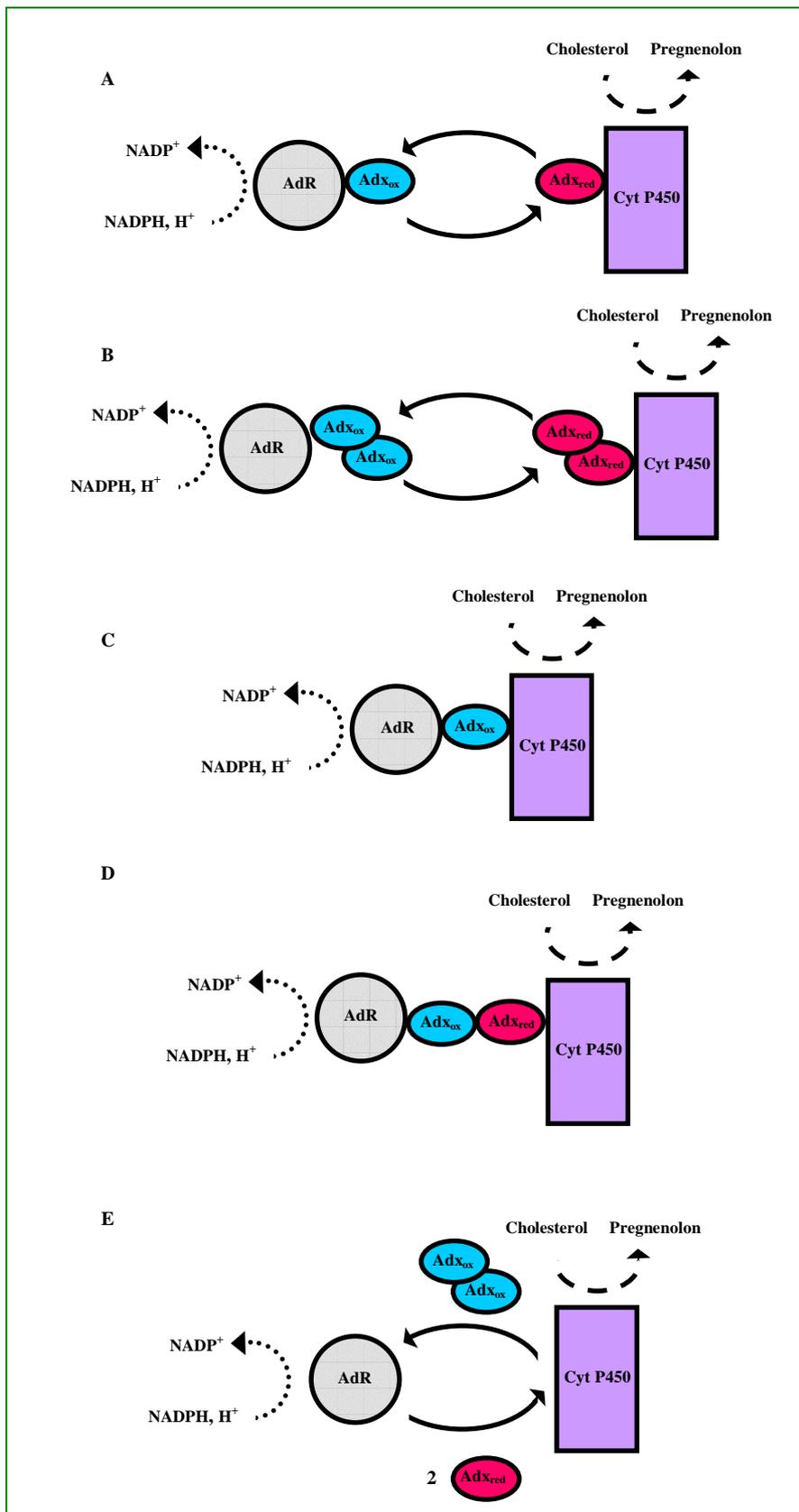
Die bovine Adrenodoxin-Reduktase besteht aus 460 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 50,3 kDa (Ziegler *et al.*, 1999). Auch in diesem Protein können zwei große Domänen unterschieden werden, die das FAD beinhalten die Domäne und die NADPH Bindedomäne. Beide Teile bestehen aus im Zentrum liegenden parallelen  $\beta$ -Faltblättern, welche von  $\alpha$ -Helices umgeben sind. Zusätzlich besteht die NADPH Bindedomäne aus einem dreisträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt (Ziegler *et al.*, 1999). Das FAD ist in das Protein durch die C-Termini der parallelen  $\beta$ -Faltblätter in einer Rossmann Faltung (Schulz, 1992) eingebaut. Die Ribose der FAD-Gruppe bindet fest an Glu-38 des Carboxylendes eines  $\beta$ -Faltblattes, wie es bei Dinukleotiden üblicherweise zu finden ist (Schulz, 1992). Der Isoalloxazin-Teil des FAD zeigt zu der NADPH Bindedomäne, während der Adenin-Teil in der FAD-Domäne verdeckt ist. Dieses Arrangement ermöglicht den Elektronentransfer von NADPH zu der FAD-Gruppe. Die NADPH- Bindedomäne liegt zwischen zwei  $\beta$ -Faltblättern der FAD-Bindedomäne. Im Wesentlichen ist NADPH auf die gleiche Art und Weise wie die prosthetische Gruppe FAD am Carboxylende der in der Mitte gelegenen parallelen  $\beta$ -Blätter der NADPH Bindedomäne gebunden (Ziegler & Schulz, 2000). Die Bindung zwischen AdR und Adx ist hauptsächlich elektrostatischer Natur. Die äußerst asymmetrische Ladungsverteilung der AdR führt zu einer Spalte zwischen den FAD- und NADPH-Domänen, welche fast komplett von basischen Aminosäuren umgeben ist (Ziegler *et al.*, 1999). Diese basische Spalte der AdR wird als die Hauptbindestelle für das sehr negativ geladenen Adx betrachtet (Müller *et al.*, 1998).

### 1.8 Die Interaktion zwischen Adx und seine Redoxpartnern

Wie genau bovines Adx während eines Elektronentransfers mit seinen Redoxpartnern interagiert, wird trotz der Kenntnisse zu den Ladungsinteraktionen immer noch kontrovers diskutiert. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass Adx nur als Eielektrontransporter fungieren kann, wurden folgende Mechanismen postuliert. Das Shuttle-Model (**Abbildung 1.8 A+B**) von Lambeth geht davon aus, dass Adx als Monomer (**A**) bzw. als Dimer (**B**) zuerst an die Adx-Reduktase bindet, reduziert wird und der Komplex anschließend wieder dissoziiert. Danach lagert sich das reduzierte Adx an das Cytochrom an, wodurch dieses reduziert wird. Nach dem Elektronentransfer auf das Cytochrom löst sich der Komplex auf und der Zyklus beginnt von vorne. In beiden Fällen dient Adx als mobiler Carrier zwischen der AdR und dem Cytochrom P450 (Lambeth *et al.*, 1979). Ein weiteres Modell

schlägt die Bildung eines ternären Komplexes zwischen AdR, Adx und dem Cytochrom vor (**Abbildung 1.8 C**) (Kido & Kimura, 1979). Ein drittes Modell postuliert eine Beteiligung von zwei Adx-Molekülen (einmal oxidiert, einmal reduziert) am Elektronentransport und somit die Bildung eines quarternären Komplexes (**Abbildung 1.8 D**) (Hara & Kimura, 1989 a, b; Hara *et al.*, 2000). Zusätzlich wurde 2002 ein modifizierter Shuttlemechanismus, unter Teilnahme von Adx-Dimeren und -Monomeren als Elektronenträger, vorgeschlagen (**Abbildung 1.8 E**) (Beilke *et al.*, 2002): Das oxidierte Adx, das als Dimer vorliegt, wird durch Adx-Reduktase reduziert. Die redox-abhängigen Änderungen vor allem in der C-terminalen Region des Adx führt zu einer Dissoziation des Dimers. Die so entstandenen reduzierten Adx Monomere werden nun wiederum durch das Cytochrom P450 oxidiert. Dies bestätigt das von Lambeth postulierte Shuttle-Modell (Lambeth *et al.*, 1979), weist aber ausdrücklich daraufhin, dass der Elektronentransport sowohl über das Monomer als auch über das Dimer erfolgen kann. Mittels analytischer Ultrazentrifugation durchgeführte Experimente zur Sedimentationsgeschwindigkeit zeigten, dass im Gegensatz zum gekürzten Adx(4-108) oder dem reduzierten AdxWT das oxidierte AdxWT bevorzugt in Dimeren vorliegt (Behlke *et al.*, 2007), was die Theorie von Lambeth *et al.* und Beilke *et al.* unterstützt (Lambeth *et al.*, 1979; Beilke *et al.*, 2002). Signifikante Konformationsänderungen vor allem in der Region des C-Terminus führen offenbar zu einer Dissoziation der Dimere bei der Reduktion des Cytochroms. Die Steroidproduktion muss möglichst schnell und effizient verlaufen. In dem mitochondrialen Steroidhydroxylasesystem dienen Dimere zur Optimierung der Reaktion. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird durch die bei der Reduktion an der AdR entstehenden Monomere weiter erhöht.

Es wird sogar vermutet, dass in unterschiedlichen Systemen unterschiedliche Elektronentransportmechanismen existieren (Grinberg *et al.*, 2000).

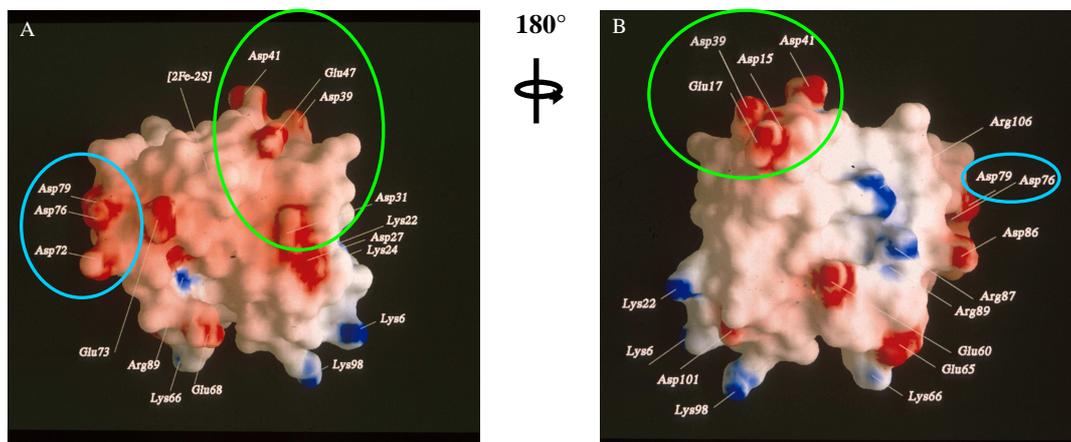


**Abb. 1.8: Bisher postulierte Mechanismen zum Elektronentransfer :**

(A+B): Das Shuttle-Modell von Lambeth mit Adrenodoxin (Adx), als Monomer (A) bzw. als Dimer (B). In beiden Fällen dient Adx als mobiler Carrier zwischen der Adrenodoxin-Reduktase (AdR) und dem Cytochrom (Cyt) P450 (Lambeth *et al.*, 1979). Ein anderes Modell schlägt die Bildung eines ternären Komplexes zwischen AdR, Adx und dem Cytochrom vor (C) (Kido & Kimura, 1979). Ein weiteres Modell postuliert eine Beteiligung von zwei Adrenodoxin-Molekülen (einmal oxidiert, einmal reduziert) am Elektronentransport und somit die Bildung eines quaternären Komplexes (D) (Hara & Kimura, 1989 a, b; Hara *et al.*, 2000). (E) Modell von Beilke (Beilke *et al.*, 2002): Das oxidierte Adx, das als Dimer vorliegt, wird durch die Reduktase reduziert. Die redoxabhängigen Änderungen vor allem in der C-terminalen Region des Adx führen zu einer Dissoziation des Dimers. Die so entstandenen reduzierten Adx Monomere an werden wiederum durch das Cytochrom oxidiert.

Im Gegensatz zu der immer noch ungeklärten Frage des Mechanismus wurde eine Reihe der an den Interaktionen der Redoxpartner Adx, AdR und CYP11A1 beteiligten

Aminosäuren durch chemische Modifikation und mittels ortsgerichteter Mutagenese eindeutig identifiziert (Vickery, 1997). Coghlan konnte z.B. zeigen, dass die Bindungsdomänen am Adrenodoxin für das Cytochrom P450 sowie für die Adrenodoxin-Reduktase überlappen (Coghlan & Vickery, 1991). Der Vergleich der atomaren Strukturen eines 1:1 Komplexes bestehend aus Adx und AdR (Müller *et al.*, 2001) mit biochemischen Untersuchungen und Computermodellierung bezüglich der Interaktion zwischen Adx und CYP11A1 (Usanov *et al.*, 2002) weist darauf hin, dass die Bindungsstellen für AdR und CYP11A1 auf der Adx Oberfläche nicht identisch sind. Die primäre Erkennungsregion für Redoxpartner des Adx ist die Interaktionsdomäne (His-56 bis Leu-90). Darüberhinaus wurden in letzter Zeit neue Interaktionsregionen wie zum Beispiel der azide Bereich um Asp-39 oder die den Eisen-Schwefel Cluster umgebende Schleife (Glu-47 und Ala-51) identifiziert (Hannemann *et al.*, 2001). Der Mechanismus der Erkennung von Redoxpartnern hängt hauptsächlich von elektrostatischen Interaktionen, begründet im Dipol-Charakter des Adx, ab (Grinberg *et al.*, 2000).



**Abb. 1.9: Molekulare Darstellung der Oberfläche von Adx(4-108) (Müller *et al.*, 1998):**

(A) Gefärbt wurde nach dem elektrostatischen Potential (negatives in rot, positives in blau). Die geladenen Aminosäurereste sind benannt. Der Eisen-Schwefel-Cluster [2Fe-2S] liegt in einer Vertiefung (oberer Teil der Figur). (B) Blick auf das Adx(4-108) nach einer Drehung von 180° um die vertikale Achse. Hellblau eingekreist ist die azide Region um Asp-76, welche als primäre Interaktionsdomäne gilt (Müller *et al.*, 2001). Grün eingekreist ist die sogenannte sekundäre Interaktionsdomäne oder crosslinking Domäne.

Die jeweils gleich geladenen Aminosäuren des Adx sind dicht zusammengedrängt und erzeugen ein auffallend asymmetrisches elektrisches Potential des Proteinmoleküls, welches eine Seite des Adx fast komplett sauer erscheinen lässt (Abbildung 1.9).

Diese asymmetrische Ladungsverteilung resultiert in einem großen Dipolmoment, das eine biologisch relevante Rolle während der Dockingprozesse zwischen Adx und seinen Elektronen-Donoren und Akzeptoren spielen könnte (Müller *et al.*, 1998). Das negative Ende dieses Dipol-Vektors des Adx durchdringt die molekulare Oberfläche in der Nähe der sauren Aminosäuren Asp-72, Glu-73, Asp-76 und Asp-79, die mit den positiv geladenen, basischen Aminosäuren der AdR beziehungsweise des CYP11A1 interagieren (Vickery, 1997; Müller *et al.*, 1998; Beckert & Bernhardt, 1997; Pikuleva *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2001). So stellt die Region zwischen Asp-76 und Asp-79 des Adx die primäre Interaktionsseite mit AdR (Aminosäuren Arg-240 und Arg-244; (Müller *et al.*, 2001)) dar, die entscheidend für die Bildung eines funktionellen Komplexes ist. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Region um die Aminosäuren Asp-72 und Glu-73 (Müller *et al.*, 2001) notwendig für die korrekte Bindung zwischen Adx und CYP11A1 (Aminosäuren Lys-405 und Arg-426 nach der Nummerierung von maturem CYP11A1) ist (Coghlan & Vickery, 1991, 1992; Usanov *et al.*, 2002).

Neben den oben genannten Regionen wird die Interaktion von Adx mit seinen Redoxpartnern, AdR und CYP11A1, auch durch das Redoxpotential des Adx beeinflusst. So verändert sich während des Elektronentransfers von AdR auf Adx das durchschnittliche Redoxpotential des Ferredoxins von -274 mV auf annähernd -360 mV. Auf der anderen Seite bleibt das Potential der Reduktase unverändert (-295 mV). Diese Änderung im Redoxpotential begünstigt die Dissoziation von reduziertem Adx aus dem Adx/AdR Komplex. Eine Modulation des Redoxpotentials kann auch während der Interaktion zwischen Adx und CYP11A1 beobachtet werden. Gebundenes Adx verschiebt das Redoxpotential der CYP11A1 Hämgruppe von -284 mV auf -314 mV. Dieser Effekt, welcher die Reduktion des Cytochroms erschwert, wird durch eine Änderung im Redoxpotential von Adx (von -274 mV auf -291 mV) kompensiert. Im Allgemeinen wird die Bindung von Adx an CYP11A1 durch die Anwesenheit von Cholesterol, dem natürlichen Substrat von CYP11A1, unterstützt (Lambeth *et al.*, 1980; Grinberg *et al.*, 2000).

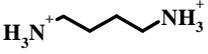
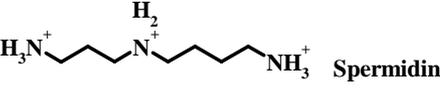
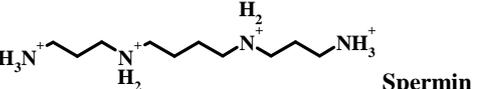
Dennoch wird der korrekte Erkennungsprozess zwischen Adx und seinen Redoxpartnern hauptsächlich durch elektrostatische Kontakte und Interaktionen gesteuert. Zieht man dies in Betracht, so erscheint es als mehr als wahrscheinlich, dass kleine organische Moleküle wie zum Beispiel Polyamine eine wichtige Rolle in der Kontrolle der enzymatischen Aktivität in Cytochrome P450 Systemen spielen können.

## 1.9 Polyamine

### 1.9.1 Allgemeine Aspekte und Metabolismus

1678 isolierte und erwähnte Antoni van Leeuwenhoek erstmals einige „dreiseitige“ Kristalle aus Sperma und anderen Körperflüssigkeiten des Menschen (van Leeuwenhoek, 1678). Das Vorkommen von Spermin in hohen Konzentrationen in der Samenflüssigkeit und seine erste Isolierung aus dieser gaben ihm seinen Namen (Ladenburg & Abel, 1888). Zwischen 1923 und 1927 wurde von Dudley, Rosenheim, Rosenheim und Werde die chemische Struktur von Spermin aufgeklärt (Dudley *et al.*, 1924; Dudley *et al.*, 1926). Gleichzeitig wurde es möglich, die Substanz zu synthetisieren. Spermidin wurde erstmals aus Ochsenpankreas isoliert und seine postulierte Struktur durch Vergleiche mit der bereits vorhandenen synthetischen Substanz bestätigt (Dudley *et al.*, 1927). Putrescin wurde zum ersten Mal als Abbauprodukt von Bakterien, die man in sich zersetzenden organischen Materialien fand, erwähnt. Die Struktur wurde wiederum durch einen Vergleich mit den synthetischen Diaminen verifiziert (Ladenburg, 1886; Udransky & Baumann, 1888). Trotz der frühen Kenntnisse über die chemische Struktur der Polyamine wurde die Biosynthese von Spermidin erst 1958 von Tabor (Tabor *et al.*, 1958) und die von Spermin 1968 von Pegg und Williams-Ashman (Pegg & Williams-Ashman, 1968) beschrieben. Das Verständnis der Bedeutung von Polyaminen in biologischen Prozessen machte erst in den 1970er Jahren Fortschritte.

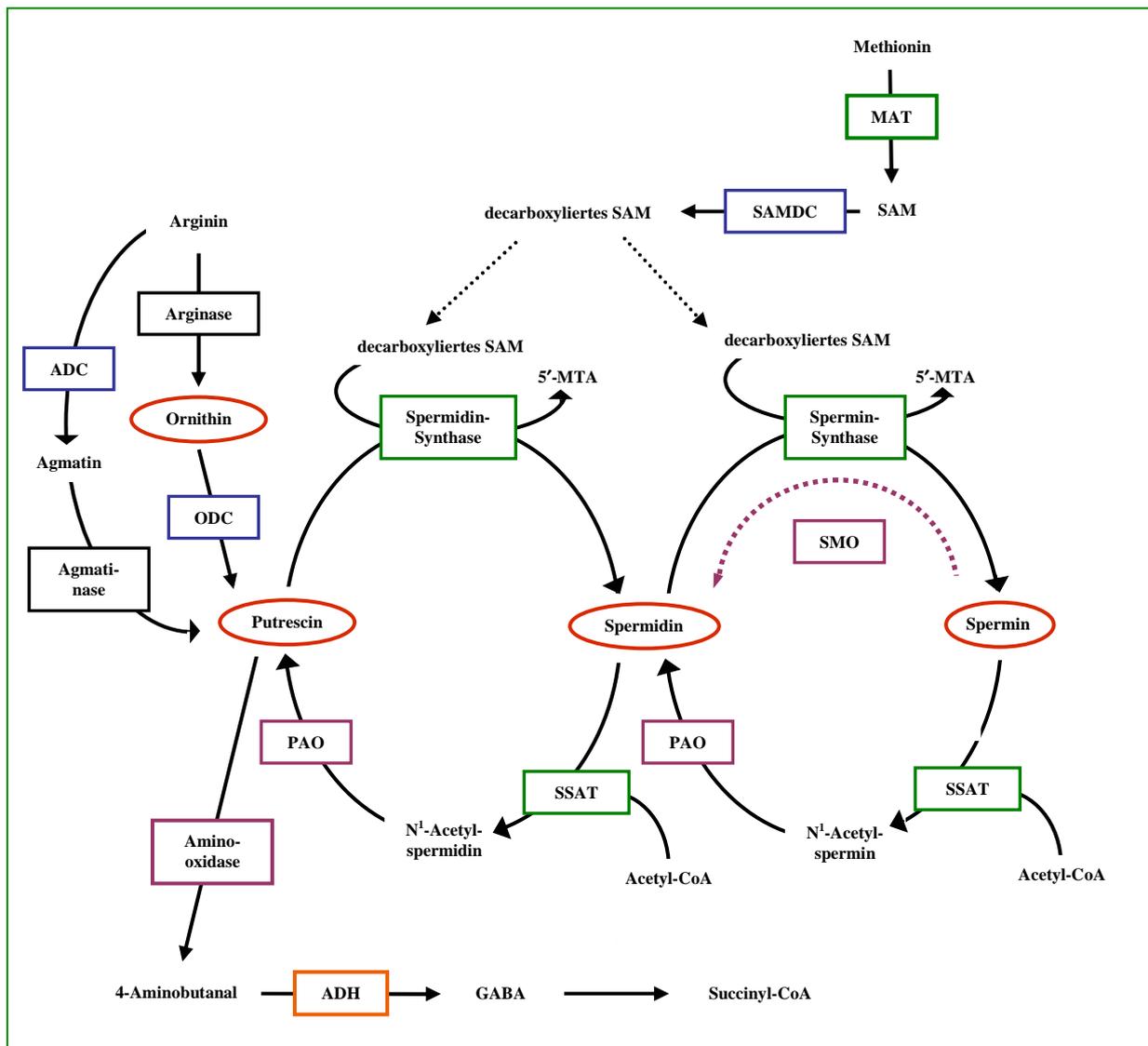
Die biogenen und bedeutenden Polyamine Putrescin (1,4-Butandiamin), Spermidin (*N*-(3-Aminopropyl)butan-1,4-diamin) und Spermin (*N,N'*-Bis(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin) (**Abbildung 1.10**) sind in allen Geweben von fast allen lebenden Spezies mit Ausnahme von zwei Arten der Archaea, Methanobakterien und Halobakterien zu finden (Bachrach, 1973; Wallace *et al.*, 2003). Während prokaryotische Zellen hauptsächlich Putrescin und Spermidin aufweisen, enthalten eukaryotische Zellen zusätzlich noch Spermin. Einige Pflanzen sowie Algen und einige Bakterienarten besitzen auch Analoga von Putrescin, Spermidin oder Spermin, ausgehend von der Struktur des 1,3-Propandiamins oder des Cadaverin (1,5-Pentandiamin) (Hamana & Matsuzaki, 1982, 1985; Fujihara *et al.*, 1995). Unter physiologischen Bedingungen liegen die Polyamine in polykationischer Form vor, verändern ihre Konzentration während des Zellzyklus, wobei sie die millimolare Zellkonzentration erzielen bzw. überschreiten ((Morrison & Kish, 1995; Bettuzzi *et al.*, 1999); **Abbildung 1.10**).

	$\text{pK}_1$	$\text{pK}_2$	$\text{pK}_3$	$\text{pK}_4$
 Putrescin	10,7	9,4		
 Spermidin	10,9	9,8	8,2	
 Spermin	10,8	10,0	8,9	8,0

**Abb. 1.10: Chemische Strukturen der bedeutenden natürlichen Polyamine.**

Unter physiologischen Bedingungen existieren die Polyamine in einer polykationischen Form.  $\text{pK}$  Werte stammen von Bencini (Bencini *et al.*, 1999).

Putrescin, Spermidin und Spermin sind Produkte des Ornithin-Metabolismus. Sie werden direkt aus den beiden Vorläufern L-Arginin und L-Methionin synthetisiert (**Abbildung 1.11**). Ornithin und S-Adenosylmethionin (SAM) werden aus diesen Aminosäuren mittels Arginase beziehungsweise Methioninadenosyltransferase (MAT) gebildet. Ausgehend von Arginin wird Ornithin durch die Ornithindecarboxylase (ODC), einem Pyridoxal-5-phosphat verbrauchendem Enzym, direkt zu Putrescin decarboxyliert. Pflanzen und einige Bakterien stellen aus Arginin mit Hilfe der Arginindecarboxylase (ADC) zuerst Agmatin her, das durch die Agmatiniminohydroxylase (AIH)/Agmatinase zu Carbamilputrescin und dieses zu Putrescin umgewandelt wird.  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), ein wichtiger Neurotransmitter, entsteht durch Decarboxylierung von Glutamat durch die Glutamatdecarboxylase (GDC) oder durch den katabolischen Abbau von Putrescin durch Diaminoxidase und GABA-Dehydrogenase. Zur Gewinnung von Spermidin und Spermin addiert die Spermidinsynthase zuerst eine Aminopropylfunktion an Putrescin zur Bildung des Triamins Spermidin. An dieses addiert die Sperminsynthase wiederum eine Aminopropylfunktion zur Bildung von Spermin. Der zu übertragende Aminopropylrest stammt aus der decarboxylierten Form des S-Adenosylmethionis, das durch das Enzym S-Adenosylmethionin-Decarboxylase (SAMDC) gebildet wird. **Abbildung 1.11** fasst die verschiedenen Wege zusammen.



**Abb. 1.11: Wege des Polyaminstoffwechsels**

Abkürzungen: Aldehyddehydrogenase (ADH),  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), Arginindecarboxylase (ADC), Methioninadenosyltransferase (MAT), 5'-Methylthioadenosin (5'-MTA), Ornithindecaboxylase (ODC), Polyaminoxidase (PAO), S-Adenosylmethionin (SAM), S-Adenosylmethionindecaboxylase (SAMDC), Spermidin/Spermin-N<sup>1</sup>-acetyltransferase (SSAT). Für eine detaillierte Beschreibung siehe Text.

Die Polyamin-Biosynthese kann durch eine Abfolge katabolischer Serien von Oxidationen wieder rückgängig gemacht werden (**Abbildung 1.11**). Der erste Schritt der gegenseitigen Rückwandlung der Polyamine wird katalysiert durch die Spermidin/Spermin-N<sup>1</sup>-Acetyltransferase (SSAT). Dieses Enzym überträgt den Acetylrest eines Acetylcoenzym A auf die N<sup>1</sup>-Position eines Spermin- bzw. eines Spermidinmoleküls. Das so gebildeten N<sup>1</sup>-Acetylspermin bzw. N<sup>1</sup>-Acetylspermidin wird durch die Polyaminoxidase (PAO) wieder zu

Spermidin und Putrescin degradiert. Methylthioadenosin (MTA), ein Nebenprodukt der Polyamin-Biosynthese, kann über einen Multi-Enzym-Weg durch Umwandlung zu S-Adenosylmethionin wieder zurückgewonnen werden. Die PAO Reaktion führt stoichiometrisch auch zu 3-Acetamidopropanal und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welche zu Toxizität und Zelltod führen können. Die acetylierten Zwischenprodukte werden kaum in gesunden Zellen gefunden, da sie hauptsächlich aus den Zellen exportiert werden. In Krebszellen sind sie allerdings in hoher Konzentration nachweisbar. Auch ist bei Krebs die Ausscheidungsrate der Polyamine deutlich erhöht (**Tabelle 1.2**, Pigulla & Röder, 1978; Rothe *et al.*, 1991).

**Tabelle 1.2: Polyamingehalte im Urin von Tumorpatienten (modifiziert von Rothe *et al.*, 1991 nach Pigulla & Röder, 1978)**

Tumor	Putrescin (µg/ml Urin)	Spermidin (µg/ml Urin)	Spermin (µg/ml Urin)
karzinomfrei	0,11	0,12	1,54
Lungenkarzinom	2,90	1,92	2,71
hämatol. Karzinom	4,40	3,70	0,80
solides Karzinom	3,70	2,70	0,60

In Tierzellen kann Spermin mittels der Sperminoxidase (SMO), die die acetylierte Form als Substrat vorzieht, direkt zu Spermidin umgewandelt werden. Spermidin dient als Precursor auch für die Synthese von Hypusine, einer ungewöhnlichen Aminosäure des eukaryotischen Initialtionsfaktors 5A (eIF5A), welcher essentiell für die eukaryotische Zellproliferation ist.

Hauptsächlich drei Enzyme bestimmen über das Ausmaß von Bildung und Abbau der Polyamine. Dies sind die Enzyme ODC, SAMDC und SSAT, deren Fluktuation in einem für Enzyme extrem kurzen Zeitfenster erfolgt ( $t_{1/2} = 5-35$  min). Auch das Antizym (AZ) ist ein zentrales Element zur Kontrolle der zellulären Polyaminkonzentration. Es ist in der Lage, eines der Schlüsselenzyme der Polyaminbiosynthese, die Ornithindecaboxylase (ODC), zu inhibieren bzw. zu zerstören. Gleichzeitig beeinflusst sie die Polyamin-Exkretion und – Aufnahme. Weiterhin vermag es, verschiedene zelluläre Aufnahmemechanismen für Polyamine zu verhindern. Mittlerweile kennt man drei verschiedene Isoformen des Antizyms. Intrazelluläre Polyaminlevel werden auch über aktive Transportersysteme ständig verändert. Der Polyamintransport in Säugetierzellen ist spezifisch, energieabhängig, Carrier-unterstützt und benötigt in einigen Fällen die Synthese von Proteinen und das Vorhandensein von RNA. Eine erhöhte Transportaktivität kann durch wachstumsfördernde Bedingungen erzielt werden.

Viele Zellsysteme besitzen sowohl allgemeine Transportersysteme für Polyamine als auch eigene Transporter für Spermidin und Spermin. Wird die zelluläre Polyaminsynthese inhibiert, ist das Zellwachstum stark eingeschränkt oder gestoppt. Die Aufnahme von exogenen Polyaminen stellt das Zellwachstum wieder her. Die meisten eukaryotischen Zellen besitzen ein Polyamintransportsystem in ihrer Zellmembran, das den Import von exogenen Polyaminen ermöglicht. Dieses System ist höchst wirksam in sich stark vermehrenden Zellen und ist das Ziel einiger Chemotherapeutika, die zurzeit entwickelt werden.

Ein Überschuß an Polyaminen ist in Zellsystemen ein Auslöser von Apoptose, während ein entsprechender Mangel apoptotische Prozesse verzögern kann (Seiler & Rauf, 2005). Diese Aktivitäten sind essentiell für die normale embryonale Entwicklung, Differenzierung, Zellstabilisierung und Wundheilung. Polyamine können aufgrund ihrer proliferativen Eigenschaften auch metastasierend auf das Wachstum von Krebszellen wirken. Im Hinblick auf Chemoprävention und chemotherapeutische Interventionen bestehen zahlreiche therapeutische Bemühungen darin, in den Polyamin-Metabolismus selektiv einzugreifen.

### 1.9.2 Funktionen und Interaktionen der Polyamine

Polyamine stellen strukturell aliphatische Amine dar, wobei bei physiologischen Bedingungen (pH 7,4) sowohl die endständigen Amino-, als auch die intramolekularen Iminogruppen protoniert vorliegen (Tabor & Tabor, 1984; Seiler, 1987; Seiler & Heby, 1988; Bencini *et al.*, 1999). Sie besitzen ähnliche Eigenschaften wie die zweiwertigen, anorganischen Kationen  $Mg^{2+}$  oder  $Ca^{2+}$  (Tabor & Tabor, 1984). Allerdings besitzen sie keine Punktladungen, sondern ihre Ladung ist über das ganze Molekül verteilt (Schuber, 1989). Diese Eigenschaft ermöglicht es den hochgeladenen, flexiblen Polykationen, elektrostatische Interaktionen mit Nukleinsäuren, Membranphospholipidsäuren und einer Vielzahl von polyanionischen Makromolekülen, sowohl in der Zelle als auch im extrazellulären Raum, einzugehen (Tabor & Tabor, 1984; Cohen, 1998). Die Polyamine sind hauptsächlich im Zellkern und in den Ribosomen konzentriert (Sarhan & Seiler, 1989). Elektrostatische Interaktionen der Polyamine mit der DNA und der RNA sind hinreichend bekannt und eine Vielzahl von Untersuchungen beschreiben die resultierende Stabilisierung dieser doppelsträngigen Nukleinsäuren, indem sie stark an jeden einzelnen der beiden Stränge binden und diese so zusammenhalten (Feuerstein *et al.*, 1989; Ruiz-Chica *et al.*, 2001; Ouameur & Tajmir-Riahi, 2004). Obwohl die Polyamine in den Zellen über sehr geregelte Wege synthetisiert werden, ist ihre eigentliche Funktion noch nicht eindeutig geklärt. Eine

Reihe von bekannten Funktionen biogener Polyamine wie Spermidin und Spermin beinhalten, wie in **Kapitel 1.9.1** kurz dargelegt, Zellwachstum, sowohl von eukaryotischen als auch prokaryotischen Zellen, Zellbindung, Zellmigration und Zellzyklusregulation und andere wichtige biologische Prozesse (Pegg & McCann, 1982; Pegg, 1988; Heby & Persson, 1990; Cohen, 1998; Bachrach, 2004).

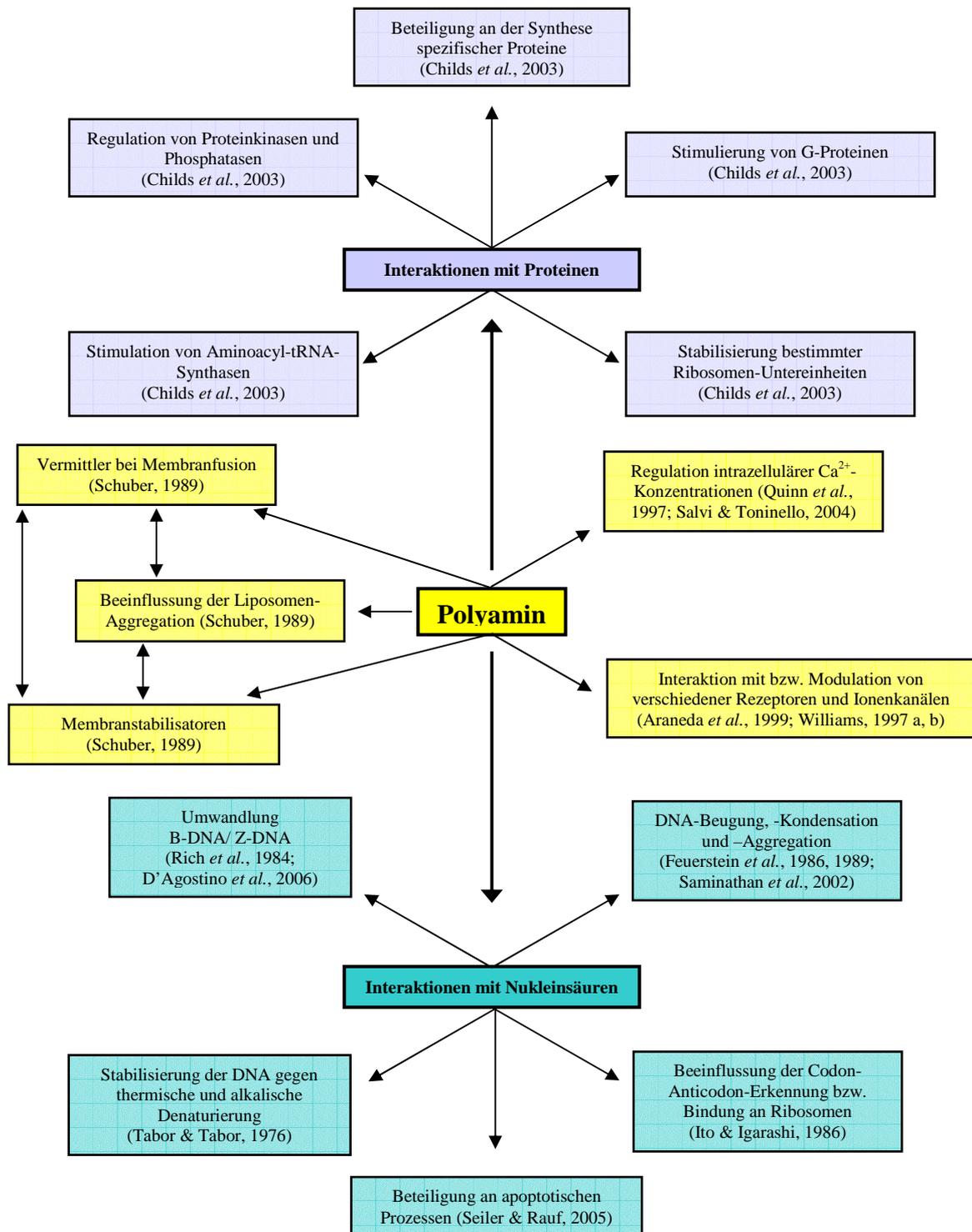


Abb. 1.12: Übersicht über die Funktionen und Interaktionen der Polyamine.

Zusätzlich liegen Erkenntnisse zum Einfluß der Polyamine bezogen auf die Chromatinstruktur, Immunsystemfunktionen, Ionenkanäle, Membranstabilisierung, Neurochemie, verschiedene Zellsignalisierung, Nukleinsäure- und Proteinbiosynthese (Matthews, 1993) und Zellentwicklung vor.

Bindung, Transport und Metabolismus der Polyamine erfolgt aufgrund elektrostatischer Interaktionen mit spezifischen Proteinen. So assoziieren Polyamine hauptsächlich durch elektrostatische Kräfte an Rezeptoren und Ionenkanälen und modulieren deren Funktionen. Beispiele hierfür sind die N-Methyl-D-aspartat (NMDA) Rezeptoren (Araneda *et al.*, 1999), der  $\text{Ca}^{2+}$  spezifische Rezeptor (Quinn *et al.*, 1997), die AMPA ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure) Rezeptoren und die inward-rectifier  $\text{K}^+$ -Kanäle (Williams, 1997 a, b). Darüber hinaus können sie einige Enzyme, wie die Serin/ Threonin Proteinkinase CK2, aktivieren.

### 1.10 Aufgabenstellung

Das Gesamtziel dieser Arbeit war es, die vielfältigen Aspekte und Möglichkeiten der Einflussnahme der natürlichen Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin auf die Protein-Protein Interaktionen zwischen den einzelnen Komponenten des bovinen mitochondrialen Steroidhydroxylierungssystems *in vitro* zu untersuchen.

Berücksichtigt man die elektrostatische Natur der Interaktion, die diesem Multikomponenten Elektronentransfersystem zu Grunde liegt und die negativ geladenen Aminosäurereste auf der Adx-Oberfläche, so können kleine, flexible, mehrfach positiv geladene, natürlich vorkommende Moleküle wie die Polyamine einen erheblichen Einfluss auf die Funktionalität und das Verhalten dieser Proteine im einzelnen und untereinander, vor allem aber auf das Adx, ausüben. In diesem Zusammenhang ist es von besonderem Interesse zu bestimmen, ob kleine körpereigene Moleküle wie die Polyamine fähig sind, den Elektronentransfer zwischen Adx und seinen Redoxpartnern direkt zu beeinflussen. Bis jetzt sind die Effekte kleiner Moleküle auf das komplexe System der Elektronentransferketten des Steroidhydroxylasesystems weitgehend unbekannt.

Zum einen können diese Untersuchungen neuartige Mechanismen zeigen, die die Protein-Protein Interaktionen im allgemeinen und dieses mitochondriale Elektronentransfersystems im besonderen kontrollieren. Zum anderen können die Ergebnisse einen ersten Hinweis geben, ob die Modulation der Cytochrome durch Störung der Protein-Protein Interaktionen eine Alternative für die auf das aktive Zentrum gerichteten Inhibitoren, die erfolgreich in der Krebstherapie appliziert werden, sein können.

Obwohl das bovine Steroidhydroxylierungssystem schon unter zahlreichen kinetischen Gesichtspunkten untersucht wurde, wurde bis heute keine komplette kinetische Analyse der unterschiedlichen Redoxprozesse, die in diesen Elektronentransfersystem stattfinden, in Anwesenheit von möglichen Modulatoren der Protein-Protein-Schnittstellen publiziert. Daher mussten, um die möglichen Effekte kleiner Moleküle auf Adx und auf die Interaktion mit seinen Redoxpartnern funktionell charakterisieren zu können, die unterschiedlichen Reaktionsschritte, die in der bovinen mitochondrialen Elektronentransferkette auftreten, einzeln mit solchen hochmodernen *in vitro* Techniken wie Stopped-Flow oder der Oberflächenplasmonresonanz (Biacore) untersucht werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Polyamine auf die sekundäre Interaktionsdomäne des Adx ausüben. Hierzu wurden vier Adx-Mutanten (AdxD15K, AdxD15N, AdxD39K und AdxD39N) eingesetzt, die entweder direkt in der von Müller *et al.* mittels Cross-link postulierten sekundären Interaktionsdomäne (D39) oder in unmittelbarer Umgebung (D15) liegen (Müller *et al.*, 1998). Hierzu wurden ergänzend zu den bereits erwähnten Methoden noch Charakterisierungen mittel Circular dichroismus durchgeführt.

Die experimentell erhaltenen Daten zur Interaktion der Komponenten des CYP11A1-Steroidhydroxylierungssystems mit den Polyaminen wurden mit Modelling-Studien verglichen. Diese Computersimulationen wurden von Frau M.Sc. Susanne Eyrisch als Teil einer Kooperation zwischen unserer Gruppe und der Gruppe von Herrn Prof. V. Helms, Zentrum für Bioinformatik, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, durchgeführt.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Geräte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren, falls nicht anders erwähnt, von höchster Reinheit und stammten von üblichen Bezugsquellen. Eine Liste der verwendeten Geräte befindet sich im Anhang.

#### 2.1.2 Verwendete Plasmide und *E.coli* Stämme

Das Expressionsplasmid pKKHC erhielten wir von Dr. T. Porter, University of Kentucky, Lexington, KY (Porter & Larson, 1991), die AdxWT cDNA von Dr. Waterman, Vanderbilt University, Nashville, TN. pKKHC-AdxWT und die Adx Mutanten pKKHC-AdxD15K, pKKHC-AdxD15N, pKKHC-AdxD39K und pKKHC-AdxD39N wurden zuvor in unserer Gruppe kloniert und in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Das Plasmid, welches die Codierungssequenz für die bovine AdR (pBAR1607) trägt, wurde freundlicherweise von Dr. Sagara (Sagara *et al.*, 1987) zur Verfügung gestellt. AdR wurde in *E. coli* JM109 exprimiert.

#### 2.1.3 Proteine

Die Reinigungen von bovinem AdxWT, AdxD15K, AdxD15N, AdxD39K und AdxD39N wurden nach einem in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll (Uhlmann *et al.*, 1992) von Frau Katharina Bompais und Herrn Wolfgang Reinle durchgeführt. Bovines AdR wurde nach der publizierten Prozedur nach Sagara *et al.* (Sagara *et al.*, 1993) von Frau Katherina Bompais gereinigt. Isolierung und Reinigung von CYP11A1 aus Rinder-Nebennieren wurde von Herrn Wolfgang Reinle nach bereits publizierten Protokollen (Akhrem *et al.*, 1979; Lepasheva & Usanov, 1998) durchgeführt.

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Kultivierung und Transformation

Sofern nicht anders angegeben, wurden die *E. coli* Zellen in Nährbouillion I (NB I Medium, Sifin) bei 37°C und 180 Umdrehungen pro Minute (UpM) angezogen. Die Medien, welche zur Kultivierung der transformierten *E. coli* Zellen verwendet wurden, enthielten immer Ampicillin mit der Endkonzentration von 100 µg/ml (BL21(DE3)). Die Transformation der DNA in die kompetenten *E. coli* Zellen erfolgte mittels Hitzeschock (90 sec bei 42°C; Sambrook *et al.*, 1989). Kompetente *E. coli* Zellen wurden nach einem Protokoll von Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989) hergestellt.

#### 2.2.2 Heterologe Proteinexpression

Für die heterologe Expression des AdxWT und der Mutanten AdxD15K, AdxD15N, AdxD39K und AdxD39N wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) verwendet. Die für den Wildtyp und der Mutanten codierende cDNA war in den Expressionsvektor pKKHC inkloniert. Frisch transformierte *E. coli* BL21(DE3) Zellen wurden zu einer Vorkultur herangezogen. Die Bakterien wurden in Ampicillin enthaltenden NB I Medium (siehe **Abschnitt 2.2.1**) über Nacht bei 37°C kultiviert. Mit diesen Vorkulturen wurden jeweils mit Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) versetzte 4 x 1 Liter Hauptkulturen inokuliert und bei 37°C, 180 UpM für 20 h inkubiert. Bei einer optische Dichte (OD<sub>600</sub>) zwischen 0,7 und 1 wurde die heterologe Proteinbiosynthese durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) gestartet. Die Kulturen wurden bei 37°C, 180 UpM für mindestens 16 h herangezogen. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 4000 g (4°C) für 20 min in einer Beckmann Coulter-Zentrifuge (Avanti J-20). Die erhaltenen *E. coli* Pellets wurden bei -20°C zwischengelagert.

#### 2.2.3 Proteinreinigung

Alle weiteren Reinigungsschritte wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei 4°C durchgeführt. Die geernteten Bakterienpellets wurden in Lysepuffer (20 mM Tris/HCl, pH 8,3, 1 mM EDTA, 20 mM NaCl) unter Zugabe des Serin-Proteaseinhibitors PMSF (100 µg/ml) resuspendiert und mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Dazu wurde ein Ultraschall-Desintegrator (USD 30) (2/8 Zoll Sonotrode, Fa. Emich) mit folgendem Programm verwendet.

Sondentyp	1
Amplitude	50 hz
Gesamtdauer	20 min
Puls	30 sek
Ratio	1 (30 sek Beschallung gefolgt von einer 30 sek langen Pause)
Temperatur	4°C
Rührgeschwindigkeit	100 UpM
Vorrührzeit	0 min

Anschließend wurde die Suspension bei 30000 UpM, 30 min zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde mittels weiterer säulenchromatographischer Reinigungsschritte aufgereinigt. Unter konstantem Rühren wurde dem Lysat innerhalb von 20 min langsam feinermahlene Ammoniumsulfat bis zu einem Sättigungsgrad von 50 % (31,3 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/100$  ml Überstand) zugegeben. Nach der Salzzugabe wurde für weitere 15 min gerührt, um eine vollständige Fällung von Proteinen bei diesem Sättigungsgrad an Ammoniumsulfat zu gewährleisten, anschließend wurde bei 19000 g, 4°C, 20 min (Beckmann, J2-21) zentrifugiert. Der nach der Zentrifugation verbliebene Überstand wurde einer hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) unterzogen

Die verwendete TP-Butyl-Sepharose-Säule wurde mit Puffer A (50 mM Tris/HCl, pH 9, 2 M Ammoniumsulfat) äquilibriert und mit dem aus der Ammoniumsulfatfällung verbliebenen adrenodoxinhaltigen Überstand beladen. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten, der Puffer A sukzessive durch Puffer B (50 mM Tris/HCl, pH 9, 1 M Ammoniumsulfat) austauscht.

### Elutionsprogramm für die HIC-Säule:

	1,5 ml/min
0 ml - 10 ml	100 % Puffer A
10 ml - 50 ml	linearer Gradient (0 % - 30 % Puffer B)
50 ml - 140 ml	linearer Gradient (30 % - 100 % Puffer B)
140 ml - 240 ml	100 % Puffer B

Von den gesammelten Fraktionen wurde im Spektralphotometer (Shimadzu UV-2101 PC) ein Spektrum zwischen 700 nm und 200 nm aufgezeichnet und die adrenodoxinhaltigen Fraktionen gesammelt. Kriterium für die Güte der Fraktionen war der sogenannte Q-Wert, der Quotient aus den Absorptionen bei 440 nm (Absorptionsmaximum von Adrenodoxin) und 276 nm (allgemeiner Proteinpeak). Fraktionen mit einem Q-Wert ab 0,3 wurden gesammelt und für die weitere Aufreinigung verwendet.

Nachdem der Ammoniumsulfatgehalt der Lösung wieder auf 2 M eingestellt wurde (Zugabe von 0,194 g Ammoniumsulfat/1 ml Lösung), wurden die gesammelten Fraktionen auf eine HIC-Konzentrierungssäule (TP-Butyl) gegeben, mit 20 mM Tris/HCl pH 7,4 eluiert und unter Verwendung eines starken Anionenaustauschers weiter aufgereinigt.

Die verwendete DEAE-Fraktogel-Säule wurde mit Puffer C (20 mM Tris/HCl, pH 7,4) äquilibriert und die gesammelten Fraktionen aus der HIC-Säule aufgetragen, nachdem sie 30-fach mit Puffer C verdünnt wurden. Zur Elution wurde 20 mM Tris/HCl, pH 7,4, 0,4 M NaCl (Puffer D) verwendet.

### Elutionsprogramm von der DEAE-Säule:

	1,5 ml/min
0 ml - 20 ml	100 % Puffer C
20 ml - 30 ml	linearer Gradient (0 % - 20 % Puffer D)
30 ml - 100 ml	linearer Gradient (20 % - 50 % Puffer D)
100 ml - 150 ml	linearer Gradient (50 % - 70 % Puffer D)
150 ml - 200 ml	linearer Gradient (70 % - 100 % Puffer D)
200 ml - 250 ml	100 % Puffer D

Die Q-Werte für die gesammelten Fraktionen wurden bestimmt und die Fraktionen mit einem Q-Wert über 0,5 für die anschließende Gelfiltration mittels CENTRICON 10 auf ein Volumen zwischen 1,5 und 2 ml eingeengt.

Das Prinzip der Gelfiltration beruht auf der Trennung der Moleküle nach Größe, wobei die Gelmatrix als Molekularsieb wirkt. Als Säulenmaterial wurde Superdex 75 (Amersham-Pharmacia GmbH), das sich für die Trennung globulärer Proteine von 3 bis 70 kDa eignet, in einer Säule von 60 cm Länge und 1,6 cm Durchmesser verwendet. Die Säule wurde mit 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 äquilibriert und die konzentrierten Fraktionen auf die

Säule geladen. Bei einer Flussrate von 0,2 ml/min wurde mit dem gleichen Puffer eluiert, wobei eine Umpufferung erfolgte. Wiederum wurden Q-Werte der Fraktionen bestimmt und Fraktionen mit einem Q-Wert > 0,9 gesammelt, mittels CENTRICON 10 eingengt, aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert.

### 2.2.4 UV/Vis Spektroskopie

UV/Vis Spektren der verschiedenen Adx Spezies wurden zur Bestimmung der Proteinkonzentration und der Reinheit der Adx Präparationen aufgenommen. Zusätzlich dienten diese Spektren als eine erste Charakterisierung, die auf mögliche strukturelle Änderungen der mutierten Proteine im Vergleich zum Adx Wildtyp hinweisen könnten. Die Spektren der oxidierten Adx Spezies (20  $\mu\text{M}$ ) wurden bei Raumtemperatur mit einem Shimadzu Zweistrahlenspektrophotometer (UV2100PC) im Bereich von 350 bis 700 nm aufgenommen.

Die Adx Konzentration wurde mittels des Lambert-Beer-Gesetzes mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon_{415} = 9,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Huang & Kimura, 1973) bestimmt. Die Reinheit der Adx Präparationen wurde über das Verhältnis zwischen  $A_{415}$  (Maximum des oxidierten Adx) und  $A_{278}$  (Absorption von aromatischen Aminosäuren) bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient zur Bestimmung der AdR-Konzentration war  $\epsilon_{450} = 10,9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Chu & Kimura, 1973 a, b). Die CYP11A1 Konzentration wurde mittels Kohlenstoffmonooxid-Differenzspektren mit  $\epsilon_{450-490} = 91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Omura & Sato, 1964 a, b) bestimmt.

### 2.2.5 Circular dichroismus (CD)

Eine der schnellsten Methoden zur Konformationsanalyse von Peptiden ist die Circular dichroismusspektroskopie (CD-Spektroskopie) (Pingoud, 1997; Lottspeich, 1998). Circular dichroismus nutzt die Wechselwirkung optisch aktiver Substanzen mit polarisiertem Licht und analysiert die unterschiedliche Absorption in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Optische Aktivität entsteht durch Einführung eines chiralen Zentrums in ein Molekül. Im Gegensatz zur normalen Absorptionsspektroskopie muss polarisiertes Licht verwendet werden. Bei einer natürlichen Lichtquelle sind die Vektoren des elektromagnetischen Feldes isotrop im Raum verteilt. Durch Zwischenschaltung eines Polarisators wird linear polarisiertes Licht erzeugt, das nur in einer Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung schwingt. Eine solche linear polarisierte Welle lässt sich zusätzlich in zwei circular polarisierte Komponenten zerlegen, bei denen die Vektoren um die Ausbreitungsrichtung rotieren (links und rechts

polarisiert). In solchen optisch aktiven Strukturen ist die Lichtgeschwindigkeit für linksgerichtetes (polarisiert gegen den Uhrzeigersinn) und rechtsgerichtetes (polarisiert im Uhrzeigersinn) circular polarisiertes Licht unterschiedlich groß (Holtzhauser, 1996).

Fällt daher circular polarisiertes Licht auf eine Probe mit einer optisch aktiven Substanz (die Probe wird bei jeder Wellenlänge abwechselnd mit jeder Komponente durchstrahlt), so tritt nach dem Durchlaufen der Probe eine Polarisationskomponente gegenüber der anderen verzögert auf. Die optisch aktive Substanz hat somit unterschiedliche Brechungsindices für links- bzw. rechtspolarisiertes Licht. Der jeweilige Intensitätsverlust kann gemessen werden, da die beiden links und rechts circular polarisierten Lichtstrahlen unterschiedliche Geschwindigkeiten haben und durch die Substanz in unterschiedlichen Winkeln absorbiert werden, die Substanz also elliptisch polarisieren. Die Elliptizität ergibt sich als Differenz, wird vom Gerätecomputer ermittelt und als Funktion der Wellenlänge bzw. der Temperatur dargestellt. Alle CD-Experimente wurden in 5 mM HEPES (pH 7,4) mit 0,05% Tween20 durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug dabei jeweils 20  $\mu$ M. Um Hintergrundsignale zu reduzieren, wurde die Probenkammer während aller Messungen mit Stickstoff (3 l/min) gespült. Mögliche Änderungen in der unmittelbaren Umgebung des Eisen-Schwefel Clusters der oxidierten Adx Mutanten wurden in einem Bereich von 250 nm bis 650 nm mit 1 cm dicken Quarzküvetten analysiert. Potentielle strukturelle Änderungen in der Sekundärstruktur der oxidierten Adx Mutanten wurden durch CD Messungen im Bereich von 195 zu 260 nm untersucht. Diese Experimente wurden in 0,1 cm dicken Quarzküvetten durchgeführt.

Das thermische Verhalten der verschiedenen mutierten Proteine wurde mit temperaturabhängigen CD Messungen analysiert. Dabei wurde die Abnahme des maximalen CD-Signals (439 nm) zwischen 20°C und 70°C bei einer Heizrate von 60°C/h und einer Temperaturzunahme von 0,1°C betrachtet. Die Auswertung erfolgte mit der Software SigmaPlot2001. Die Entfaltungstemperatur ( $T_d$ -Werte) wurden aus den CD Scans mit einem nichtlinearen Regressionsprogramm (Privalov, 1979) berechnet. Alle CD-Messungen wurden mit einem Jasco 715 Spektropolarimeter durchgeführt.

### 2.2.6 Redoxpotentialbestimmung

Zur Messung des Redoxpotentials wurde die von Sligar und Gunsalus entwickelte Technik verwendet (Sligar & Gunsalus, 1976). Diese Methode basiert auf der durch Licht induzierten Reduktion des Farbstoffs Safranin T, der ein Redoxpotential von -289 mV besitzt. Ist ein Protein mit einem positiveren Redoxpotential anwesend, so werden die Elektronen von dem reduzierten Farbstoff zu dem Protein übertragen, bis ein chemisches Gleichgewicht

erreicht ist. Da es während der Reduktion des Farbstoffes als auch des Proteins zu Farbveränderungen kommt, kann die Reaktion spektroskopisch verfolgt werden. In diesem Fall wurden die Absorptionsänderungen bei 520 nm (Reduktion des Safranin T) und 415 nm (Reduktion des Adx) gemessen. Die abschließende Bestimmung des Standardpotentials für Adx erfolgte durch Lineare Regression mittels SigmaPlot9.0.

### 2.2.7 *In vitro* Rekonstitutionsassays

*In vitro* Rekonstitutionsassays wurden zur Analyse der Effekte, die die Polyamine auf die Produktbildung des CYP11A1-Steroidhydroxylierungssystems ausüben, durchgeführt. Die Seitenkettenabspaltung von Cholesterol durch CYP11A1 zur Bildung von Pregnenolon wurde in einem *in vitro* System nach der Vorschrift von Sugano *et al.* (Sugano *et al.*, 1996) mit geringfügigen Modifikationen durchgeführt. Alle Ansätze wurden bei 37°C und in 50 mM HEPES Puffer (pH 7,4), versetzt mit 0,05% Tween20 und den Polyaminen in unterschiedlichen Endkonzentrationen (0 - 6 mM), durchgeführt. Die Proben setzten sich zusammen aus 0,5 µM AdR, Adx in zwei Konzentrationen (0,5 µM und 5 µM), 0,5 µM CYP11A1, 400 µM Cholesterol und einem NADPH-Regenerierungssystem bestehend aus MgCl<sub>2</sub> (1 µM), Glucose-6-phosphat (5 µM) und Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (1 U). Die Substratumwandlung wurde durch Zugabe von NADPH (100 µM) gestartet und nach 10 min durch Kochen der Proben bei 95°C gestoppt. Nach dem Abkühlen auf 37°C wurde Cholesteroxidase hinzugefügt, welches die Steroide in ihre respektive 3-on-4-en Form, das heißt zu Cholestenon und Progesteron, umwandelt. Nach weiteren 10 min wurde die Reaktion durch die Zugabe von Chloroform terminiert und die Steroide in der organischen Phase extrahiert. Nach Evaporation der Chloroformphase und Resuspension in 200 µl Acetonitril wurden die Steroide durch Injizieren von 50 µl auf einem Jasco Reverse Phase HPLC System der LC800 bzw. der LC2000 Serie mit einer 3,9 x 150 mm Waters Nova-Pak C<sub>18</sub>-Säule getrennt. Die Säulentemperatur wurde mittels eines Peltier-Elementes bei 40°C konstant gehalten. Zur Steroidtrennung wurde als mobile Phase ein Gemisch aus Acetonitril:Isopropanol (30:1) gewählt. Die jeweilige Produktquantifizierung erfolgte durch Korrelierung der Peakfläche des Produkts mit der Peakfläche von 5 nmol Cortisol, welches als interner Standard dem Gemisch vor der Chloroformextraktion hinzugefügt wurde.

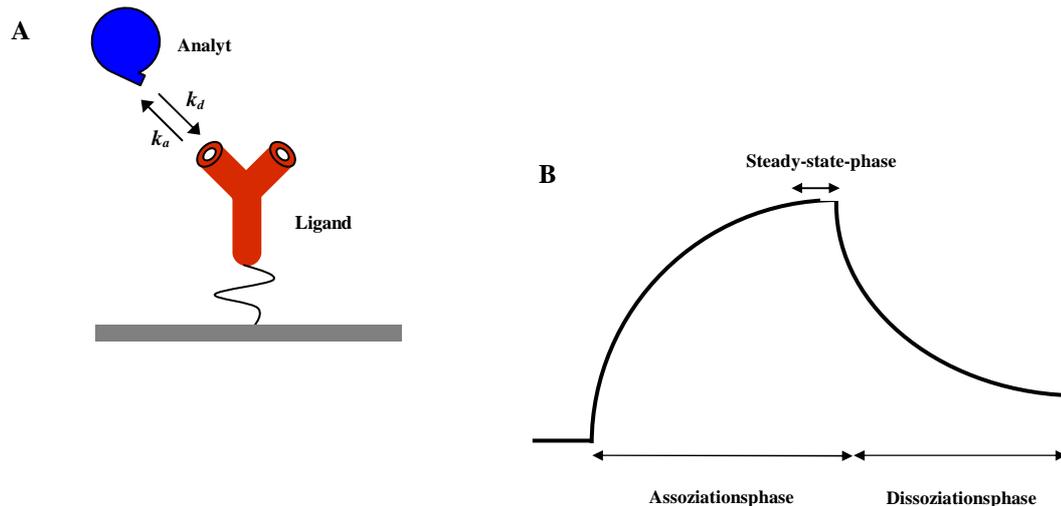
### 2.2.8 Cytochrom *c* Test

Die Cytochrom *c* Reduzierung wurde in 50 mM Kaliumphosphat Puffer (pH 7,4), versetzt mit 0,05 % Tween20 und den Polyaminen in unterschiedlichen Endkonzentrationen

(0,1 und 1,0 mM) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Proben setzten sich aus 0,05  $\mu\text{M}$  Adrenodoxin-Reduktase, 200  $\mu\text{M}$  Cytochrom *c* und unterschiedlichen Konzentrationen (Endkonzentration 0,05 – 3  $\mu\text{M}$ ) des betreffenden Adrenodoxins (WT, D15K, D15N, D39K oder D39N) zusammen. Der pH-Wert des Puffers wurde nach Zugabe des Salzes und der Polyamine überprüft und stieg maximal um 0,25 pH-Einheiten an. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 200  $\mu\text{M}$  NADPH gestartet. Die Absorptionsänderung wurde bei 550 nm verfolgt und die Aktivität mittels  $\epsilon = 20 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bestimmt.

### 2.2.9 Optische Biosensor Messungen (Biacore)

In einer lebenden Zelle folgen Wechselwirkungen zwischen Molekülen nicht einem transienten Bindungsmodell oder befinden sich in einem stabilen Gleichgewicht, sondern sind dynamisch. Daher sind Analysen notwendig, die die verschiedenen Stadien einer Interaktion (Assoziation, steady-state, Dissoziation) in Echtzeit abbilden können. Die Möglichkeit, markierungsfreie Untersuchungen zur Bindung zwischen zwei Biomolekülen mittels Oberflächenplasmonresonanz (**S**urface **P**lasmon **R**esonance; SPR) durchzuführen, wurde erstmals 1991 angewandt (Jönsson *et al.*, 1991). Diese Technologie beruht auf einem quantenphysikalischen Phänomen, das über einen optischen Detektor sichtbar gemacht wird (**Abbildung 2.3**). Biomoleküle wie z.B. Proteine können auf der Oberfläche eines Sensorchips als Liganden in nicht-denaturierter Form kovalent gebunden werden. Mögliche Interaktionspartner (Analyten) werden über die Oberfläche dieses Sensorchips gespült und Interaktionen mit den immobilisierten Molekülen werden über eine Änderung des Brechungsindex detektierbar (**Abbildung 2.1**). Der Sensor detektiert Massenveränderungen, die während einer Interaktion des mobilen mit dem immobilisierten Bindungspartner auf der Chipoberfläche in einem evaneszenten Feld auftreten. Zeitabhängige Änderungen des Brechungsindex werden registriert und dienen zur Ermittlung kinetischer Parameter. So können Assoziations- ( $k_a$ ) und Dissoziationskonstanten ( $k_d$ ) getrennt bestimmt und mit Hilfe der Konzentration des Analyten die apparenten Gleichgewichtskonstanten ( $K_D$  und  $K_A$ ) berechnet werden (**Abbildung 2.1**).



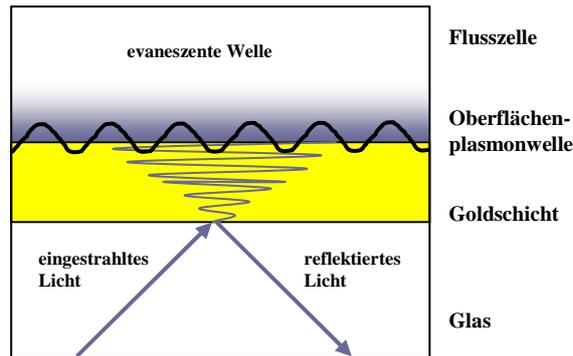
**Abb. 2.1: Elemente der Optischen Biosensorik.**

(A) Versuchsaufbau: Der Analyt, der sich in der Lösung befindet, bindet an einen Liganden, der auf einer Chipoberfläche immobilisiert ist. (B) Biosensor Ausdruck: Das Resonanzsignal steigt während der Assoziationsphase an, da immer mehr Analyt über den immobilisierten Ligand fließt und an diesen bindet. Das Plateau am Ende der Assoziationsphase zeigt an, dass das System ein Gleichgewicht, eine Steady-statephase, erreicht hat. Wenn die Oberfläche mit Puffer gespült wird, und der Analyt sich wieder von der Oberfläche löst, nimmt das Signal wieder ab.

Durch diese direkte Methode zur Analyse des Bindungsverhaltens der oxidierten Proteine AdR und CYP11A1 an immobilisiertes Adx (Wildtyp und Mutanten) in Anwesenheit von Salz und Polyaminen konnten die jeweiligen Bindungskonstanten bestimmt werden. Das Prinzip dieser Methode und der Oberflächenplasmonresonanz werden im Folgenden erklärt.

Das Messprinzip der Oberflächenplasmonresonanz basiert auf der optischen Detektion einer elektromagnetischen Feldkomponente, der sogenannten evaneszenten Welle, die auf einer Sensoroberfläche erzeugt wird (**Abbildung 2.2**).

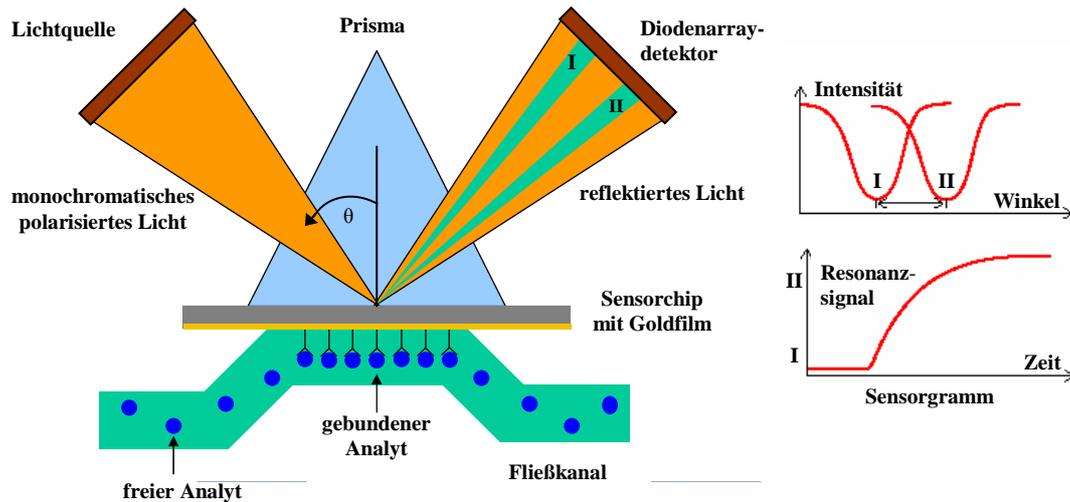
Diese entsteht, wenn Licht im Winkel der totalen internen Reflexion auf die Grenzfläche zwischen zwei Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes, hier eine Glasoberfläche und die Lösung in der Messzelle, trifft. Eingestrahltetes Licht wird an der Grenzfläche eines Materials mit einem hohen Brechungsindex (Rückseite des Sensorchips) zu einem Medium mit einem niedrigen Brechungsindex teilweise reflektiert und teilweise gebrochen. Über einen bestimmten kritischen Einfallswinkel hinaus wird kein Licht mehr an der Grenzfläche gebrochen und eine totale innere Reflexion wird beobachtet. Während das Licht totalreflektiert wird, dringt die Komponente des elektromagnetischen Feldes leicht (Zehntel von Nanometer) in das Medium mit dem geringeren Brechungsindex ein.



**Abb. 2.2: Prinzip der totalen inneren Reflexion (TIR) und die Erzeugung eines evaneszenten Feldes.**

Ab einem bestimmten Einfallswinkel des Lichtes tritt Totalreflexion auf. Dabei dringt die Komponente des elektromagnetischen Feldes leicht (Zehntel von Nanometer) in das Medium mit dem geringeren Brechungsindex ein und es wird eine sich exponentiell abbauende evaneszente Welle erzeugt.

Oberflächenplasmonresonanz entsteht nun in einer auf der Glasoberfläche angebrachten dünnen Goldschicht. Bei der Einstrahlung von monochromatischem und polarisiertem Licht beginnen die freien Elektronen des Metalls zu oszillieren und absorbieren bei einem bestimmten Winkel des eingestrahnten Lichtes Energie. Diese Energieaufnahme führt bei dem reflektierten Licht zu einem scharfen Intensitätsabfall ( $I$ ) bei einem definierten Winkel ( $\theta$ ) bei dem SPR auftritt. Dieser Winkel ist linear abhängig vom Brechungsindex und damit von der Konzentration gebundener Proteine in der Flüsszelle. Die Winkeländerung bedingt durch den Intensitätsabfall des reflektierten Lichtes kann durch einen Diodenarraydetektor gemessen werden und wird während der Messung als Resonanzsignal in einer Messkurve dargestellt (**Abbildung 2.3**).



**Abb. 2.3: Messprinzip der Oberflächenplasmonresonanz.**

Durch die Bindung von Analyten an den immobilisierten Liganden ändert sich der Brechungsindex in der Flusszelle. Der Intensitätsabfall am Goldchip des Sensors verursacht durch die Oberflächenplasmonresonanz verändert den Winkel  $\theta$  des total reflektierten Lichtes. Dieser Intensitätsabfall wird durch den Detektor gemessen und als Messkurve dargestellt. Die Wechselwirkung des evaneszenten Feldes mit den Elektronenkonstellationen des Metalls führt zu einer Verminderung der reflektierten Lichtintensität, dargestellt als grüner Schatten im reflektierten Lichtstrahl und als abnehmende Intensität als Funktion des Winkels ( $\theta$ ). Eine Änderung der dielektrischen Eigenschaften in der Umgebung der Metalloberfläche führt zu einer Änderung der Resonanzbedingungen und somit zu einer Verschiebung von  $\theta$  (I  $\rightarrow$  II).

Die Änderung des SPR-Signals wird in Echtzeit erfasst, die Signalstärke ist proportional zur gebundenen Masse an der Chipoberfläche und wird in Resonanz-Einheiten (RU) angegeben. 1 RU ist eine von Biacore<sup>®</sup> eingeführte Messeinheit und entspricht in etwa einer Oberflächenkonzentration von 1 pg Protein/ mm<sup>2</sup> (Biacore, 2004)

Die Änderung der Massenzunahme in der Nähe der Oberfläche des Chips führt zu einer Änderung der Brechungsindizes, und daher zu einem Anstieg des Sensorgramms. Wird die Reaktion lange genug laufen gelassen, erreicht sie eine Steadystatephase. Wird anschließend der Chip mit Puffer gespült und der Analyt weggeschwemmt, nimmt die Masse ab, der Brechungsindex geht zurück, die abfallende Phase des Sensorgramms beginnt.

Die Bildung der Adx/AdR beziehungsweise der Adx/CYP11A1 Komplexe wurden in einem Biacore 3000 System auf CM5 Chips mit einer carboxymethylierten Dextranoberfläche untersucht. Die Carboxylgruppen des Sensorchips wurden mit einem Gemisch aus 0,2 M N-ethyl-N'-dimethylaminopropyl-carbodiimide (EDC) und 0,05 M N-hydroxysuccinimide (NHS) aktiviert. Die Lösung wurde mit einer Flussrate von 5  $\mu$ l/min auf den Sensorchip geladen. Anschließend wurden über freie Aminogruppen des AdxWT, AdxD15K, AdxD15N,

AdxD39K und AdxD39N etwa 300 Resonanzunits (RU) jedes Proteins kovalent an die Matrix des Sensorchips gekoppelt (Zöllner *et al.*, 2002; Zöllner *et al.*, 2004). Beendet wurde die Kopplungsprozedur durch Injektion von 50 µl einer 1 M Ethanolaminhydrochlorid Lösung bei einer Flussrate von 10 µl/min, um die verbliebenen freien Estergruppen zu blockieren. Die Analyse der Bindung erfolgte durch Injektion von Lösungen verschiedener AdR<sub>ox</sub> beziehungsweise CYP11A1<sub>ox</sub>-Konzentrationen im Bereich zwischen 100 nM und 500 nM mit einer Fließgeschwindigkeit von 10 µl/min und gleichzeitiger Aufnahme der Änderung des Brechungsindex. Alle Protein-Lösungen wurden in Biacore HBS-EP Puffer (0,01 M HEPES Puffer (pH 7,4), 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA mit 0,005 % Surfactant P20) angesetzt. Zusätzlich wurden die Proben mit den Salzen (KCl und MgCl<sub>2</sub>) und den Polyaminen Putrescin, Spermidin und Spermin jeweils in zwei Ionenstärken (I<sub>1</sub> = 0,4 mM und I<sub>2</sub> = 1 mM) versetzt. An den Wildtyp oder die Mutanten gebundenes AdR oder CYP11A1 wurde durch Einspritzen von 10 µl einer 2 mM NaOH Lösung entfernt. Die Funktionalität der gekoppelten Adx Spezies wurde durch bis zu 30 Zyklen aus Bindung und Ablösung von 500 nM AdR beziehungsweise 500 nM CYP11A1 nachgewiesen. Zur Visualisierung unspezifischer Hintergrundreaktionen zwischen der Dextranmatrix und den Liganden (AdR oder CYP11A1) oder den Polyaminen wurde zu jeder Messzelle eine Referenzzelle ohne gebundene Adx Spezies angelegt. Spezifische Bindungskurven (Sensorgramme) wurden durch Subtraktion des Signals der Referenzzelle von dem Signal der Messzelle erhalten. Die Analyse der Bindungskurven und die Bestimmung der  $K_D$  Werte erfolgte mit der Biacore Auswertungssoftware 4.1 unter Verwendung eines 1:1 Bindungsmechanismus. Da die Protein-Protein-Wechselwirkung von Adx und AdR bzw. CYP11A1 einem 1:1-Bindungsmodell entspricht, konnten die Bindungskinetiken nach einer Reaktion erster Ordnung berechnet werden.

Die Berechnung der Assoziationskonstante erfolgt mit

$$R(t) = ((k_a \cdot [A] \cdot R_{\max}) / (k_a \cdot [A] + k_d)) \cdot (1 - \exp(-(k_a \cdot [A] + k_d) \cdot t)),$$

wobei [A] die Konzentration des injizierten Analyten ist, R(t) das Signal zu einer bestimmtem Zeit t der Assoziation, und  $R_{\max}$  das maximale Signal ist, wenn alle Liganden einen Analyten gebunden haben. Die Dissoziationskonstante wird mit der Formel

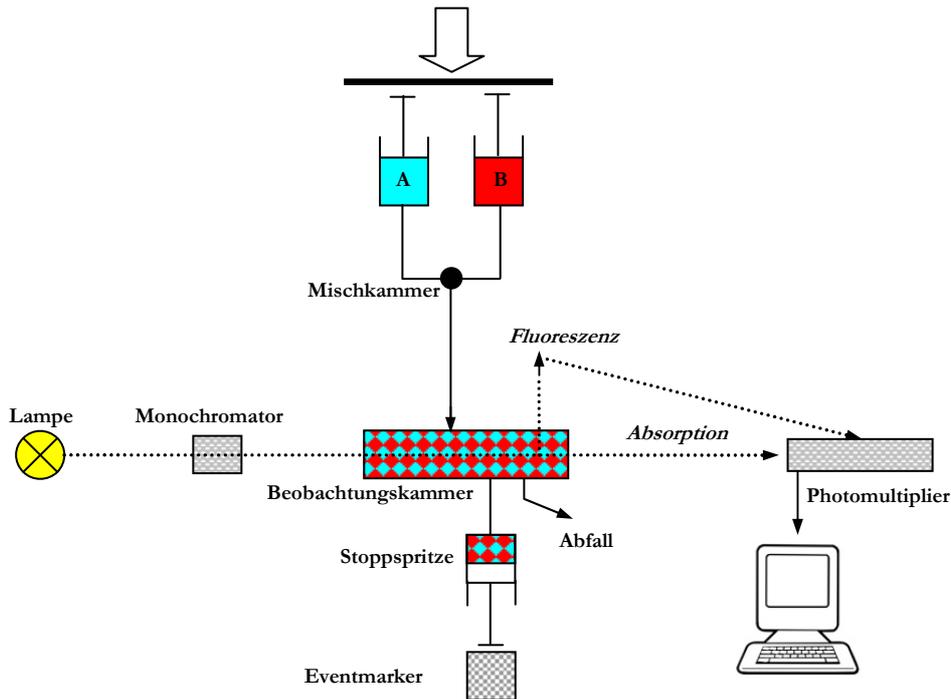
$$R(t) = R_0 \cdot \exp(-k_d \cdot (t - t_0))$$

berechnet, wobei R(t) das Signal zu einer bestimmtem Zeit t der Dissoziation ist und  $R_0$  das Signal bei einer willkürlich gewählten Zeit  $t_0$  ist. Die apparente Gleichgewichtskonstante  $K_D$  ergibt sich aus  $K_D = k_d / k_a$ .

### 2.2.10 Stopped-Flow Messungen

Die Stopped-Flow-Technik ist eine ausgezeichnete Methode zur Analyse von Pre-steady-state Zustandsreaktionen durch Verfolgen von Absorptions- oder Fluoreszenzänderungen, die während einer Reaktion stattfinden. Diese Methode des schnellen Mischens wurde verwendet, um die Reduktionsraten für die Interaktion zwischen den verschiedenen Komponenten des mitochondrialen Steroidhydroxylierungssystems in Anwesenheit von Salz (KCl) und den Polyaminen zu bestimmen. Das Prinzip dieser Methode wird im Folgenden kurz erläutert.

Die beiden miteinander reagierenden Komponenten (**A** und **B**) befinden sich in getrennten Vorratsspritzen. Von dort werden die Reaktionspartner schnell in die Mischkammer und anschließend in die Beobachtungskammer gepresst. Die Bildung des Komplexes aus A und B setzt während des Mischvorgangs ein und dauert so lange, bis das chemische Gleichgewicht erreicht ist. Während die Beobachtungskammer mit neuer Lösung gefüllt wird, wird zur gleichen Zeit die noch in der Zelle vorhandene Lösung in die Stopp-Spritze gedrückt. Die damit einhergehende Bewegung der Stoppspritze hält den Fluss abrupt an. Da nun Mischungs- und Strömungsvorgang abgeschlossen sind, startet die Aufzeichnung der optischen Signaländerung in der Küvette durch die daran angeschlossenen Detektoren. Der zeitliche Verlauf von Reaktionen, die innerhalb weniger Millisekunden ablaufen, kann auf diese Weise spektralphotometrisch (Absorption und Fluoreszenz) beobachtet und mit entsprechenden Modellen ausgewertet werden. Vorgänge, die sich während des Mischens und während des Transports der Lösung in die Beobachtungskammer ereignen, können jedoch nicht erfasst werden. Diesen nicht erfassbaren Zeitbereich nennt man Totzeit. Sie ist eine Gerätekonstante und liegt in den meisten Fällen im Bereich einiger Millisekunden. Des Weiteren ist diese Technik anfällig gegenüber Luftbläschen. Sie führen zu Signalschwankungen und müssen im gesamten optischen System vermieden werden. **Abbildung 2.4** zeigt den schematischen Aufbau einer Stopped-Flow Apparatur.



**Abb. 2.4: Schematischer Aufbau einer Stopped-Flow-Apparatur.**

Die Arbeitsspritzen sind mit A und B bezeichnet. Die Reaktanden werden in den Spritzen A und B vorgelegt; nach der Initiation werden die Reaktanden aus den Spritzen in die Mischkammer und anschließend in eine Beobachtungskammer gedrückt. In der Beobachtungskammer wird der Reaktionsfortgang i.A. spektroskopisch beobachtet. Die Stopspritze blockiert dabei den Nachlauf an Reaktanden.

Alle Stopped-Flow Experimente wurden mit dem Stopped-Flow-Spektrometer SFM-300 der Firma Jasco BioLogic bei 15°C durchgeführt. Die Totzeit lag bei 2,4 Millisekunden. Als Reaktionspuffer wurde 50 mM HEPES (pH 7,4) verwendet, der mit 0,05% Tween20 und der entsprechenden Konzentration an KCl und den Polyaminen Putrescin, Spermidin und Spermin (0 mM bis 1,25 mM für die Reduktion des Adx bzw. 0 mM bis 1 mM für die Reduktion des Cytochroms). Der pH des Puffers wurde nach Zugabe des Salzes und der Polyamine überprüft und stieg maximal um 0,25 pH-Einheiten an.

Die Reduktion von Adx wurde bei 414 nm auf zwei unterschiedliche Arten wie folgt untersucht.

Im ersten Ansatz wurde Adx mit reduziertem AdR gemischt. Dafür enthielt Spritze A 20 µM AdR und 200 µM NADPH, Spritze B 4 µM Adx. In einer zweiten Messreihe wurden die beiden oxidierten Proteine AdR und Adx mit NADPH gemischt. Spritze A wurde mit 200 µM NADPH, Spritze B mit 20 µM AdR und 4 µM Adx beladen. Nach dem Mischen enthielten die Proben jeweils 100 µM NADPH, 10 µM AdR und 2 µM Adx.

Zur Bestimmung von  $K_D$ -Werten des AdR an Adx enthielt Spritze **A** 20  $\mu\text{M}$  AdR und 200  $\mu\text{M}$  NADPH und Spritze **B** unterschiedliche Mengen an Adx (0 - 40  $\mu\text{M}$ ). In einer zweiten Messreihe wurden die beiden oxidierten Proteine AdR und Adx mit NADPH gemischt. Spritze **A** enthielt 200  $\mu\text{M}$  NADPH, während Spritze **B** mit 20  $\mu\text{M}$  AdR und unterschiedlichen Mengen an Adx (0 - 40  $\mu\text{M}$ ) beladen wurde. Nach dem Mischen enthielten die Proben jeweils 100  $\mu\text{M}$  NADPH, 10  $\mu\text{M}$  AdR und 0  $\mu\text{M}$  – 20  $\mu\text{M}$  Adx.

Die Reduktion des Cytochroms konnte über die Adx-abhängige Bildung des CYP11A1-CO Komplexes bei 450 nm beobachtet werden. Spritze **A** enthielt CYP11A1 (4  $\mu\text{M}$ ) während Spritze **B** mit NADPH (400  $\mu\text{M}$ ), AdR (4  $\mu\text{M}$ ) und Adx (8  $\mu\text{M}$ ) gefüllt war. Die Mischung in Spritze **B** wurde für ein paar Minuten ruhen gelassen, um eine komplette Reduktion von Adx zu gewährleisten. Die Lösungen wurden vor Überführung in die beiden Spritzen mit CO gesättigt. Die so hergestellten Proben enthielten nach dem Mischen 200  $\mu\text{M}$  NADPH, 2  $\mu\text{M}$  AdR, 4  $\mu\text{M}$  Adx und 2  $\mu\text{M}$  CYP11A1.

Zur Bestimmung von  $K_D$ -Werten des Adx an CYP11A1 enthielt Spritze **A** CYP11A1 (4  $\mu\text{M}$ ) während Spritze **B** mit NADPH (400  $\mu\text{M}$ ), AdR (4  $\mu\text{M}$ ) und Adx (0 – 64  $\mu\text{M}$ ) gefüllt war. Die Mischung in Spritze **B** wurde für ein paar Minuten ruhen gelassen, um eine komplette Reduktion von Adx zu gewährleisten. Die Lösungen wurden vor Überführung in die Spritzen mit CO gesättigt. Die so hergestellten Proben enthielten nach dem Mischen 2  $\mu\text{M}$  CYP11A1, 1  $\mu\text{M}$  AdR, 0  $\mu\text{M}$  – 32  $\mu\text{M}$  Adx und 200  $\mu\text{M}$  NADPH. Es wurden fünf bis sieben Reaktionskurven übereinandergelegt und mono-exponential gefittet. Der so entstandene Mittelwert wurde zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Reduktion von Adx durch AdR beziehungsweise von CYP11A1 durch Adx herangezogen. Alle Kurven wurden mit SigmaPlot 9.0 analysiert.

### 3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war eine umfassende Analyse der Effekte, die durch die Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin auf Protein-Protein Interaktionen ausgeübt werden, zu erarbeiten. Für diese Untersuchungen wurde das in unserer Gruppe gut untersuchte CYP11A1 System ausgesucht. Es katalysiert den physiologisch wichtigen ersten Schritt der Biosynthese der Steroidhormone in den Sexualorganen, den Nebennieren, aber auch in anderen Geweben, wie zum Beispiel dem Gehirn. Um die für diesen Reaktionsablauf benötigten sechs Elektronen zu transportieren, muss Adx mit seinen beiden Redoxpartnern AdR und CYP11A1 interagieren. In dieser Arbeit wurde der Hypothese nachgegangen, ob kleine, flexible, mehrfach positiv geladene Polyamine, welche ubiquitär in allen Zellen und in allen Spezies vorkommen, stark an Proteininterfaces binden, Protein-Protein Interaktionen beeinflussen und somit einen wichtigen regulatorischen Effekt auf Proteinfunktionen unter physiologischen Bedingungen ausüben können. Die Polyamine wurden in einem Konzentrationsbereich von  $\mu\text{M}$  zu  $\text{mM}$  unter Berücksichtigung physiologischer Konzentrationen eingesetzt.

Um diese experimentellen Ergebnisse zu unterstützen und um ein mögliches Modell zu entwerfen, wie die Polyamine mit den Proteinen der CYP11A1 Elektronentransferkette interagieren könnten, wurden darüber hinaus *in silico* Experimente durchgeführt. Alle Dockingexperimente für die Bindung der Polyamine an Adrenodoxin und die Adrenodoxinreduktase wurden im Rahmen einer Kooperation von Frau M.Sc. Susanne Eyrisch aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Volkhard Helms, Zentrum für Bioinformatik, Universität des Saarlandes, Saarbrücken durchgeführt. Die Polyamine wurden zum einen in die bereits bekannten Kristallstrukturen von oxidiertem Adx, AdR und dem oxidierten Adx – AdR Komplex gedockt. In einem nächsten Schritt wurden die Polyamine in Molekulardynamik (MD) Snapshots, die aus einer molekularen Simulation des oxidierten Adx ausgeschnitten wurden, gedockt. Da bis zu diesem Zeitpunkt keine Kristallstrukturen für CYP11A1 und dem Adx-CYP11A1 Komplex existieren, waren keine Berechnungen und Dockingergebnisse für diese Systeme möglich. Die Dockings ergaben unter anderem, dass die Polyamine bevorzugt an die Region Asp-15, Asp-39 und Asp-41 des Adrenodoxins andocken. Diese Region wurde 1998 von Müller *et al.* als sekundäre Interaktionsdomäne des Adx mit der AdR postuliert (Müller *et al.*, 1998).

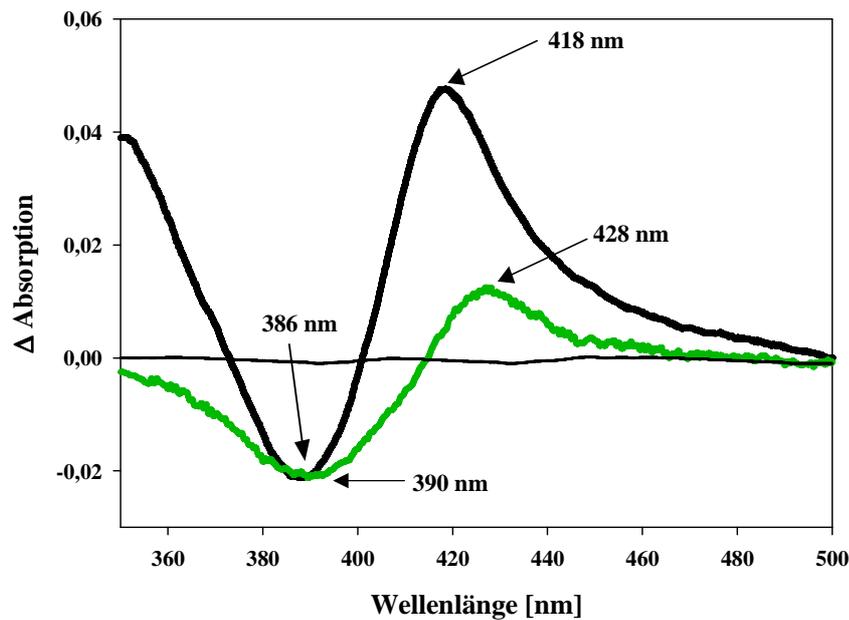
Daher wurden zum besseren Verständnis des Bindeverhaltens der Polyamine im zweiten Teil dieser Arbeit vier Adx-Spezies herangezogen, die jeweils eine Mutation in der sekundären Bindedomäne besitzen.

### 3.1 Einfluss der Polyamine auf das komplette CYP11A1 System

#### 3.1.1 Effekte auf die Spektraleigenschaften des CYP11A1

Differenzspektren der mit Liganden gebundenen Cytochrome P450 werden oft dazu verwendet, um die Natur der Interaktion zwischen Ligand und Cytochrom zu bestimmen. Stickstoffhaltige Liganden erzeugen bei ihrer Wechselwirkung mit dem Häm-Eisen der P450 ein sogenanntes Typ II Differenzspektrum ( $\lambda_{\max}$  424 – 435 nm,  $\lambda_{\min}$  392 – 410 nm) (Schenkman *et al.*, 1972; Hoshino *et al.*, 2005). Allerdings sind diese sogenannten Typ II Liganden in der Regel Inhibitoren der P450, da sie das niedrige Reduktionspotential der Cytochrome stabilisieren und mit dem Sauerstoff um die Bindung am Häm konkurrieren. Auch die Polyamine besitzen Aminogruppen, die theoretisch über ein freies Elektronenpaar am Stickstoff an das Häm-Eisen des P450 koordinieren können. Allerdings liegen die Polyamine bei neutralem pH protoniert vor (Bencini *et al.*, 1999) (**Abbildung 1.1**), was eine Ligierung des Häm-Eisen ausschließt.

Dennoch wurde das Potential aller drei Polyamine, eine Typ II Bindung zum CYP11A1 auszubilden mittels optischer Differenzspektroskopie untersucht. Tatsächlich führten Spermidin und Spermin, nachdem sie einen Teil ihrer positiven Ladung verloren hatten, ab einem pH-Wert  $\geq 8$  zu Typ II Spektren. Diese Typ II Bindung war schwach und nur bei hohen Konzentrationen detektierbar. Bei Konzentrationen von  $\leq 1$  mM, der gewöhnlichen Polyaminkonzentration in der Zelle, bewirkten alle drei Polyamine ein Revers Typ I (RI) Spektrum ( $\lambda_{\max}$  420 nm,  $\lambda_{\min}$  386 nm; **Abbildung 3.1**).

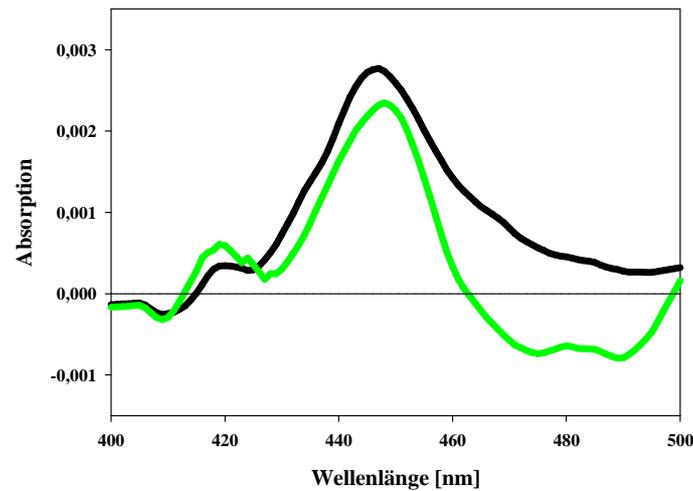


**Abb. 3.1: Repräsentative Differenzspektren des CYP11A1 mit Spermin.**

CYP11A1 (1,5  $\mu$ M) in HEPES/Tween Puffer wurde mit Spermin titriert. Bei pH 7,3 und 1 mM Spermin zeigte das Cytochrom ein Revers Typ I Spektrum (schwarz), bei pH 9,3 und nach Zusatz von 6 mM Spermin ein deutliches Typ II Spektrum (grün).

Diese Form der Interaktion unterscheidet sich sowohl von der Substratbindung, die ein Typ I Spektrum ( $\lambda_{\max}$  390 nm,  $\lambda_{\min}$  420 nm) erzeugt, als auch von der Typ II Bindung an das Häm Eisen (Vaz *et al.*, 1992). Welcher Art diese Interaktion ist, ist allerdings noch nicht bekannt.

Bei physiologischen Konzentrationen interagieren die Polyamine mit CYP11A1 somit hauptsächlich als RI Ligand, bei einem pH-Wert  $> 8$  und damit einhergehender teilweiser Deprotonierung können sie auch als schwacher Typ II Ligand auftreten. Weder Typ II noch RI Bindungen konnten jedoch die Interaktion zwischen reduziertem CYP11A1 und Kohlenstoffmonoxid blockieren (**Abbildung 3.2**).



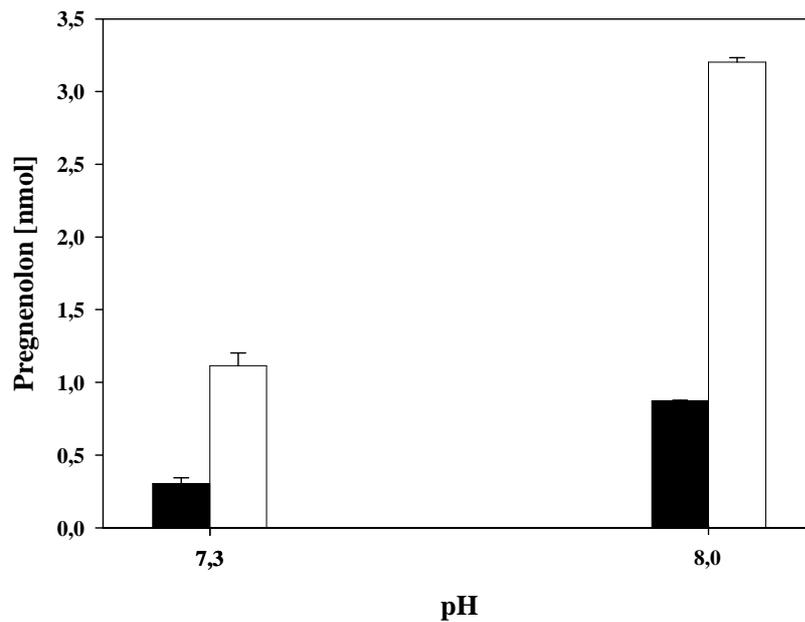
**Abb. 3.2: Repräsentatives CO-Differenzspektrum des CYP11A1 mit Putrescin.**

CO-Differenzspektrum von CYP11A1 (1,5  $\mu\text{M}$  in HEPES/Tween Puffer, pH 7,3) (schwarz) und mit Zugabe von 6 mM Putrescin (grün).

Das deutet darauf hin, dass falls die Polyamine als Substrat an die Cytochrome binden, sie dadurch kein oder nur ein sehr schwaches inhibitorisches Potential auf die enzymatische Funktion ausüben sollten.

### 3.1.2 Effekte auf die Substratumwandlung des CYP11A1 Systems

Um zu untersuchen, in wieweit die Polyamine einen Einfluss auf die enzymatische Aktivität des CYP11A1 ausüben, wurde die Umwandlung des Substrats Cholesterol zu Pregnenolon in Anwesenheit der drei Polyamine (Putrescin, Spermidin und Spermin), die in einer großen Bandbreite an Konzentrationen eingesetzt wurden, bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 7,3 und pH 8,0) mittels HPLC quantifiziert. In zwei unabhängigen Versuchsdurchführungen wurde die Konzentration des AdxWT auf 0,5  $\mu\text{M}$  beziehungsweise 5,0  $\mu\text{M}$  gesetzt, was einem molaren Verhältnis von 1:1:1 beziehungsweise 1:10:1 von AdR:Adx:CYP11A1 entspricht. In Abwesenheit der Polyamine war die Pregnenolonproduktion bei pH 8,0 (**Abbildung 3.3**), dem physiologischen pH-Wert in den Mitochondrien (Abad *et al.*, 2004), am stärksten.

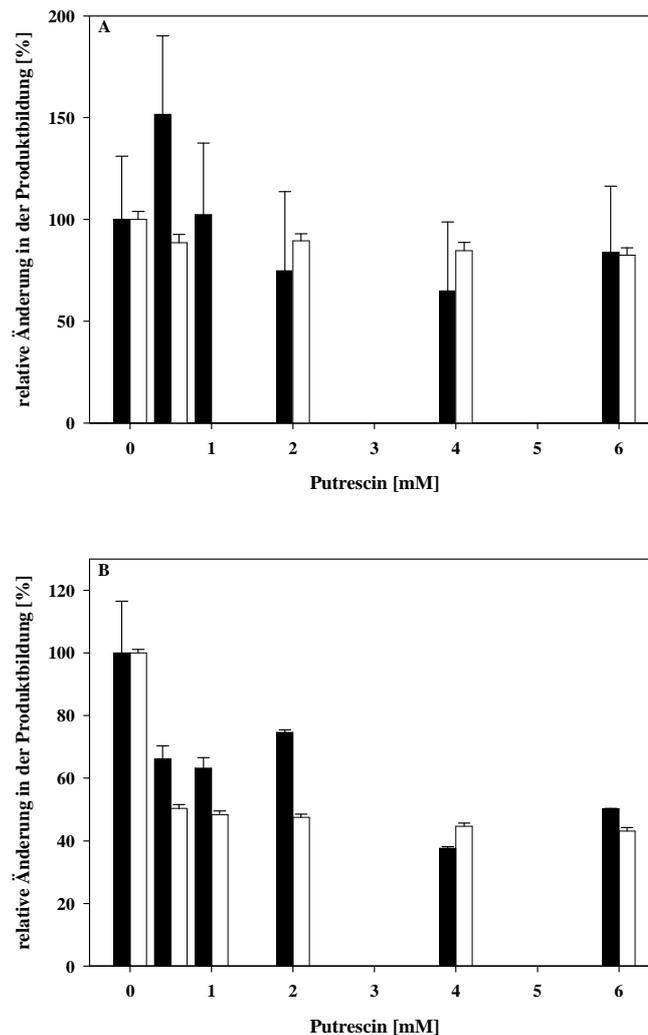


**Abb. 3.3: Abhängigkeit der Pregnenolonbildung vom pH-Wert des Puffers.**

Die Umwandlung des Cholesterol zu Pregnenolon war in Abwesenheit der Polyamine bei pH 8,0, dem physiologischen pH-Wert in den Mitochondrien, sowohl bei einem molaren Verhältnis von 1:1:1 (schwarz) als auch von 1:10:1 (weiß) der AdR:Adx:CYP11A1 stärker als bei pH 7,3.

Betrachtet man die Pregnenolonbildung als eine Funktion der Polyaminkonzentration, ergab sich ein komplexes Bild. Getestet bei pH 7,3 und 8,0 und in einer großen Bandbreite an Konzentrationen ( $\mu\text{M}$  bis mM) beeinflusste Putrescin die CYP11A1 Aktivität bei pH 7,3 kaum (**Abbildung 3.4 A**). Bei pH 8,0 war eine Halbierung der Produktbildung zu beachten (**Abbildung 3.4 B**).

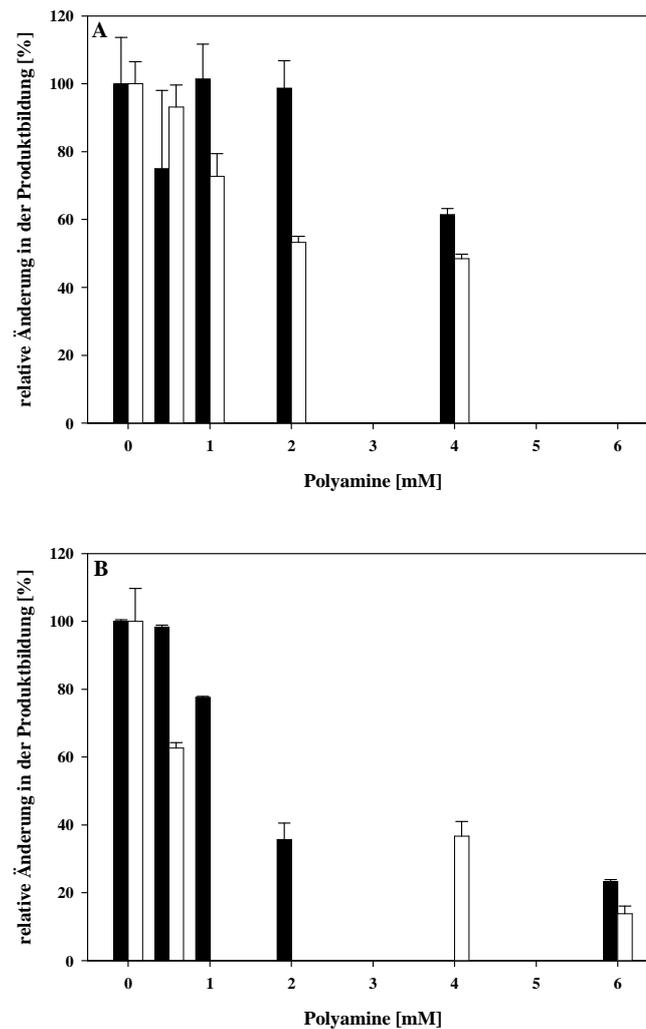
Bei beiden pH Werten machte es keinen Unterschied, ob Adx im gleichen stöchiometrischen Verhältnis zu seinen Redoxpartnern (1:1:1), oder im zehnfachen Überschuss (1:10:1) vorlag.



**Abb. 3.4: CYP11A1-abhängige Cholesterolumwandlung zu Pregnenolon in Anwesenheit von Putrescin.**

Die Inkubationen von 400  $\mu\text{M}$  Cholesterol in zwei rekonstituierten CYP11A1 Systemen (0,5  $\mu\text{M}$  CYP11A1, 0,5  $\mu\text{M}$  Adx, 0,5  $\mu\text{M}$  AdR, 100  $\mu\text{M}$  NADPH; schwarze Säulen und 0,5  $\mu\text{M}$  CYP11A1, 5,0  $\mu\text{M}$  Adx, 0,5  $\mu\text{M}$  AdR, 100  $\mu\text{M}$  NADPH; weiße Säulen) wurden bei 37°C in HEPES-Tween Puffer in Anwesenheit Putrescin bei pH 7,3 (A) und pH 8,0 (B) durchgeführt. Die Produktbildung (Pregnenolon) wurde mittels RP-HPLC Analysen der inkubierten Extrakte quantitativ bestimmt. Die abgebildeten Aktivitätsänderungen mit den Standardabweichungen ( $n = 4$ ) wurden relativ zur Kontrolle (100%; ohne die Polyamine) gesetzt.

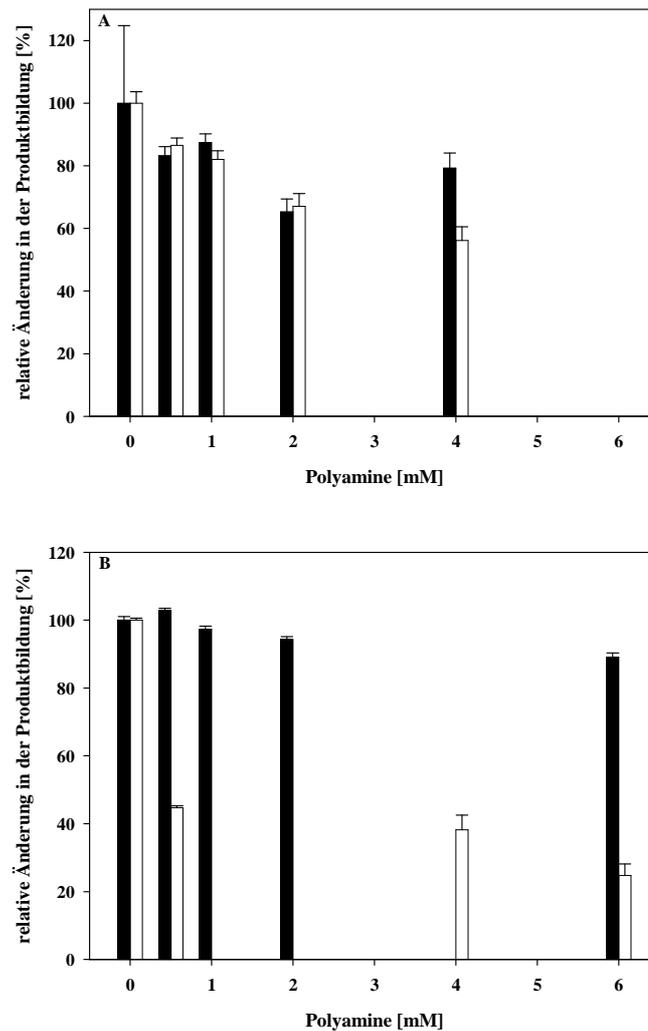
Im Gegensatz dazu inhibierten sowohl Spermidin als auch Spermin die CYP11A1-katalysierte Pregnenolonbildung bei beiden pH-Werten. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig und bei pH 8,0 stärker ausgeprägt als bei pH 7,3 (Abbildung 3.5). Bei pH 7,3 und 4 mM des jeweiligen Polyamins sank die Menge an gebildeten Pregnenolon auf 60% (Spermidin) beziehungsweise 50% (Spermin). Bei pH 8,0 und 0,5  $\mu\text{M}$  Adx reduzierte 6,0 mM Spermidin die Produktbildung auf 25 %, 6,0 mM Spermin auf 15 %.



**Abb. 3.5: CYP11A1-abhängige Cholesterolumwandlung zu Pregnenolon in Anwesenheit von Spermidin und Spermin.**

Die Inkubationen von 400  $\mu\text{M}$  Cholesterol in einem rekonstituierten CYP11A1 System (0,5  $\mu\text{M}$  CYP11A1, 0,5  $\mu\text{M}$  Adx, 0,5  $\mu\text{M}$  AdR, 100  $\mu\text{M}$  NADPH) wurden bei 37°C in HEPES-Tween Puffer in Anwesenheit von Spermidin (schwarze Säulen) und Spermin (weiße Säulen) bei pH 7,3 (**A**) und pH 8,0 (**B**) durchgeführt. Die Produktbildung (Pregnenolon) wurde mittels RP-HPLC Analysen der inkubierten Extrakte quantitativ bestimmt. Die abgebildeten Aktivitätsänderungen mit den Standardabweichungen (n = 4) wurden relativ zur Kontrolle (100%; ohne die Polyamine) gesetzt.

In Anwesenheit von 5,0  $\mu\text{M}$  Adx zeigten beide Polyamine eine geringere aber sichtbare Inhibierung der CYP11A1 Aktivität (**Abbildung 3.6**). Wiederum war diese bei pH 8,0 und Spermin am deutlichsten. Bei 6 mM Spermin wurde eine Reduzierung der Pregnenolonbildung auf 25% beobachtet.



**Abb. 3.6: CYP11A1-abhängige Cholesterolumwandlung zu Pregnenolon in Anwesenheit von Spermidin und Spermin.**

Die Inkubationen von 400  $\mu\text{M}$  Cholesterol in einem rekonstituierten CYP11A1 System (0,5  $\mu\text{M}$  CYP11A1, 5,0  $\mu\text{M}$  Adx, 0,5  $\mu\text{M}$  AdR, 100  $\mu\text{M}$  NADPH) wurden bei 37°C in HEPES-Tween Puffer in Anwesenheit von Spermidin (schwarze Säulen) und Spermin (weiße Säulen) bei pH 7,3 (A) und pH 8,0 (B) durchgeführt. Die Produktbildung (Pregnenolon) wurde mittels RP-HPLC Analysen der inkubierten Extrakte quantitativ bestimmt. Die abgebildeten Aktivitätsänderungen mit den Standardabweichungen (n = 4) wurden relativ zur Kontrolle (100%; ohne die Polyamine) gesetzt.

Die Untersuchung der Wirkung von Spermidin und Spermin war experimentell gesehen anspruchsvoller, da mit steigender Konzentration diese Polyamine den Puffer pH beeinflussten. Der Reaktionspuffer bestand aus 50 mM HEPES mit einem anfänglichen pH-Wert von 7,3 beziehungsweise pH 8,0 und 0,05% Tween20. Der pH jedes Puffers wurde nach der jeweiligen Zugabe von Polyamin überprüft. Obwohl es bei der Zugabe von bis zu 10 mM Putrescin zu keiner pH-Änderung im Puffer kam, gab es mit steigender Spermidin/ Spermin Konzentration einen pH-Anstieg im Reaktionsgemisch (**Tabelle 3.1**). Diese Änderungen

mußten bei der Untersuchung des Einflusses der Polyamine auf die CYP11A1 Aktivität berücksichtigt werden.

**Tabelle 3.1: Änderung der pH-Werte des Reaktionspuffers nach Zugabe (Endkonzentration in mM) der Polyamine**

pH 7,30				pH 7,96			
MM	Putrescin	Spermidin	Spermin	mM	Putrescin	Spermidin	Spermin
<b>0,00</b>	pH 7,30	pH 7,30	pH 7,30	<b>0,00</b>	pH 7,96	pH 7,96	pH 7,96
<b>0,10</b>	pH 7,31	pH 7,31	pH 7,34	<b>0,10</b>	pH 7,96	pH 8,04	pH 8,02
<b>0,50</b>	pH 7,31	pH 7,33	pH 7,37	<b>0,50</b>	pH 7,97	pH 8,08	pH 8,11
<b>1,00</b>	pH 7,30	pH 7,35	pH 7,45	<b>1,00</b>	pH 7,96	pH 8,16	pH 8,24
<b>2,00</b>	pH 7,30	pH 7,43	pH 7,53	<b>2,00</b>	pH 7,98	pH 8,20	pH 8,38
<b>4,00</b>	pH 7,30	pH 7,54	pH 7,75	<b>4,00</b>	pH 7,96	pH 8,79	pH 8,85
<b>6,00</b>	pH 7,30	pH 7,73	pH 7,93	<b>6,00</b>	pH 7,97	pH 8,83	pH 9,32

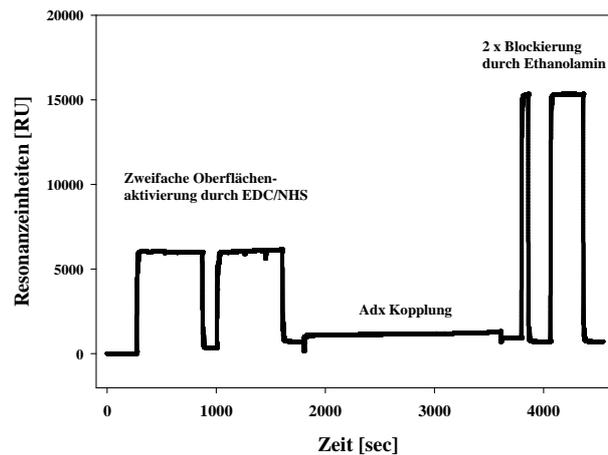
Wie aus dieser Tabelle ersichtlich wird, konnten nicht alle in den **Abbildungen 3.4 bis 3.6** aufgeführten Werte direkt aus diesen Versuchsansätzen entnommen werden, wenn man eine maximale Toleranz von 0,25 pH-Einheiten zulässt. Die zusätzlichen Daten ergaben sich aus dem Puffer mit einem Anfangs-pH von 6,0, der durch die Zugabe der Polyamine anstieg (**Tabelle 3.2**). Somit konnten die Ergebnisse mit 4 mM bzw. 6 mM Spermidin/ Spermin hinzugefügt werden.

**Tabelle 3.2: Änderung der pH- Werte des Reaktionspuffers (pH 6,0) nach Zugabe (Endkonzentration in mM) der Polyamine**

pH 6,00			
mM	Putrescin	Spermidin	Spermin
<b>0,00</b>	pH 6,00	pH 6,00	pH 6,00
<b>0,10</b>	pH 6,01	pH 6,34	pH 6,43
<b>0,50</b>	pH 6,02	pH 6,66	pH 6,85
<b>1,00</b>	pH 6,02	pH 6,98	pH 7,11
<b>2,00</b>	pH 6,03	pH 7,07	pH 7,16
<b>4,00</b>	pH 6,04	pH 7,48	pH 7,54
<b>6,00</b>	pH 6,03	pH 7,74	pH 7,97

### 3.1.3 Optische Biosensormessungen

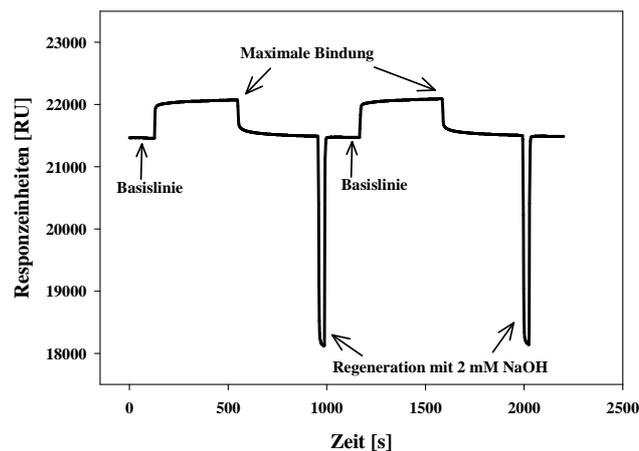
Zur simultanen Analyse biomolekularer Interaktionen wird das optische Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) genutzt. Dabei werden Änderungen im Refraktionsindex der Lösung nahe der Sensoroberfläche gemessen. Diese Änderungen werden durch Konzentrationsänderungen der sich in der Lösung befindlichen Moleküle bedingt. Entwickelt zur Bestimmung von kinetischen und Gleichgewichtskonstanten der Proteinkomplexbildung, wurde in dieser Arbeit das Biacore3000 (Uppsala, Schweden) zur Charakterisierung der Interaktionen zwischen oxidiertem Adx und AdR<sub>ox</sub> beziehungsweise CYP11A1<sub>ox</sub> benutzt. Freie Aminogruppen des Ferredoxins, welche gleichmäßig auf der Proteinoberfläche verteilt sind, wurden benutzt, um das Protein an die mit EDC/NHS aktivierten Carboxylgruppen der Dextranmatrix des Sensorchips zu binden. Da nach bisherigen Erkenntnissen positiv geladene, freie Aminogruppen des Adx nicht direkt am Erkennen und Binden von Redoxpartnern teilnehmen, beeinflusst diese Prozedur nicht die korrekte Interaktion zwischen dem Adx und seinen Redoxpartnern. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige Adx-Moleküle so an den Chip gebunden haben, dass sie keine Interaktionen mit den Redoxpartnern mehr eingehen können. Da diese wahllos verteilten Adx-Moleküle nicht zu den beobachteten Interaktionskurven beitragen, beeinflussen sie die erhaltenen Konstanten nicht. **Abbildung 3.7** zeigt ein typisches Sensorgramm zur Kopplung von Adx.



**Abb. 3.7: Biacore Sensorgramm der Adx Kopplung.**

Gezeigt werden die unterschiedlichen Schritte während einer Bindungsprozedur von AdxWT an die carboxymethylierte Dextranoberfläche eines Biacore CM5 Sensorchips, durch Injektion von 150  $\mu$ l einer 50  $\mu$ M AdxWT Lösung bei einer Fließgeschwindigkeit von 5  $\mu$ l/min. Wie aus dieser Abbildung deutlich wird, wurden etwa 300 RU AdxWT auf den Sensorchip gebunden. Die Experimente wurden mit einem Biacore3000 durchgeführt.

Durch die Regeneration des Sensorchips sollen alle nicht kovalent gebundenen Analyten von dem immobilisierten Liganden gelöst werden, ohne dessen Bindungsfähigkeit zu beeinträchtigen. Eine schlechte Regeneration der mit Adx beladenen Oberfläche würde das Signal der Basislinie erhöhen und somit die Reproduzierbarkeit der Versuche durch sinkende Bindungssignale des Analyten beeinträchtigen. Die Effizienz der Regeneration wurde durch die Analyse des Signals der Basislinie sowie des maximalen Bindungssignals während 30 Bindungszyklen von 500 nM AdR beziehungsweise 500 nM CYP11A1 in Anwesenheit der Polyamine bestimmt (**Abbildung 3.8**). Beide Signale wurden separat betrachtet und zeigten nach 30 Zyklen eine maximal Änderung von 10% in ihrer Intensität. Diese Abweichung liegt weit unterhalb dessen, was in der Literatur für eine erfolgreiche Regeneration (20% Änderung der Intensität) angegeben wird (Mason *et al.*, 2003).

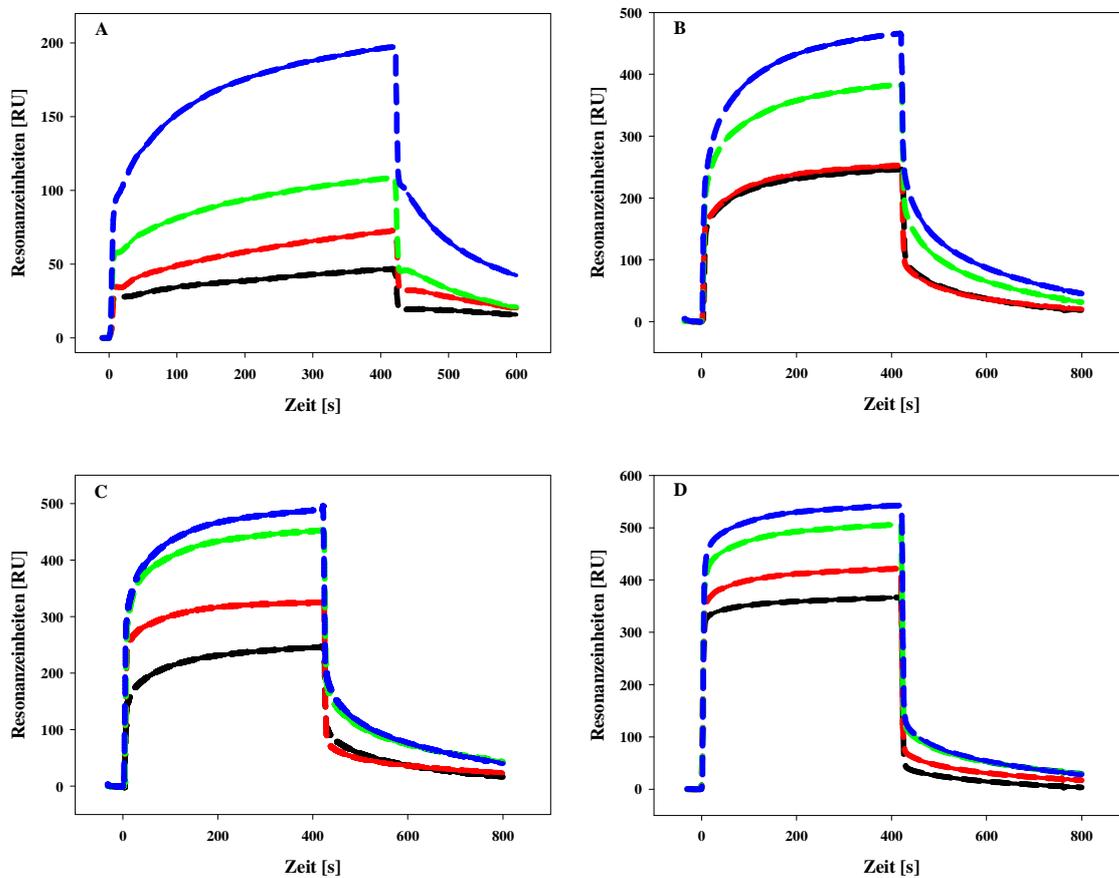


### Abb. 3.8: Bindungs- und Regenerationszyklus.

Ein typischer Bindungszyklus beginnt im gezeigten Fall mit dem Einspritzen einer Lösung aus 500 nM CYP11A1 in Anwesenheit von  $I = 1,0$  mM Spermin auf eine mit AdxWT gekoppelten Dextranmatrix. Zur Regeneration wurden 10  $\mu$ l einer 2 mM NaOH Lösung bei einer Fließgeschwindigkeit von 10  $\mu$ l/min injiziert.

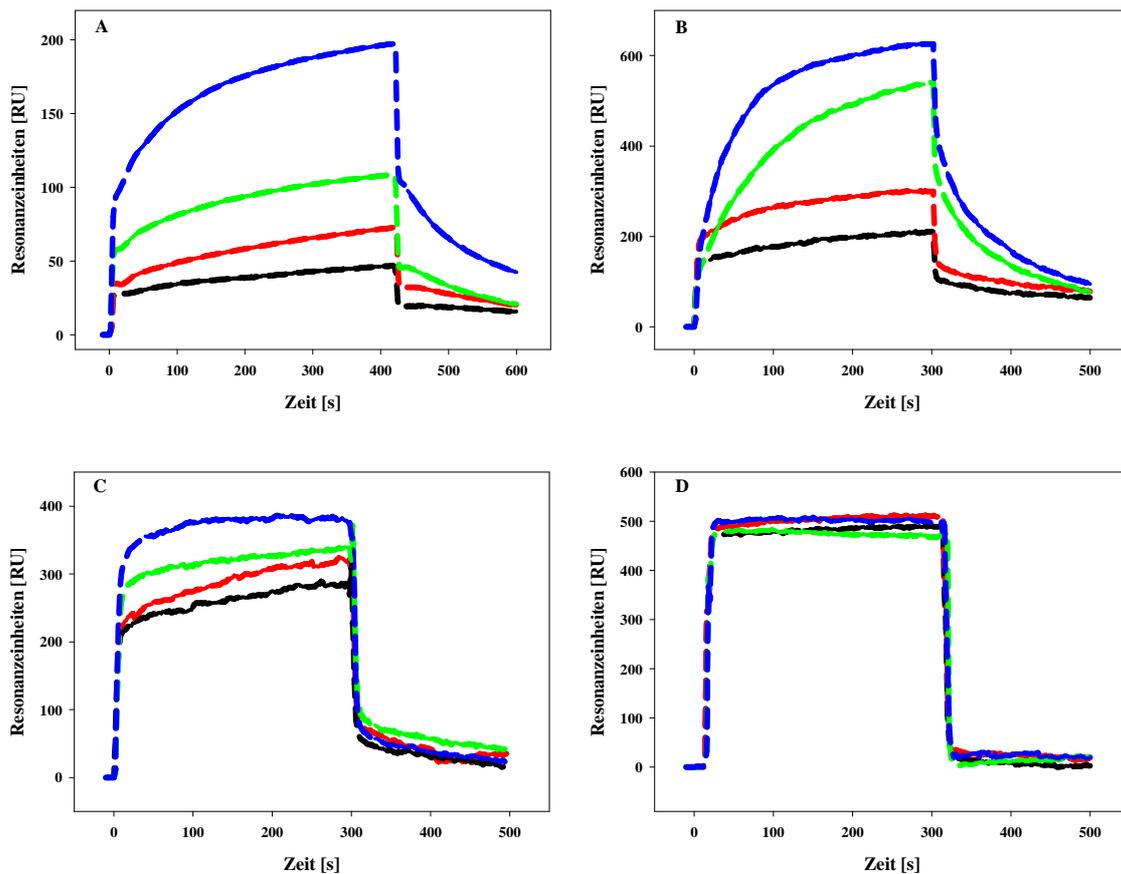
Nachdem geeignete Bedingungen zur Regeneration bestimmt wurden, wurden im Folgenden unterschiedliche Konzentrationen an AdR und CYP11A1 auf den mit Adx gekoppelten Sensorchip injiziert und die dabei ablaufenden Interaktionen aufgezeichnet. Die Liganden wurden dabei nur in Puffer, oder in Puffer jeweils einzeln versetzt mit den Salzen KCl und MgCl<sub>2</sub> beziehungsweise den Polyaminen in einer jeweiligen Ionenstärke von  $I = 0,4$  mM und  $I = 1,0$  mM über den Sensorchip gegeben. Dies war notwendig, um Ionenstärkeeffekte der Polyamine und Salze untereinander, bedingt durch die unterschiedliche Anzahl ihrer Ladungen, auszuschließen. Dabei entsprechen  $I = 0,4$  mM und  $I = 1,0$  mM einer jeweiligen Konzentration von 0,400 mM bzw. 1,000 mM KCl, ~0,133 mM bzw. ~0,333 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,200 mM bzw. 0,500 mM Putrescin, ~0,089 mM bzw. ~0,222 mM Spermidin und ~0,050 mM bzw. ~0,125 mM Spermin. Um mögliche unspezifische Interaktionen zwischen AdR, CYP11A1 oder den Polyaminen mit der Dextranmatrix auszuschließen, wurde ein Signal in Referenzzellen aufgezeichnet, die kein Adx als Liganden gebunden hatten. Die Dextranmatrix dieser Zellen wurden mit EDC/ NHS aktiviert und anschließend direkt mit Ethanolamin blockiert. Die Subtraktion des Signals dieser Referenzzelle von dem Signal, das von der mit Adx beladenen Zelle aufgenommen wurde, führt zu spezifischen Bindungskurven. **Abbildungen 3.9** und **3.10** zeigen typische Sensorgramme für die Interaktion zwischen unterschiedlichen Konzentrationen an Adx und AdR in Puffer und in

Anwesenheit der Polyamine in einer Ionenstärke von  $I = 0,4 \text{ mM}$  (Abbildungen 3.9) beziehungsweise  $I = 1,0 \text{ mM}$  (Abbildung 3.10).



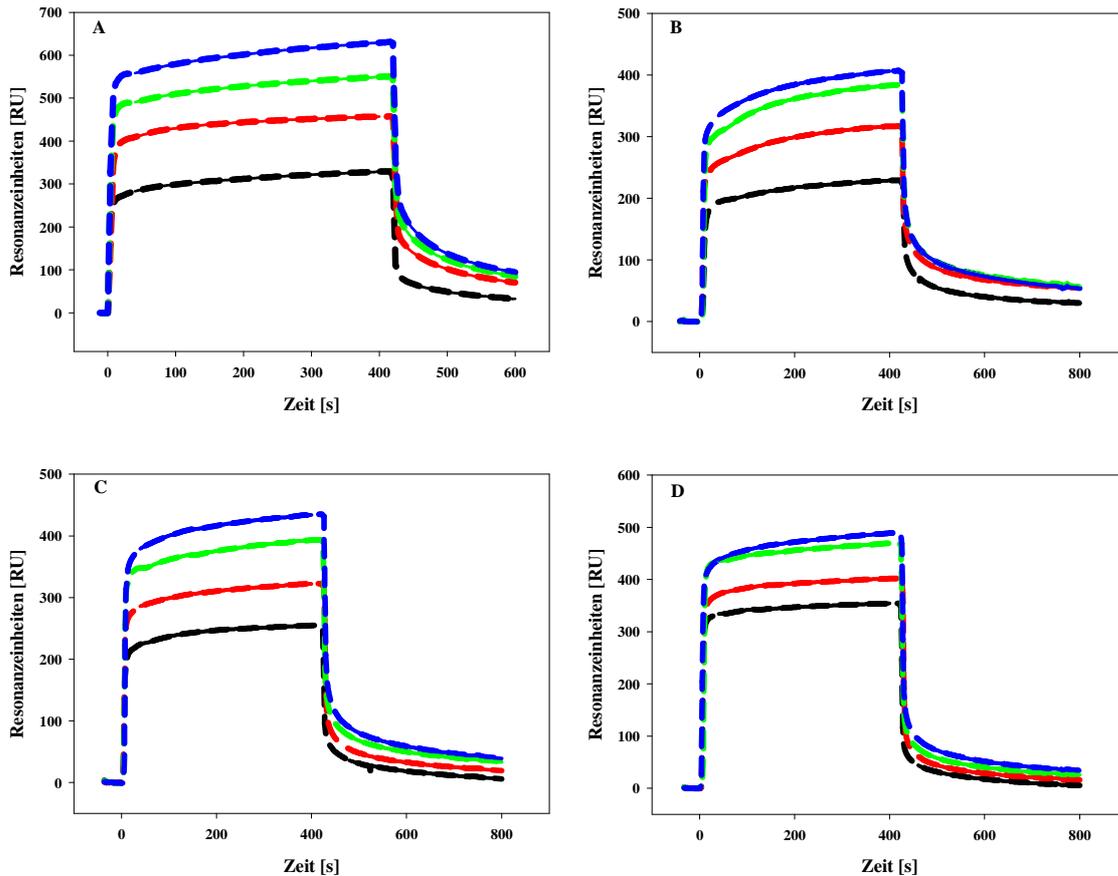
**Abb. 3.9:** Biacore Analyse der Interaktion zwischen AdxWT und unterschiedlichen Konzentrationen an AdR (100 nM schwarz; 200 nM rot; 400 nM grün; 500 nM blau; jeweils unterbrochene Linie) in (A) Puffer, (B) +  $I = 0,4 \text{ mM}$  Putrescin, (C) +  $I = 0,4 \text{ mM}$  Spermidin und (D) +  $I = 0,4 \text{ mM}$  Spermin. Die abgebildeten Kurven zeigen die Interaktion nach Subtraktion des unspezifischen Hintergrundsignals, das separat an einer Adx freien Referenzzelle aufgezeichnet wurde.  $k_{on}$  und  $k_{off}$  jeder Kurve wurden mit einem 1:1 Bindungsmechanismus jeweils separat gefittet (durchgezogene Linie). Dazu muss die Basislinie vor der Injektion auf 0 RU gesetzt werden. Die Experimente wurden mit einem Biacore3000 durchgeführt.

Wie aus diesen Abbildungen ersichtlich wird, korreliert die Stärke des Signals direkt mit der Konzentration der injizierten Probe, unabhängig davon, ob die Probe nur im Puffer oder mit den Polyaminen vorlag. Die aufgenommenen Interaktionskurven (unterbrochene Linie) wurden mit dem Biacore Programm 4.1 mittels eines 1:1 Bindemechanismus ausgewertet, wobei  $k_{on}$  und  $k_{off}$  jeweils separat gefittet wurden (durchgezogene Linie). Zur Berechnung der kinetischen Daten muss die Basislinie vor der Injektion auf 0 RU gesetzt werden (Biacore, 2004).



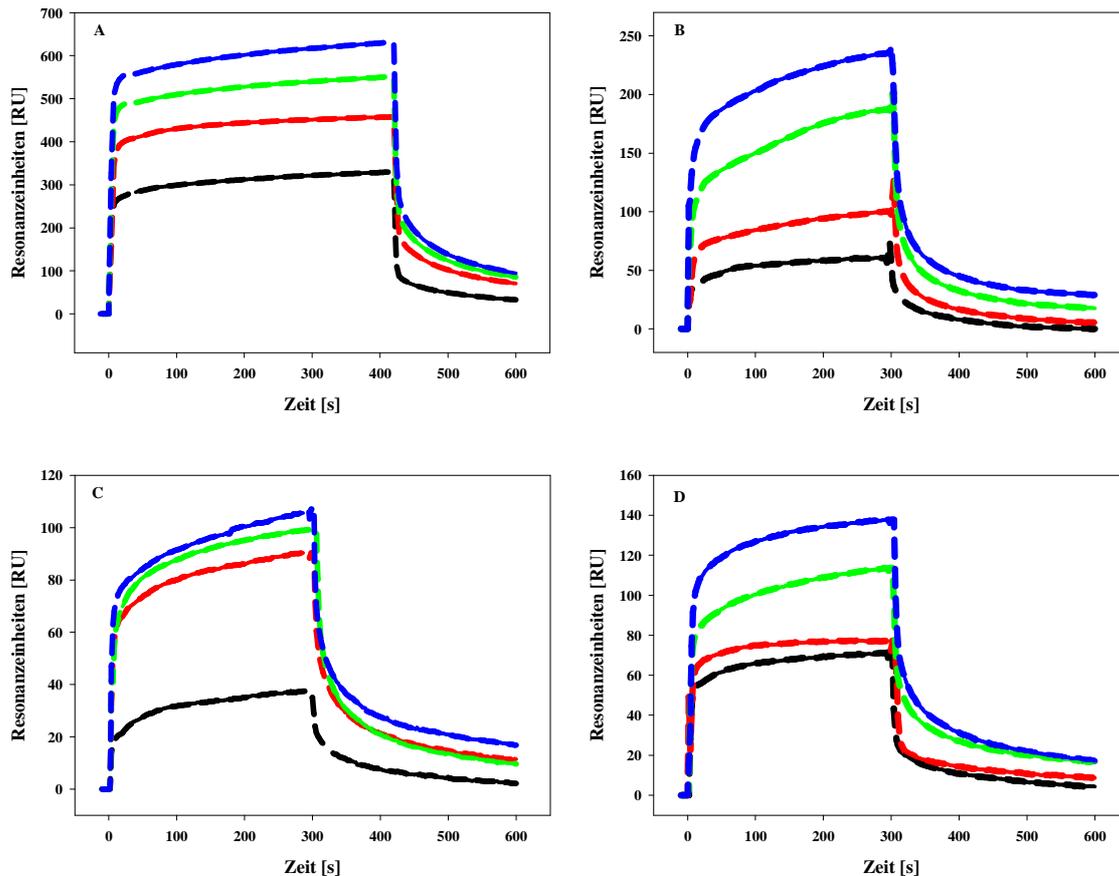
**Abb. 3.10: Biacore Analyse der Interaktion zwischen AdxWT und unterschiedlichen Konzentrationen an AdR (100 nM schwarz; 200 nM rot; 400 nM grün; 500 nM blau; jeweils unterbrochene Linie) in (A) Puffer, (B) + I = 1,0 mM Putrescin, (C) + I = 1,0 mM Spermidin und (D) + I = 1,0 mM Spermin.** Die abgebildeten Kurven zeigen die Interaktion nach Subtraktion des unspezifischen Hintergrundrauschens, das separat an einer Adx freien Referenzzelle aufgezeichnet wurde.  $k_{on}$  und  $k_{off}$  jeder Kurve wurden mit einem 1:1 Bindungsmechanismus jeweils separat gefittet (durchgezogene Linie). Dazu muss die Basislinie vor der Injektion auf 0 RU gesetzt werden. Die Experimente wurden mit einem Biacore3000 durchgeführt.

**Abbildungen 3.11** und **3.12** zeigen typische Sensorgramme für die Interaktion zwischen Adx und unterschiedlichen Konzentrationen an CYP11A1 in Puffer und in Anwesenheit der Polyamine in einer Ionenstärke von  $I = 0,4$  mM (**Abbildungen 3.11**) beziehungsweise  $I = 1,0$  mM (**Abbildungen 3.12**).



**Abb. 3.11: Biacore Analyse der Interaktion zwischen AdxWT und unterschiedlichen Konzentrationen an CYP11A1 (100 nM schwarz; 200 nM rot; 400 nM grün; 500 nM blau; jeweils unterbrochene Linie) in (A) Puffer, (B) + I = 0,4 mM Putrescin, (C) + I = 0,4 mM Spermidin und (D) + I = 0,4 mM Spermin. Die abgebildeten Kurven zeigen die Interaktion nach Subtraktion des unspezifischen Hintergrundrauschens, das separat an einer Adx freien Referenzzelle aufgezeichnet wurde.  $k_{on}$  und  $k_{off}$  jeder Kurve wurden mit einem 1:1 Bindungsmechanismus jeweils separat gefittet (durchgezogene Linie). Dazu muss die Basislinie vor der Injektion auf 0 RU gesetzt werden. Die Experimente wurden mit einem Biacore3000 durchgeführt.**

Auch hier korreliert in allen Fällen die Stärke des Signals direkt mit der Konzentration der injizierten Probe. Die aufgenommenen Interaktionskurven wurden wiederum mit dem Biacore Programm 4.1 mittels eines 1:1 Bindemechanismus ausgewertet.



**Abb. 3.12: Biacore Analyse der Interaktion zwischen AdxWT und unterschiedlichen Konzentrationen an CYP11A1 (100 nM schwarz; 200 nM rot; 400 nM grün; 500 nM blau; jeweils unterbrochene Linie) in (A) Puffer, (B) + I = 1,0 mM Putrescin, (C) + I = 1,0 mM Spermidin und (D) + I = 1,0 mM Spermin. Die abgebildeten Kurven zeigen die Interaktion nach Subtraktion des unspezifischen Hintergrundrauschens, das separat an einer Adx freien Referenzzelle aufgezeichnet wurde.  $k_{on}$  und  $k_{off}$  jeder Kurve wurden mit einem 1:1 Bindungsmechanismus jeweils separat gefittet (durchgezogene Linie). Dazu muss die Basislinie vor der Injektion auf 0 RU gesetzt werden. Die Experimente wurden mit einem Biacore3000 durchgeführt.**

Frühere Untersuchungen zeigten, dass monovalente Kationen die CYP11A1-abhängige Pregnenolonbildung entscheidend beeinflussen. Dies wird mit der ionischen Natur der Interaktion zwischen Adx und AdR beziehungsweise CYP11A1 erklärt (Schiffler *et al.*, 2004). Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurde untersucht, ob die Polyamine in ähnlicher Weise das CYP11A1 System stören. Diese Experimente wurden in Anwesenheit der Polyamine und im Vergleich dazu mit einem monovalenten (KCl) und einem divalenten ( $MgCl_2$ ) Salz durchgeführt. Hierzu wurden die gleichen Ionenstärken ( $I = 0,4$  mM (**Tabelle 3.3**) und 1,0 mM (**Tabelle 3.4**)) eingesetzt. Die zusätzlichen Polyamin- und Salzkonzentrationen waren im Vergleich zur Gesamtionenstärke des Puffers vernachlässigbar

gering und führten zu keiner Änderung des pH-Wertes.

Die getesteten Polyamine modulierten die Interaktionen zwischen den oxidierten Proteinen (AdR und Adx beziehungsweise zwischen Adx und CYP11A1) in einer komplexen Art und Weise (**Tabelle 3.3** und **Tabelle 3.4**). Die in der Kontrolle erhaltenen Bindungskonstanten für die Interaktion zwischen AdxWT und seinen Redoxpartnern (**Tabelle 3.3** und **Tabelle 3.4**) entsprechen den Untersuchungen von Schiffler (Schiffler *et al.*, 2004). Dabei zeigte sich, dass die Komplexbildung zwischen AdxWT und AdR ein schneller Prozess ist, der durch eine  $k_{on}$  Geschwindigkeit von  $3,81 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und einem  $K_D$  im mikromolaren Bereich bestimmt wird (**Tabelle 3.3** und **Tabelle 3.4**). Die Untersuchungen zur Interaktion zwischen AdxWT und CYP11A1 zeigten ein auffällig anderes Bindungsverhalten als AdxWT zur AdR (**Tabelle 3.3** und **Tabelle 3.4**). Für die CYP11A1 Bindung an das Adx wurde eine 48 mal schnellere  $k_{on}$ -Rate als für die Bindung der AdR bestimmt. Auch die  $K_D$  Werte für die beiden untersuchten Komplexe weichen stark voneinander ab. So ist der AdxWT-CYP11A1 Komplex 20-fach stabiler als der AdxWT-AdR Komplex.

**Tabelle 3.3: SPR-Analyse der Interaktion zwischen Adx<sub>ox</sub> mit AdR<sub>ox</sub> and CYP11A1<sub>ox</sub> in Anwesenheit von Polyaminen und Salzen**

Das Bindungsverhalten von AdR oder CYP11A1 (Konzentration beider Analyte zwischen 100 - 500 nM) an Adx, das zuvor auf einen CM5 Chip (~300 RU) immobilisiert wurde, wurde in Biacore HBS-EP Puffer (0,01 M HEPES Puffer, pH 7,4, 0,15 M NaCl mit 0,005% Surfactant P20) bei 25°C untersucht. Die Bindungskurven (Sensorgramme) ohne (Kontrolle) und in Anwesenheit von Salzen (KCl, MgCl<sub>2</sub>) oder der Polyamine (alle bei einer Ionenstärke von  $I = 0,4 \text{ mM}$ ) wurden mit dem Biacore Evaluierungsprogramm 4.1 als ein 1:1 Bindungsmodell analysiert. Standardabweichungen ( $n \geq 4$ ) zu den gezeigten Werten waren innerhalb  $\pm 10 \%$ .

	Adx – AdR			Adx – CYP11A1		
	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D (k_{off}/k_{on})$	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D (k_{off}/k_{on})$
	( $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	( $\text{s}^{-1}$ )	(M)	( $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	( $\text{s}^{-1}$ )	(M)
Kontrolle	$3,81 \cdot 10^3$	$2,86 \cdot 10^{-3}$	$7,50 \cdot 10^{-7}$	$1,83 \cdot 10^5$	$6,76 \cdot 10^{-3}$	$3,69 \cdot 10^{-8}$
KCl	$5,78 \cdot 10^4$	$3,84 \cdot 10^{-3}$	$6,64 \cdot 10^{-8}$	$7,38 \cdot 10^3$	$3,14 \cdot 10^{-3}$	$4,26 \cdot 10^{-7}$
MgCl <sub>2</sub>	$2,77 \cdot 10^3$	$2,54 \cdot 10^{-3}$	$9,17 \cdot 10^{-7}$	$3,52 \cdot 10^4$	$6,54 \cdot 10^{-3}$	$1,86 \cdot 10^{-7}$
Putrescin	$6,43 \cdot 10^4$	$2,14 \cdot 10^{-3}$	$3,33 \cdot 10^{-8}$	$2,21 \cdot 10^4$	$2,09 \cdot 10^{-3}$	$9,46 \cdot 10^{-8}$
Spermidin	$3,22 \cdot 10^3$	$6,68 \cdot 10^{-3}$	$2,08 \cdot 10^{-6}$	$2,84 \cdot 10^4$	$3,76 \cdot 10^{-3}$	$1,14 \cdot 10^{-7}$
Spermin	$3,40 \cdot 10^4$	$2,07 \cdot 10^{-3}$	$6,09 \cdot 10^{-8}$	$3,29 \cdot 10^4$	$5,21 \cdot 10^{-3}$	$1,58 \cdot 10^{-7}$

Bei einer Ionenstärke von  $I = 0,4 \text{ mM}$  (**Tabelle 3.3**) steigerten alle Polyamine mit Ausnahme von Spermidin die Assoziationsrate ( $k_{on}$ ) des AdR-Adx Verbandes bis um das neunfache (Kontrolle  $3,81 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; Putrescin  $6,43 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; Spermidin  $3,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; Spermin  $3,40 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), während die Dissoziation ( $k_{off}$ ) mit Ausnahme von Spermidin ( $k_{off}$  Kontrolle  $2,86 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ; Spermidin  $6,68 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) kaum beeinflusst wurde. Dies führte mit zunehmender Ladung der Polyamine zu einer festeren Bindung, die sich in einem abnehmenden  $K_D$  zeigt (Kontrolle  $7,50 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ; Putrescin  $3,33 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ ; Spermin  $6,09 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ ). Im Gegensatz zur Festigung des AdR-Adx Komplexes schwächten die Polyamine die stärkere Adx-CYP11A1 Bindung wieder hauptsächlich über die Assoziationsrate. Die relative Änderung in den  $k_{on}$ -Werten beider Komplexbildungen (Putrescin > Spermidin > Spermin) korrespondierte mit einer abnehmenden molekularen Konzentration der Polyamine (zweiwertig > dreiwertig > vierwertig), die jeweils bei der gleichen Ionenstärke betrachtet wurden. Die Effekte des einwertigen Salzes KCl, welches in der höchsten Konzentration vorlag, auf die Adx/ AdR beziehungsweise Adx/ CYP11A1 Bindung stimmen sehr gut mit den Ergebnissen der Polyamine Putrescin und Spermin überein.

Überraschenderweise verhielt sich das zweiwertige Salz  $\text{MgCl}_2$  während der Adx/AdR Interaktion wie die Kontrolle und beeinflusste in deutlich geringerem Maße die Adx/CYP11A1 Bindung als die Polyamine oder KCl.

Stärkeres aber tendenziell ähnliches Verhalten wurde bei einer Ionenstärke von  $I = 1,0 \text{ mM}$  beobachtet (**Tabelle 3.4**)

**Tabelle 3.4: SPR-Analyse der Interaktion von Adx<sub>ox</sub> mit AdR<sub>ox</sub> und CYP11A1<sub>ox</sub> in Anwesenheit von Polyaminen und Salzen**

Das Bindungsverhalten von AdR oder CYP11A1 (Konzentration beider Analyte zwischen 100 - 500 nM) an Adx, das zuvor auf einen CM5 Chip (~300 RU) immobilisiert wurde, wurde in Biacore HBS-EP Puffer bei 25°C untersucht. Die Bindungskurven (Sensorgramme) der Interaktionspartner ohne (Kontrolle) und in Anwesenheit von Salzen (KCl, MgCl<sub>2</sub>) oder der Polyamine (alle bei einer Ionenstärke von I = 1,0 mM) wurden mit dem Biacore Auswertungsprogramm 4.1 als ein 1:1 Bindungsmodell analysiert. Die Standardabweichungen (n ≥ 4) zu den gezeigten Werten lagen innerhalb ± 10 %.

	Adx – AdR			Adx – CYP11A1		
	$k_{on}$ (M <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> )	$k_{off}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_D$ ( $k_{off}/k_{on}$ ) (M)	$k_{on}$ (M <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> )	$k_{off}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_D$ ( $k_{off}/k_{on}$ ) (M)
Kontrolle	$3,81 \cdot 10^3$	$2,86 \cdot 10^{-3}$	$7,50 \cdot 10^{-7}$	$1,83 \cdot 10^5$	$6,76 \cdot 10^{-3}$	$3,69 \cdot 10^{-8}$
KCl	$4,13 \cdot 10^4$	$6,06 \cdot 10^{-3}$	$1,47 \cdot 10^{-7}$	$1,96 \cdot 10^4$	$4,70 \cdot 10^{-3}$	$2,40 \cdot 10^{-7}$
MgCl <sub>2</sub>	$2,99 \cdot 10^3$	$2,50 \cdot 10^{-3}$	$8,36 \cdot 10^{-7}$	$6,49 \cdot 10^4$	$5,78 \cdot 10^{-3}$	$8,91 \cdot 10^{-8}$
Putrescin	$3,12 \cdot 10^4$	$5,03 \cdot 10^{-3}$	$1,61 \cdot 10^{-7}$	$8,64 \cdot 10^3$	$3,11 \cdot 10^{-3}$	$3,60 \cdot 10^{-7}$
Spermidin	$2,74 \cdot 10^4$	$4,71 \cdot 10^{-3}$	$1,71 \cdot 10^{-7}$	$1,86 \cdot 10^4$	$3,53 \cdot 10^{-3}$	$1,90 \cdot 10^{-7}$
Spermin	$1,76 \cdot 10^4$	$5,77 \cdot 10^{-3}$	$3,28 \cdot 10^{-7}$	$2,71 \cdot 10^4$	$2,79 \cdot 10^{-3}$	$1,03 \cdot 10^{-7}$

Bei einer Ionenstärke von I = 1,0 mM (**Tabelle 3.4**) steigerten alle drei Polyamine die Assoziationsrate des AdR-Adx Verbandes bis um das achtfache (Kontrolle  $3,81 \cdot 10^3$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>; Putrescin  $3,12 \cdot 10^4$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>; Spermidin  $2,74 \cdot 10^4$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>; Spermin  $1,76 \cdot 10^4$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>), während die Dissoziation geringer beeinflusst wurde. Dies führte mit zunehmender Ladung der Polyamine zu einer festeren Bindung, die sich in einem abnehmenden  $K_D$  zeigt (Kontrolle  $7,50 \cdot 10^{-7}$  M; Putrescin  $1,61 \cdot 10^{-7}$  M; Spermidin  $1,71 \cdot 10^{-7}$  M; Spermin  $3,28 \cdot 10^{-7}$  M). Im Gegensatz zur Festigung des AdR-Adx Komplexes schwächten die Polyamine die stärkere Adx-CYP11A1 Bindung wieder hauptsächlich über die Assoziationsrate. Die relative Änderung in den  $k_{on}$ -Werten beider Komplexbildungen (Putrescin > Spermidin > Spermin) korrespondierte mit einer abnehmenden molekularen Konzentration der Polyamine (zweiwertig > dreiwertig > vierwertig), die jeweils bei der gleichen Ionenstärke betrachtet wurden. Die Effekte des einwertigen Salzes KCl, welches in der höchsten Konzentration vorlag, auf die Adx/AdR beziehungsweise Adx/CYP11A1 Bindung stimmt wiederum sehr gut mit den Ergebnissen der Polyamine, vor allem von Putrescin und Spermidin, überein.

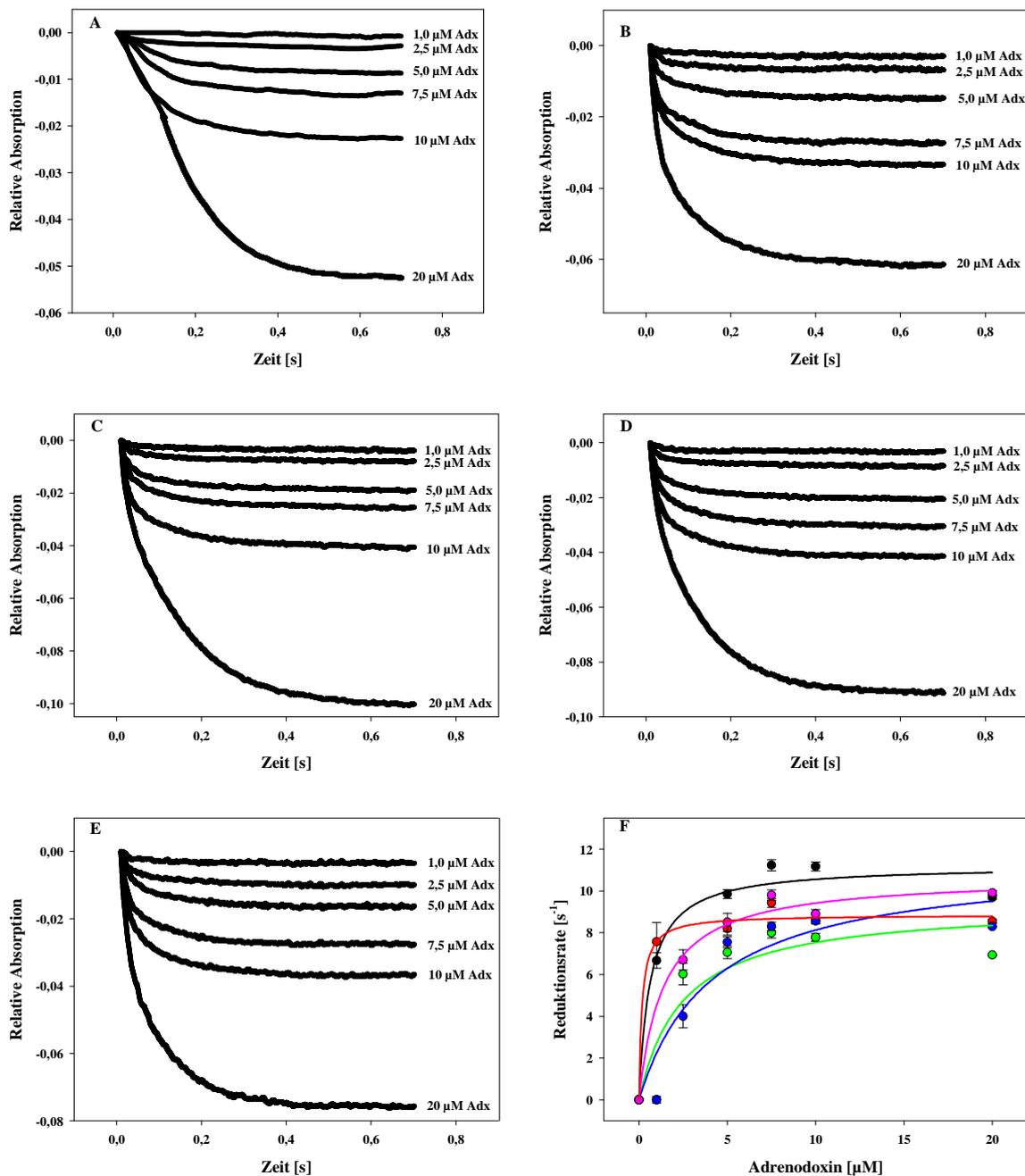
Das zweiwertige Salz MgCl<sub>2</sub> verhielt sich während der Adx/AdR Interaktion wie die Kontrolle und beeinflusste in deutlich geringerem Maße die Adx/CYP11A1 Bindung als die Polyamine oder KCl.

Die Experimente zeigen, dass sowohl die Bindung des Cytochroms als auch die Bindung der AdR an das Adx durch die Anwesenheit der Salze und noch stärker durch die Polyamine beeinflusst werden. Da hier mit gleichen Ionenstärken gearbeitet wurde, lassen sich die deutlichen Unterschiede nicht nur über die Anzahl der Ladungen an den Polyaminen erklären. Unbestreitbar wird daher auch ein spezifischer Effekt der Polyamine vor allem im Vergleich zu den Salzen deutlich.

### 3.1.4 Stopped-Flow Messungen

Untersuchungen mittels Stopped-Flow erlauben es, die Reduktionskinetiken jeder einzelnen Komponente des mitochondrialen Steroidhydroxylierungssystems in Anwesenheit der Polyamine direkt zu verfolgen und zu analysieren. Zum Vergleich wurde das einwertige Salz KCl verwendet. Obwohl das Redoxverhalten der einzelnen Proteine in Anwesenheit von KCl bereits untersucht wurde (Schiffler *et al.*, 2004; Zöllner *et al.*, 2004), sind die Kinetiken dieses Systems bei Zugabe mehrfach geladener Stoffe (wie der Polyamine) in kleineren Konzentrationen (bis zu 1,25 mM) noch nicht bestimmt worden. Daher war es notwendig, die beiden bedeutenderen Reduktionsschritte, die Reduktion von Adx durch AdR und die Bildung des Adx-abhängigen CYP11A1-CO Komplexes, einzeln zu betrachten.

In einem ersten Schritt wurde untersucht, ob das bereits bekannte Reduktionsmuster (Schiffler *et al.*, 2004) des Adx auch in Anwesenheit der Polyamine beobachtet werden kann. Dazu wurde bei einer bestimmtem Ionenstärke ( $I = 0,4 \text{ mM}$ ), um Ionenstärkeeffekte der Salze und Polyamine untereinander zu vermeiden, die Konzentrationsabhängigkeit der AdxWT-Reduktion durch präreduzierte AdR (**Abbildung 3.13**) untersucht. Die bereits in unserer Gruppe publizierten Ergebnisse wurden bestätigt und konnten auf die eingesetzten Polyaminkonzentrationen übertragen werden. In allen Fällen hängt die Reduktionsrate des Adx von der eingesetzten Adx-Konzentration ab. Eine maximale Geschwindigkeit wird bei einem Adx:AdR Verhältnis von 2:1 erreicht. Oberhalb eines 2:1 Verhältnisses kommt es zu der bereits beschriebenen Eigenreduktion des Adx (Zöllner *et al.*, 2004). Auch die Polyamine, eingesetzt in einer Ionenstärke von 0,4 mM, um Ionenstärkeeffekte der Polyamine und Salze, bedingt durch die unterschiedliche Anzahl ihrer Ladungen, auszuschließen, verschieben dieses Verhältnis nicht. **Abbildung 3.13** zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der Reduktion des AdxWT durch AdR in Puffer (**A**), KCl ( $I = 0,4 \text{ mM}$ , **B**), Putrescin ( $I = 0,4 \text{ mM}$ , **C**), Spermidin ( $I = 0,4 \text{ mM}$ , **D**) und Spermin ( $I = 0,4 \text{ mM}$ , **E**).



**Abb. 3.13: (A-E) Stopped-Flow Analyse der Adx Reduktion durch NADPH reduzierte AdR in Abhängigkeit von der Adx Konzentration.** Die transienten Reaktionsverläufe für die Adx Reduktion durch 10  $\mu\text{M}$  AdR wurden bei 415 nm betrachtet. Alle Proben enthielten 200  $\mu\text{M}$  NADPH. Zum besseren Vergleich wurden die Anfangspunkte aller Kurven auf 0 gesetzt. (A) Puffer, (B)  $I = 0,4$  mM KCl, (C)  $I = 0,4$  mM Putrescin, (D)  $I = 0,4$  mM Spermidin und (E)  $I = 0,4$  mM Spermin. (F) **Plot der erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten für die Adx Reduktion gegen die eingesetzten Adx Konzentrationen.** Die in (A bis E) gezeigten Daten wurden mittels eines monoexponentialen Fits ausgewertet. Die gezeigten Punkte (Puffer schwarz; KCl rot; Putrescin grün; Spermidin blau; Spermin pink) repräsentieren aus 5 unabhängigen Messungen ermittelte Mittelwerte. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. Die Plots, denen der Ursprung hinzugefügt wurde, wurden hyperbolisch gefittet.

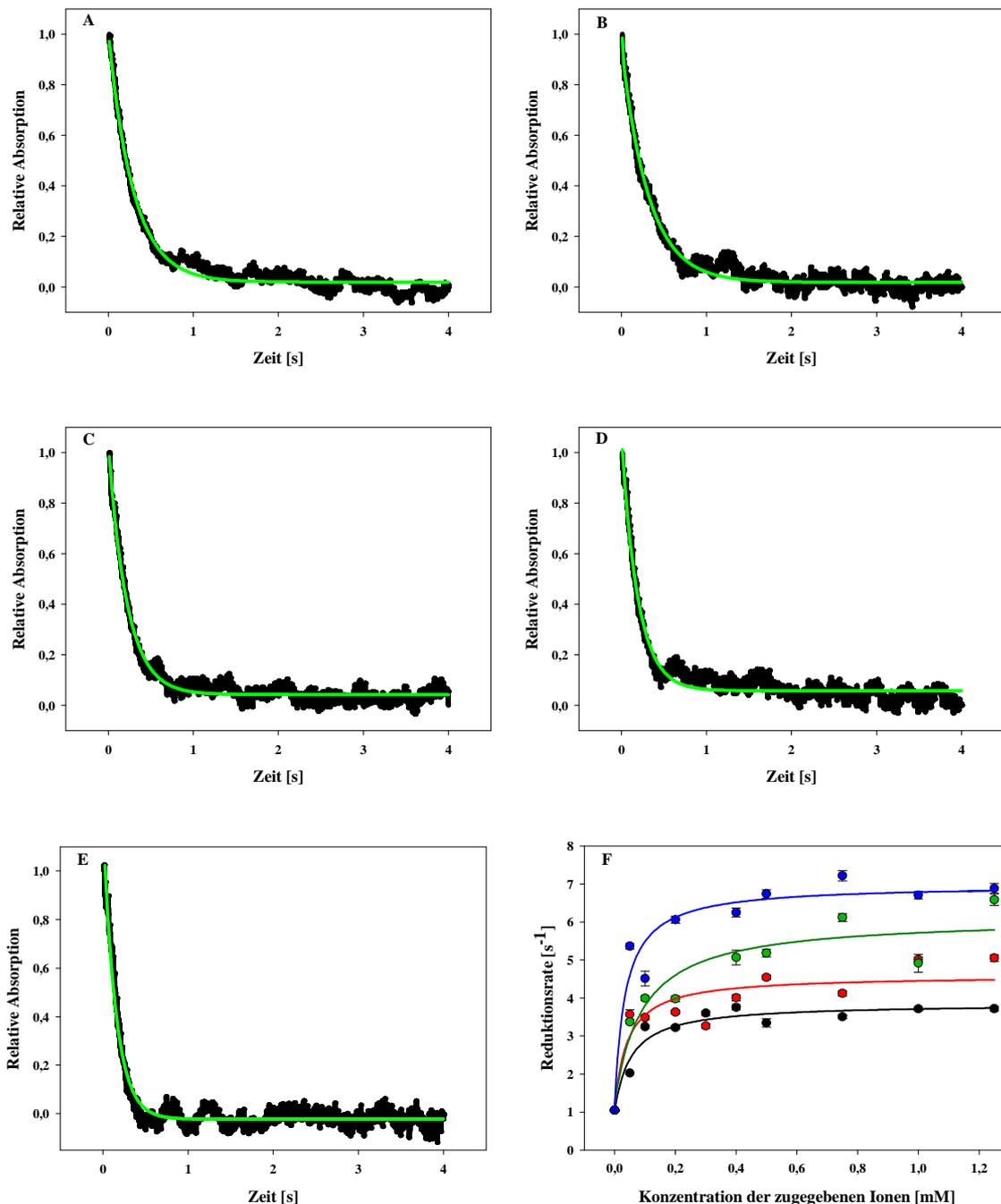
Da nur die maximale Geschwindigkeit von Interesse ist, wurden die folgenden Messungen mit dem Adx:AdR Verhältnis 2:1 durchgeführt. In diesem Konzentrationsbereich, in dem auch das stabile Gleichgewicht vorliegt, ist es möglich, die beobachteten Reduktionsraten mit der Elektronentransferrate ( $k_{ET}$ ) direkt zu vergleichen. Zur Untersuchung des Einflusses der Polyamine und des Salzes auf das Reduktionsverhalten des Adx wurden Experimente mit unterschiedlichen KCl- und Polyamin- Konzentrationen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente wurden mit der Kontrolle (nur Puffer ohne Zusätze) verglichen.

In einer ersten Reihe von Messungen, wurde der zweite Schritt dieser Elektronentransferkette, nämlich die Reduktion des Adx durch reduziertes AdR untersucht. Zwei unterschiedliche Ansätze für die Stopped-Flow Messungen wurden verglichen. a) In eine Spritze wurde das NADPH, in die zweite die AdR und das Adx jeweils oxidiert vorgelegt. b) In einem vergleichenden Experiment wurden NADPH und AdR in der einen Spritze und Adx in der anderen vorgelegt. Während vor Versuchsbeginn das Adrenodoxin weiterhin oxidiert vorlag, wurde die AdR durch das NADPH bereits reduziert. Die auf diese Art erhaltenen maximale Reduktionsraten ( $k_{obs, max}$ ) wurden aus den Kinetiken der Adx Reduktion bei 414 nm ermittelt (**Tabelle 3.5, Abbildung 3.14**). Die bestimmten Geschwindigkeitskonstanten für die Reduktion von AdxWT durch AdR waren in der gleichen Größenordnung, wie die mittels one-shot mixing Technik publizierten Werte (Schiffler *et al.*, 2004).

**Tabelle 3.5: Kinetische Parameter der Elektronentransferpartner des bovinen CYP11A1 Systems (Teil 1, AdR-Adx)**

In einem Stopped-Flow Assay wurde die Reduktion des Adx durch reduzierte AdR bei 414 nm verfolgt und die kinetischen Graphen monoexponential gefittet. Dem Reaktionspuffer 50 mM HEPES Puffer (pH 7,3) mit 0,05% Tween20 wurden KCl, Putrescin, Spermidin oder Spermin in einer jeweiligen Endkonzentration von 0 – 1,25 mM zugesetzt.

Versuchsansatz	a)	b)
	$k_{obs,max} [s^{-1}]$	$k_{obs,max} [s^{-1}]$
	Adx Reduktion durch AdR	Adx Reduktion durch präreduzierte AdR
mit KCl	$2,78 \pm 0,33$	$2,86 \pm 0,28$
mit Putrescin	$3,58 \pm 0,40$	$3,46 \pm 0,61$
mit Spermidin	$5,07 \pm 0,90$	$4,93 \pm 0,68$
mit Spermin	$5,90 \pm 0,78$	$5,87 \pm 0,63$



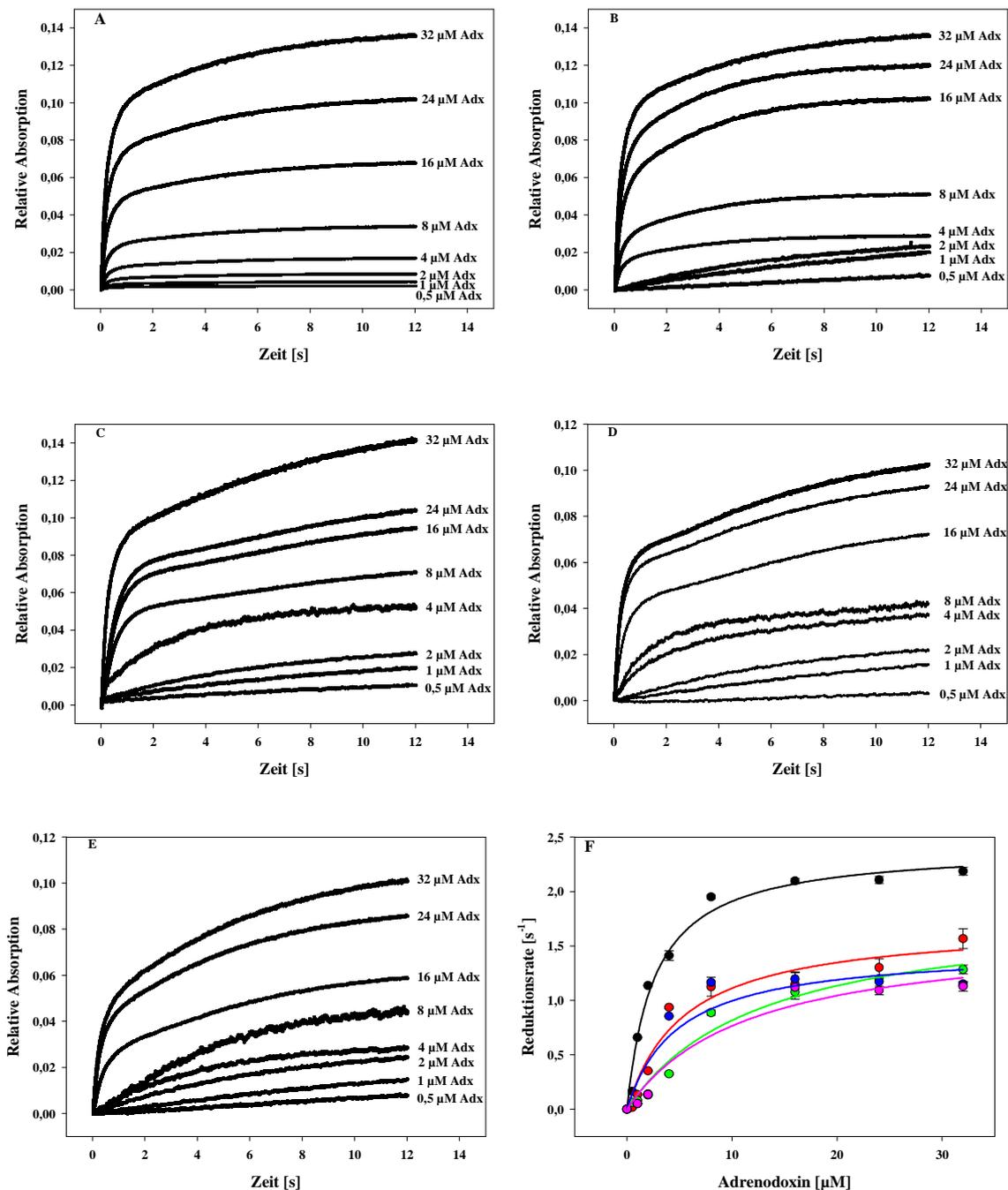
**Abb 3.14: Kinetischer Verlauf für die Reduktion des Adx in Anwesenheit der Polyamine.**

Die Reduktion des Adx durch präreduzierte AdR in Puffer (A) und in Anwesenheit von 0,5 mM KCl (B) oder den Polyaminen Putrescine (0,5 mM; C), Spermidin (0,5 mM; D) Spermin (0,5 mM; E) wurde bei 414 nm betrachtet. Die Proben bestanden aus 4  $\mu$ M AdR und 2  $\mu$ M Adx. Der Anfangs- und Endpunkt jeder Kurve wurde zum besseren Vergleich auf 1 beziehungsweise 0 gesetzt. Die Kurven wurden monoexponential gefittet (grüne Linie). Der Korrelationskoeffizient der Fits lag jeweils über  $R = 0,99$ . (F) Stopped-Flow Messungen der Interaktion zwischen Adx und AdR in Anwesenheit von KCl (schwarz), Putrescine (rot), Spermidin (grün) und Spermin (blau). Die Reduktion des Adx (2  $\mu$ M) durch NADPH-reduziertes AdR (4  $\mu$ M) wurde bei 414 nm verfolgt. Die Reduktionsraten der 1. Ordnung mit den Standardabweichung ( $n \geq 5$ ) wurden mit einer monoexponentiellen Kurve mittels SigmaPlot 9.0 gefittet

Die sich bereits jeweils im Puffer befindlichen Polyamine und KCl steigerten die Reduktionsrate des Adx ( $1,04 \text{ s}^{-1}$ ) nach dem Mischen fast um das sechsfach in der Reihenfolge: KCl ( $2,86 \text{ s}^{-1}$ ) < Putrescin ( $3,46 \text{ s}^{-1}$ ) < Spermidin ( $4,93 \text{ s}^{-1}$ ) < Spermin ( $5,87 \text{ s}^{-1}$ ) (**Tabelle 3.5 b**). Damit war die mit Spermin erzielte Reduktionsrate doppelt so groß als die Reduktionsrate der Kontrolle KCl. Auch zeigten sich jeweils bei einer Konzentration < 0,1 mM schon halbmaximale Effekte (**Abbildung 3.14 F**). Vergleichbare Reduktionsraten wurden auch durch das Mischen von NADPH mit den beiden oxidierten Proteinen erhalten (**Tabelle 3.5 a**).

Um die maximale Reduktionsgeschwindigkeit des CYP11A1 in Anwesenheit der Polyamine zu bestimmen, wurde die Abhängigkeit der CYP11A1-Reduktion von der Adx Konzentration wiederum bei einer bestimmtem Ionenstärke ( $I = 0,4 \text{ mM}$ ) bestimmt (**Abbildung 3.15**). Auch hier wurde untersucht, ob sich in Anwesenheit der Polyamine das bereits bekannte Reduktionsmuster des Cytochroms (Schiffler *et al.*, 2004) verändert. Um die Reduktion von CYP11A1 durch Adx zu untersuchen, wurden reduzierte AdR und reduziertes Adx in der Anwesenheit von Kohlenstoffmonooxid mit oxidiertem CYP11A1 gemischt. Die CO-Komplexbildung des ferro-CYP11A1, die nur erfolgt, nachdem das Cytochrom reduziert wurde, wurde bei 450 nm aufgezeichnet (Hannemann *et al.*, 2001; Schiffler *et al.*, 2004).

In diesen Experimenten wurde Adx zuerst durch AdR und NADPH reduziert, so dass die beobachteten Absorptionsänderungen ausschließlich vom Adx abhängen. Die für die Reduktion des CYP11A1 durch das Adx erhaltenen Graphen konnten am besten durch einen mono-exponentiellen Fit beschrieben werden (**Abbildung 3.15**). Die bereits in unserer Gruppe publizierten Ergebnisse wurden bestätigt und konnten auch auf die eingesetzten Polyaminkonzentration übertragen werden. In allen Fällen hängt die Reduktionsrate des CYP11A1 von der eingesetzten Adx-Konzentration ab. Auch die Polyamine eingesetzt in einer Ionenstärke von 0,4 mM (um Ionenstärkeeffekte durch die unterschiedliche Anzahl der Ladungen der Polyamine und Salze auszuschließen) verschieben dieses Verhältnis nicht. Die bestimmten Geschwindigkeitskonstanten für die Reduktion von CYP11A1 durch Adx waren wiederum in der gleichen Größenordnung, wie die mittels one-shot mixing Technik publizierten Werte (Schiffler *et al.*, 2004). **Abbildung 3.15** zeigt die gleiche Konzentrationsabhängigkeit der Reduktion des CYP11A1 durch Adx in Puffer (**A**), KCl ( $I = 0,4 \text{ mM}$ , **B**), Putrescin ( $I = 0,4 \text{ mM}$ , **C**), Spermidin ( $I = 0,4 \text{ mM}$ , **D**) und Spermin ( $I = 0,4 \text{ mM}$ , **E**).



**Abb. 3.15:** (A-E) Stopped-Flow Analyse der Reduktion von CYP11A1 durch verschiedene Adx<sub>red</sub> Konzentrationen. Die transienten Reaktionsverläufe für die Reduktion wurden bei 450 nm betrachtet. Alle Proben enthielten 200 μM NADPH. Zum besseren Vergleich wurden die Anfangspunkte aller Kurven auf 0 gesetzt. (A) Puffer, (B) I = 0,4 mM KCl, (C) I = 0,4 mM Putrescin, (D) I = 0,4 mM Spermidin und (E) I = 0,4 mM Spermin. (F) Plot der erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten für die Reduktion von CYP11A1 durch Adx<sub>red</sub> gegen die eingesetzten Adx Konzentrationen. Die in (A bis E) gezeigten Daten wurden mittels eines monoexponentiellen Fits ausgewertet. Die gezeigten Punkte (Puffer schwarz; KCl rot; Putrescin grün; Spermidin blau; Spermin pink) repräsentieren aus 5 unabhängigen Messungen ermittelte Mittelwerte. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. Die Plots, denen der Ursprung hinzugefügt wurde, wurden hyperbolisch gefittet.

Zur Untersuchung des Einflusses der Polyamine und des Salzes auf das Reduktionsverhalten des CYP11A1 wurden Experimente mit unterschiedlichen KCl- und Polyamin- Konzentrationen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente wurden mit der Kontrolle (nur Puffer ohne Zusätze) verglichen.

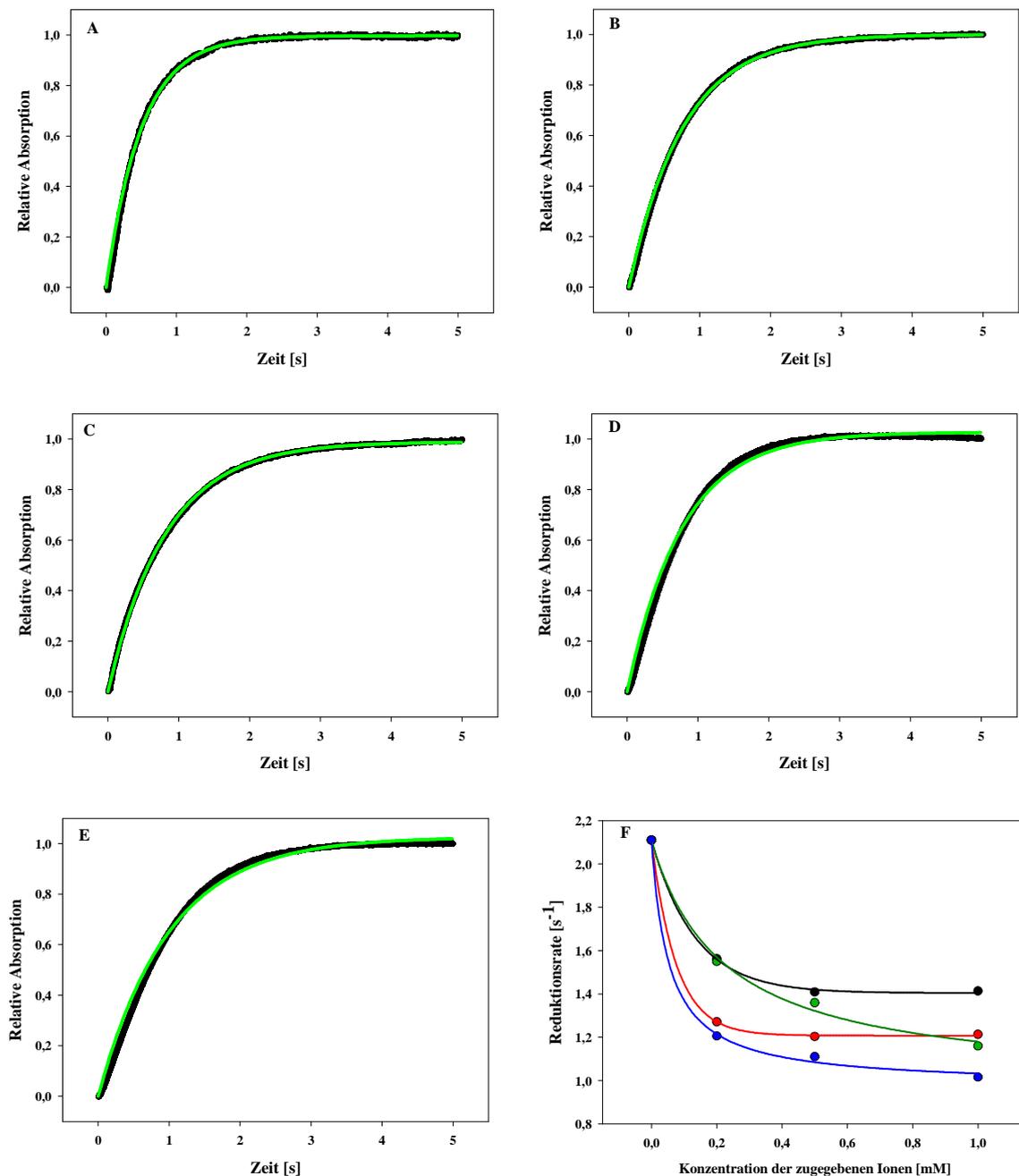
Die Reduktion des Cytochroms konnte über die Adx-abhängige Bildung des CYP11A1-CO Komplexes bei 450 nm beobachtet werden. Eine Spritze enthielt CYP11A1 während die andere Spritze mit NADPH, AdR und Adx gefüllt war. Die Mischung in der zweiten Spritze wurde für ein paar Minuten Ruhen gelassen, um eine komplette Reduktion des Adx zu gewährleisten. Die Lösungen wurden vor Überführung in die beiden Spritzen mit CO gesättigt. Die auf diese Art erhaltenen maximale Reduktionsraten ( $k_{obs, max}$ ) wurden aus den Kinetiken der Adx Reduktion bei 450 nm ermittelt (**Tabelle 3.6, Abbildung 3.16**).

**Tabelle 3.6: Kinetische Parameter der Elektronentransferpartner des bovinen CYP11A1 Systems (Teil 2, Adx-CYP11A1)**

In einem Stopped-Flow Assay wurde die Adx-abhängige Bildung des CYP11A1-CO Komplexes wurde bei 450 nm gemessen. Dem Reaktionspuffer 50 mM HEPES Puffer (pH 7,3) mit 0,05% Tween20 wurden KCl, Putrescin, Spermidin oder Spermin in einer jeweiligen Endkonzentration von 0 - 1 mM für die Reduktion des Cytochroms zugesetzt. Die hier gezeigten Werte  $k_{obs, max}$  stammen von Experimenten, die sich im stabilen Gleichgewicht befanden, und entsprechen  $k_{ET}$ .

	$k_{obs, max} [s^{-1}]$
	CYP11A1 Reduktion durch Adx
mit KCl	$1,41 \pm 0,01$
mit Putrescin	$1,21 \pm 0,01$
mit Spermidin	$1,18 \pm 0,09$
mit Spermin	$1,06 \pm 0,08$

In Anwesenheit der Kationen nahm die erhaltene Geschwindigkeitsrate für die Reduktion des CYP11A1 in der Reihenfolge K ( $1,41 s^{-1}$ ) < Putrescin ( $1,21 s^{-1}$ ) = Spermidin ( $1,18 s^{-1}$ ) < Spermin ( $1,06 s^{-1}$ ) (**Tabelle 3.6 und Abbildung 3.16 F**) ab. Ähnlich wie bei dem bereits beschriebenen AdR-Adx Elektrontransfer waren bereits sehr geringe Konzentrationen an Polyaminen und KCl (< 0,2 mM) ausreichend, um 50% des Gesamteffekts zu erhalten. Dies war bei den Polyaminen stärker ausgeprägt als bei KCl.



**Abb 3.16: Kinetischer Verlauf für die Reduktion des CYP11A1 in Anwesenheit der Polyamine.**

Die Reduktion des CYP11A1 durch präreduziertes Adx in Puffer (A) und in Anwesenheit von 0,5 mM KCl (B) oder den Polyaminen Putrescin (0,5 mM; C), Spermidin (0,5 mM; D) Spermin (0,5 mM; E) wurde bei 450 nm betrachtet. Bei dieser Wellenlänge wird die CYP11A1-CO Komplexbildung verfolgt. Die Proben bestanden in der jeweiligen Endkonzentration aus 2  $\mu\text{M}$  CYP11A1, 4  $\mu\text{M}$  AdR und 8  $\mu\text{M}$  Adx. Der Anfangs- und Endpunkt jeder Kurve wurde zum besseren Vergleich auf 0 beziehungsweise 1 gesetzt. Die Kurven wurden monoexponentiellen gefittet (grüne Linie). Der Korrelationskoeffizient der Fits lag jeweils über  $R = 0,99$ . (F) Stopped-Flow Messungen des Interaktion zwischen Adx und CYP11A1 in Anwesenheit von KCl (schwarz), Putrescin (rot), Spermidin (grün) und Spermin (blau). Für die Reduktion von CYP11A1 (4  $\mu\text{M}$ ) durch präreduziertes Adx (8  $\mu\text{M}$  Adx, 4  $\mu\text{M}$  AdR, 400  $\mu\text{M}$  NADPH) wurde die CYP11A1-CO Komplexbildung bei 450 nm betrachtet. Die Reduktionsraten der 1. Ordnung mit den Standardabweichung ( $n \geq 5$ ) wurden mit einer hyperbolischen Kurve mit dem SigmaPlot 9.0 Programm gefittet.

Dies weist darauf hin, dass die Polyamine neben einem Einfluss durch ihre Ladung auch eine spezifische Behinderung auf die Protein-Protein Interaktionen ausüben (**Abbildung 3.14 F** und **3.16 F**). Im Moment ist noch nicht klar, warum die Reduktionskurven mit KCl und Putrescin einen anderen Verlauf nehmen, als die mit Spermidin und Spermin.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Einfluss der Polyamine auf die Interaktion zwischen Adx und CYP11A1 zu einem geringen Maße elektrostatischer Natur ist. Mit steigender Konzentration der Ionen nimmt in allen Fällen die Reduktionsgeschwindigkeit ab. Diese Beobachtung bestätigt die ionische Struktur des Adx-CYP11A1 Komplexes (Lambeth *et al.*, 1984; Tuls *et al.*, 1987; Adamovich *et al.*, 1989; Tuls *et al.*, 1989; Wada and Waterman, 1992). Darüber hinaus zeigen die Polyamine auch hier wieder eine für jedes einzelne Polyamin spezielle Wirkungsweise, die von der Anzahl und im Vergleich zu KCl von der Anordnung der Ladung abhängt.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Stopped-Flow Messungen, dass durch die Anwesenheit der Polyamine die Interaktionen mit AdR und CYP11A1 gegensätzlich, aber auf eine spezifische Art und Weise beeinflusst werden.

### 3.2 Docking

Alle Dockingexperimente für die Bindung der Polyamine an Adrenodoxin und die Adrenodoxinreduktase wurden von Frau M.Sc. Susanne Eyrisch aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Volkhard Helms, Zentrum für Bioinformatik, Universität des Saarlandes, Saarbrücken durchgeführt. Diese sollten die experimentellen Ergebnisse unterstützen und ein mögliches Modell entwerfen, wie die Polyamine mit den Proteinen der CYP11A1 Elektronentransferkette interagieren könnten. Die Polyamine wurden zum einen in die bereits bekannten Kristallstrukturen von oxidiertem Adx, AdR und dem oxidierten Adx – AdR Komplex gedockt. In einem nächsten Schritt wurden die Polyamine in Molekulardynamik (MD) Snapshots, die aus einer molekularen Simulation des oxidierten Adx ausgeschnitten wurden, gedockt. Da bis zu diesem Zeitpunkt keine Kristallstrukturen für CYP11A1 und den Adx-CYP11A1 Komplex existieren, waren keine Berechnungen und Dockingergebnisse für diese Systeme möglich. **Tabelle 3.7** fasst die besten Dockingresultate für jedes Polyamin und jedes der beiden Proteine zusammen.

**Tabelle 3.7: Beste Dockingergebnisse für jedes Polyamin und Rezeptor.**

Polyamin	Adx (MD Snapshots)	Adx (Röntgenstruktur)		AdR (Röntgenstruktur)		Adx – AdR (Röntgenstruktur)	
	Score [kcal/mol]	Score [kcal/mol]	Bindungs- stelle Nr.	Score [kcal/mol]	Bindungs- stelle Nr.	Score [kcal/mol]	Bindungs- stelle Nr.
Putrescin	-10,06	-7,64	1	-7,30	5	-8,29	3
Spermidin	-13,22	-10,06	1	-8,80	5	-9,83	2
Spermin	-16,64	-13,14	1	-11,29	5	-11,22	4

Wie zu erwarten war, verbessern sich mit der Anzahl der Aminogruppen am Liganden die Dockingresultate für das gleiche Protein. Diese zeigt, dass alle Liganden in alle einigermaßen günstigen Bindungsstellen gedockt werden können. Nicht überraschend fallen die Dockingergebnisse für die Adx Kristallstruktur schlechter aus als die der Adx MD Snapshots. Die besten Ergebnisse für die MD Snapshots wurden aus den Dockingergebnissen an 4000 unterschiedliche Adx Konformeren ausgewählt, während die besten Ergebnisse für die Kristallstrukturen nur aus dem Docking an unterschiedlichen Stellen der gleichen

Konformere ausgewählt wurden. Betrachtet man nur die Dockingergebnisse der Kristallstrukturen, so deutet das Resultat darauf hin, dass die drei Polyamine sowohl an Adx, als auch an AdR und den Adx – AdR Komplex binden können. Berücksichtigt man alle Dockingergebnisse unterhalb einer vorgegebenen Grenze, können fünf bevorzugte Bindungsstellen beschrieben werden, die in **Tabelle 3.8** aufgeführt und in **Abbildung 3.17** gezeigt werden.

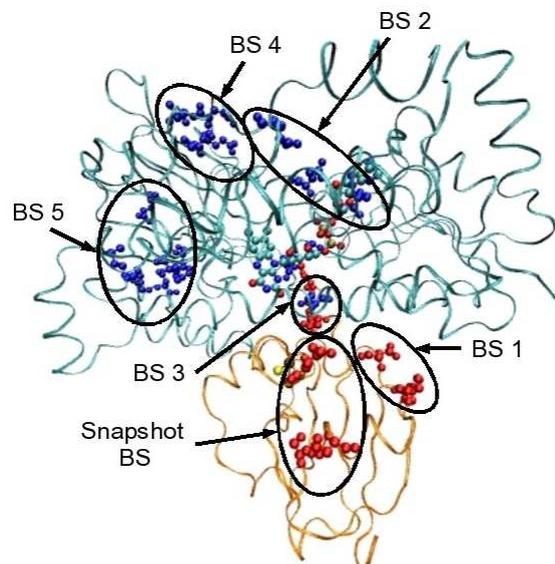
**Tabelle 3.8: Überblick über die bevorzugten Bindungsstellen, die durch flexibles Ligandendocking identifiziert wurden.**

Bindungsstelle Nr.	Max. Score in Adx [kcal/mol]			Max. Score in AdR [kcal/mol]			Max. Score in Adx – AdR [kcal/mol]			Beschreibung
	Put	Spd	Spn	Put	Spd	Spn	Put	Spd	Spn	
1	-7,64	-10,06	-13,14	-	-	-	-6,57	-8,43	-10,25	Interface des Adx: D15, D39, D41
2	-	-	-	-6,58	-8,50	-10,07	-8,14	-9,83	-11,19	FAD Region der AdR: FAD, Y102, D105, D135
3	-	-	-	-5,71	-7,52	-8,91	-8,29	-9,49	-11,10	Komplexinterface: A114, R115, S117 (Adx) und G371, T373, T378 (AdR)
4	-	-	-	-6,27	-7,92	-10,07	-7,23	-9,57	-11,22	E115, E116, L117, V120 (AdR)
5	-	-	-	-7,30	-8,80	-11,29	-7,17	-8,39	-10,91	M222, D224, D227, L274, F276, E318 (AdR)

Put Putrescin; Spd Spermidin; Spn Spermin

**Tabelle 3.8** zeigt, dass laut der Dockingergebnisse in der Kristallstruktur des freien Adx die Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin nur eine bevorzugte Bindungsstelle, die Region um die Aminosäuren Asp-15, Asp-39 und Asp-41, besitzen. Die Affinität (für Putrescin –7,64 kcal/mol, für Spermidin – 10,06 kcal/mol und für Spermidin –13,14 kcal/mol) dieser Region lässt nach, wenn Adx an AdR bindet (Putrescin –6,57 kcal/mol, Spermidin –8,43 kcal/mol und Spermidin –10,25 kcal/mol).

Alle anderen putativen Bindungsstellen der Polyamine liegen auf der AdR Oberfläche (Bindungsstellen 2 bis 5, Kristallstruktur der freien AdR). Mit Ausnahme der Bindungsstelle Nr. 5 steigern diese Stellen ihre Affinitäten für die Polyamine im AdR-Adx Komplex. Da die Bindungsstellen Nr. 2, 4 und 5 in einiger Entfernung zur Bindungsfläche mit Adx liegen, war es überraschend, dass diese Bindungsstellen von den Polyaminen mehr (Bindungsstellen 2 und 4) oder weniger (Bindungsstelle Nr. 5) bei der Komplexbildung bevorzugt wurden als die Stelle am Adx (Bindungsstelle Nr. 1). Dennoch zeigen die beiden Röntgenstrukturen von der freien AdR und dem Adx-AdR Komplex, dass die freie AdR und die AdR im Komplex in zwei unterschiedlichen konformellen Zuständen vorliegt. Vor allem die Dockingergebnisse der Polyamine an die Bindungsstelle Nr. 3 nehmen deutlich ab, wenn die AdR als alleiniger Interaktionspartner agiert (Putrescin  $-5,71$  kcal/mol (freie AdR) zu  $-8,29$  kcal/mol (Komplex); Spermidin  $-7,52$  kcal/mol (freie AdR) zu  $-9,49$  kcal/mol (Komplex); Spermin  $-8,91$  kcal/mol (freie AdR) zu  $-11,10$  kcal/mol (Komplex)). Auch wenn nur das oxidierte Adx betrachtet wurde, konnte für diese Bindungsstelle kein adäquates Dockingergebnis erzielt werden.



**Abb. 3.17: Lage der identifizierten, bevorzugten Bindungsstellen (BS) am Adx – AdR Komplex.** Die beiden Proteine Adx (orange) und AdR (blau) werden als Band wiedergegeben. Ausgenommen sind die Aminosäuren, die die Bindestellen (AdR in blau, Adx in rot) charakterisieren. Die Co-Faktoren (FAD und der Eisen-Schwefel Cluster) werden als Kugel-Stab-Modell (nach den einzelnen Elementen gefärbt) gezeigt.

Da, wie im letzten Abschnitt beschrieben, die Region bestehend aus den Aminosäuren Asp-15, Asp-39 und Asp-41 als einzige bevorzugte Bindedomäne der Polyamine an das Adrenodoxin hervortrat (**Tabelle 3.8**), wurde diese Region im letzten Teil dieser Arbeit genauer untersucht.

### **3.3 Einfluss der Polyamine auf die sekundäre Interaktionsdomäne**

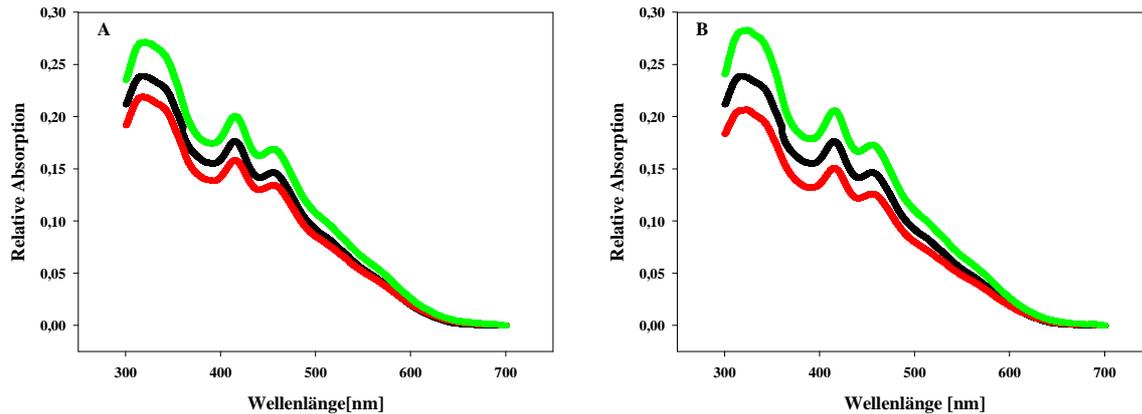
Um den Einfluss der Polyamine auf diese Region experimentell bestimmen und ihren Einfluss auf das CYP11A1 System genauer beschreiben zu können, wurden vier Mutanten AdxD15K, AdxD15N, AdxD39K und AdxD39N durch ortsgerichtete Mutagenese hergestellt, in *E. coli* exprimiert und gereinigt (**Materialien & Methoden**). Die Substitution der negativ geladenen Asp Reste durch Lys beziehungsweise durch Asn führt zu einer Neutralisierung (Asn) oder Umkehrung (Lys) der Ladung an diesen Stellen. Somit simulieren die Mutationen (AdxD15K, AdxD15N, AdxD39K und AdxD39N) die positiven Ladungen der Polyamine, wenn diese an dieser Region angreifen.

#### **3.3.1 Spektroskopische Eigenschaften der verschiedenen Adx Mutanten**

Im Allgemeinen können Ferredoxine mit einem [2Fe-2S] Cluster entweder durch Absorptionsspektroskopie, im oxidierten Zustand zeigen sie positive Maxima bei 320, 415 und 455 nm, oder durch Circular dichroismus (CD) eindeutig charakterisiert werden (Estabrook *et al.*, 1973; Uhlmann *et al.*, 1994).

##### **3.3.1.1 UV/ Spektroskopie**

Um mögliche strukturelle Unterschiede zwischen AdxWT und den Mutanten AdxD15K, AdxD15N, AdxD39K und AdxD39N aufzuweisen, wurden UV/Vis Spektren (**Abbildung 3.18**) aufgezeichnet.



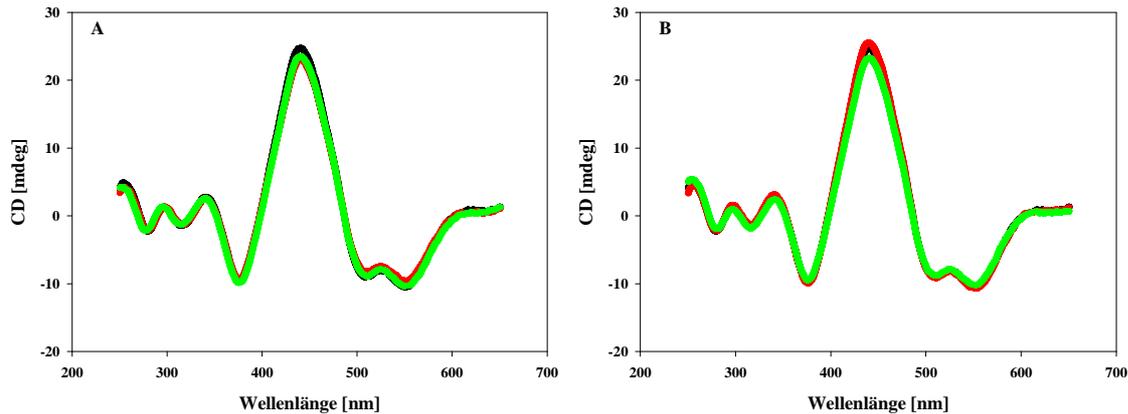
**Abb. 3.18: UV/Vis Spektren der oxidierten Adx Spezies.**

Die UV/Vis Spektren der vier oxidierten Adrenodoxinmutanten wurden in 1 cm Quarzküvetten im Bereich von 300 bis 700 nm aufgenommen. Jede Probe enthielt 20  $\mu\text{M}$  Adx in 5 mM HEPES Puffer, pH 7,4, mit 0,05% Tween20. Zum besseren Vergleich wurden die Kurven der K-Mutanten mit dem Faktor 0,8, die N-Mutanten mit dem Faktor 1,2 multipliziert. (A) AdxD15K rot, AdxD15N grün, AdxWT schwarz; (B) AdxD39K rot, AdxD39N grün, AdxWT schwarz.

Die UV/Vis Spektren sowohl der beiden AdxD15 (**Abbildung 3.18 A**) als auch der beiden AdxD39 (**Abbildung 3.18 B**) Mutanten zeigten in ihrer oxidierten Form keine Änderungen zu den korrespondierenden Spektren des Wildtyps. Die charakteristischen Absorptionsmaxima bei 320, 415 und 455 nm waren in allen Adx Spezies nachweisbar, was darauf hinweist, dass die durchgeführten Mutationen die Spektraleigenschaften des Clusters nicht beeinflussen.

### 3.3.1.2 CD-Spektroskopie

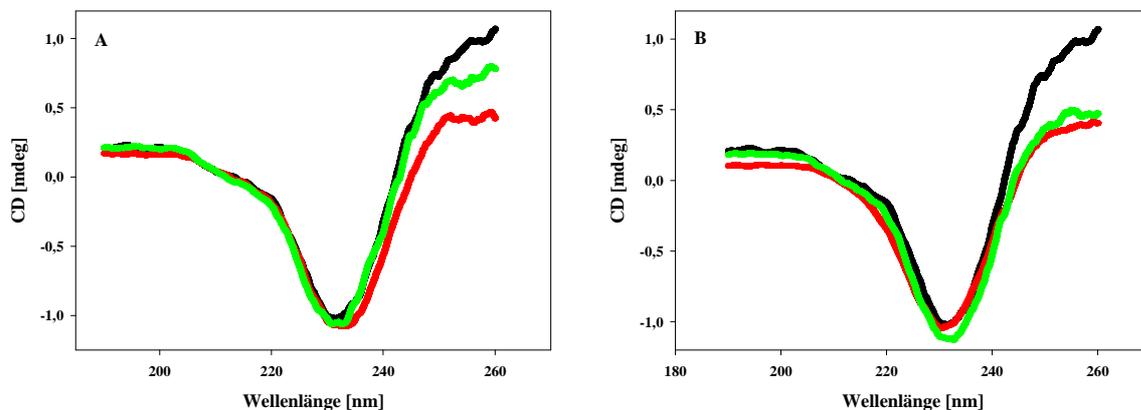
Für eine detailliertere Charakterisierung der Region um den Eisen-Schwefel Cluster jeder Adx Spezies wurden zusätzlich CD Messungen der oxidierten Formen im UV und sichtbaren Bereich durchgeführt. Wie in **Abbildung 3.19** gezeigt wird, gaben alle Spektren das charakteristische, maximale CD-Signal bei 439 nm wider, was daraufhin hindeutet, dass die unmittelbare Umgebung des Eisen-Schwefel Clusters weder durch die Mutationen an AdxD15 (**Abbildung 3.19 A**) noch an AdxD39 (**Abbildung 3.19 B**) beeinträchtigt wird. Ebenso konnte eine konformelle Änderung der aromatischen Chromophoren ausgeschlossen werden, da die Signale in der Region von 300 bis 350 nm nicht geändert waren.



**Abb. 3.19: CD Spektren der unterschiedlichen, oxidierten Adx Spezies im Bereich von 250 bis 650 nm.** Die CD-Messungen im Vis-Bereich wurden mit 20  $\mu$ M Adx in 5 mM HEPES Puffer, pH 7,4 mit 0,05% Tween20 und einer 1 cm Küvette durchgeführt. (A) AdxD15K rot, AdxD15N grün, AdxWT schwarz; (B) AdxD39K rot, AdxD39N grün, AdxWT schwarz.

Dennoch ergaben die bisherigen Messungen keine Informationen über mögliche Änderungen in der Sekundärstruktur.

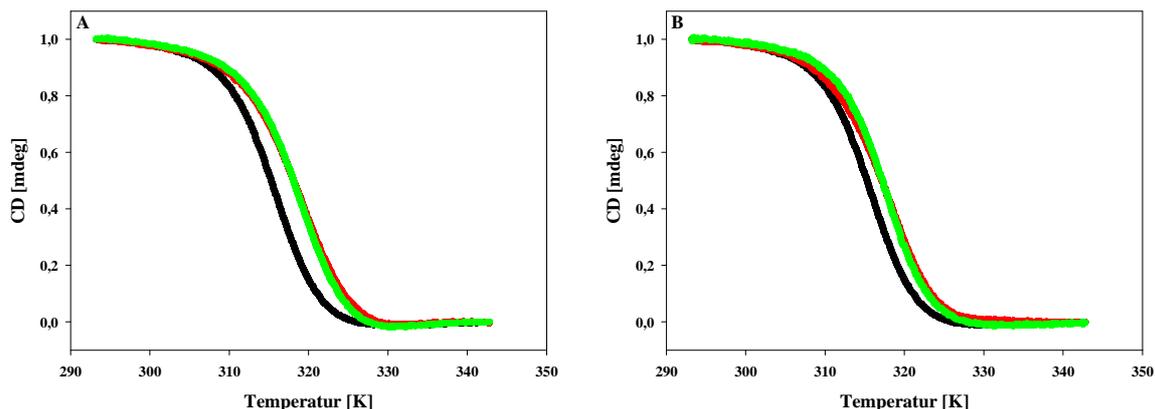
Um zu testen, ob die eingeführten Mutationen einen Einfluss auf das Faltungsverhalten der Proteine besitzen, wurden CD Messungen im Bereich von 195 bis 260 nm durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, dass sowohl die Mutationen an AdxD15 als auch an AdxD39 im Vergleich zum Wildtyp die Sekundärstruktur nicht bedeutend ändern (**Abbildung 3.20**). Die CD Spektren dieser Region zeigen das charakteristische Minimum um 225 nm.



**Abb. 3.20: CD Spektren des AdxWT und der verschiedenen Mutanten im Bereich von 195 bis 260 nm.** Alle Messungen wurden mit 20  $\mu$ M Adx in 5 mM HEPES Puffer, pH 7,4, mit 0,05% Tween20 und einer 0,1 cm Quarzküvette. (A) AdxD15K rot, AdxD15N grün, AdxWT schwarz; (B) AdxD39K rot, AdxD39N grün, AdxWT schwarz.

### 3.3.1.3 Thermische Denaturierung

Untersuchungen an unterschiedlichen Adx Mutanten zeigten, dass obwohl einige funktionell wichtige Aminosäuren, wie z.B. His-56, eine wichtige Rolle in der Stabilisierung des Adx spielen, es keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen konformeller Stabilität und funktionellen Eigenschaften gibt (Grinberg *et al.*, 2000). Um den Einfluss der Mutationen an AdxD15 bzw. AdxD39 auf die thermische Stabilität des Adx zu untersuchen, wurden Studien zur thermischen Denaturierung durchgeführt. Die Messungen wurden in einem Puffersystem (5 mM HEPES Puffer, pH 7,4 mit 0,05% Tween20) durchgeführt, das dem der übrigen Untersuchungen entspricht. Das CD-Signal der Schmelzkurven wurde bei der Wellenlänge aufgezeichnet, die dem Maximum bei 439 nm in den Spektren von 250 bis 650 nm entspricht. Alle aufgenommenen Kurven nahmen sigmoidal ab (**Abbildung 3.21**) und wurden mittels des „Zwei Zustände“ Modells von Privalov (Privalov, 1979) gefittet.



**Abb. 3.21: Thermische Denaturierung der verschiedenen oxidierten Adx Proteinen.**

Die thermischen Denaturierungen des oxidierten AdxWT und der ADXADXD15 Mutanten (**A**) bzw. ADXD39 Mutanten (**B**) wurden bei 439 nm verfolgt. Um die verschiedenen Kurven besser vergleichen zu können, wurde jeweils der Start- und der Endpunkt der Kurven auf 1 bzw. 0 gesetzt. Die Kurven wurden mit einem „Zwei Zustände“ Modell ausgewertet. Die Temperatur ist in Kelvin [K] angegeben. (**A**) AdxD15K rot, AdxD15N grün, AdxWT schwarz; (**B**) AdxD39K rot, AdxD39N grün, AdxWT schwarz.

Die erhaltenen Schmelztemperaturen ( $T_d$ ) Werte für die Mutanten (**Tabelle 3.9**) waren im Vergleich zum AdxWT um bis zu 4°C (AdxD15K und AdxD15N) erhöht. Unerwarteterweise zeigen diese Daten, dass durch die Substitutionen des AdxD15 bzw. AdxD39 durch Lys oder Asn, das Adx thermisch stabiler wird. Der Mittelwert für die Wärmekapazität der Entfaltung des  $Adx_{ox}$  ( $\Delta_d C_p = 6,4 \pm 2,2$  kJ/mol/K) wurde der Veröffentlichung von Burova (Burova *et al.*, 1995) entnommen. Er dient zur Berechnung der Gibbs Energie der Entfaltung. Die Unterschiede in der thermischen Stabilität zwischen

Mutanten und Wildtyp spiegelt sich auch in der Änderung der Gibbs Energie während der Entfaltung bei 37°C ( $\Delta\Delta_dG(37^\circ\text{C})$ ) wider (**Tabelle 3.9**). Alle Mutanten zeigten eine geringere Änderung im Vergleich zum Wildtyp.

**Tabelle 3.9: Thermodynamische Parameter der oxidierten Adrenodoxinmutanten.**

Die thermodynamischen Daten des oxidierten AdxWT und der oxidierten Adx Mutanten wurden aus den Kurven der CD Signaländerung bei 440 nm während der Hitzedenaturierung ermittelt. Die Adx Konzentration war jeweils 20  $\mu\text{M}$  in 5 mM HEPES Puffer, pH 7,4, mit 0,05% Tween20. Die Denaturierungen ( $n=3$ ) wurden bei einer Heizrate von 60°C/h zwischen 20°C und 65°C durchgeführt. zwischen AdxWT und den Adx Mutanten.

	AdxWT	AdxD15K	AdxD15N	AdxD39K	AdxD39N
$\Delta H_d$ (kJ/mol)	311,09 $\pm$ 0,65	277,63 $\pm$ 1,86	300,38 $\pm$ 3,57	284,79 $\pm$ 0,56	306,54 $\pm$ 3,88
$T_d$ (°C)	41,61 $\pm$ 1,07	45,78 $\pm$ 0,12	45,80 $\pm$ 0,19	45,03 $\pm$ 0,28	42,97 $\pm$ 1,60
$\Delta_dG$ (kJ/mol)	4,33	6,84	7,47	6,50	5,41
$\Delta\Delta_dG$ (kJ/mol)	0	-2,51	-3,14	-2,17	-1,08

### 3.3.2 Redoxpotentiale der verschiedenen Adx Mutanten

Die Fähigkeit der Elektronentransferproteine, Elektronen auf- und abzugeben, spiegelt sich in ihrem Redoxpotential wieder. Änderungen im Redoxpotential des Adx, bedingt durch die Substitution der AdxD15 zur AdxD15K und AdxD15N oder AdxD39 zur AdxD39K und AdxD39N könnte zu einer veränderten Funktionalität des Adrenodoxins führen. Daher wurde spektroskopisch mit der Photoreduzierung des Farbstoffs Safranin T das Redoxpotential des Wildtyps und der Mutanten bestimmt (-269  $\pm$  4 mV für AdxWT, -272  $\pm$  3 mV für AdxD15K, -266  $\pm$  5 mV für AdxD15N, -260  $\pm$  12 mV für AdxD39K, beziehungsweise -271  $\pm$  5 mV für AdxD39N). Somit zeigen alle vier Mutanten im Rahmen der Fehler keine veränderten Redoxpotentiale im Vergleich zum AdxWT. Das lässt darauf schließen, dass sowohl AdxD15 als auch AdxD39 keine bedeutende Rolle zur Regulierung des Redoxpotentials des Adx spielen.

### 3.3.3 Optische Biosensormessungen

Spezifische Komplexbildungen zwischen den oxidierten Formen der Adx-Mutanten AdxD15K, AdxD15N, AdxD39K und AdxD39N und der Adrenodoxin Reduktase wurden mit Hilfe eines Biacore3000 System, wie ausführlich in **Kapitel 2.2.9** und **3.1.3** dargestellt, untersucht.

Dabei stellte sich heraus, dass die Einführung einer neutralen oder positiven Ladung in die sekundäre Interaktionsdomäne zu einer Stärkung (sinkender  $K_D$ ; AdxWT  $7,50 \cdot 10^{-7}$  M, AdxD15N  $3,15 \cdot 10^{-7}$  M, AdxD39K  $1,50 \cdot 10^{-7}$  M, AdxD15K  $9,29 \cdot 10^{-8}$  M, AdxD39N  $4,11 \cdot 10^{-8}$  M) des Adx-AdR Komplexes führt (**Tabelle 3.10**). Damit imitieren die Mutationen das Verhalten der Salze und Polyamine, das am System AdxWT-AdR gemessen wurde (**Tabelle 3.3**).

Auf gleiche Weise wurde in einem nächsten Schritt untersucht, auf welche Weise die Polyamine die Interaktion zwischen den Adx-Mutanten und der AdR beeinflussen. Analog zu den Biacore Experimenten mit AdxWT (**Kapitel 3.1.3**) wurden sie in Anwesenheit der Polyamine und im Vergleich dazu mit einem monovalenten (KCl) und einem divalenten ( $MgCl_2$ ) Salz durchgeführt. Hierzu wurden die gleichen Ionenstärken ( $I = 0,4$  mM und  $1,0$  mM) wie bei den Untersuchungen mit AdxWT eingesetzt, um Ionenstärkeeffekte zu vermeiden. Die zusätzlichen Polyamin- und Salzkonzentrationen waren im Vergleich zur Gesamtionenstärke des Puffers vernachlässigbar gering und führten des weiteren zu keiner Änderung des pH-Wertes. Wie bereits in **Kapitel 3.1.3** beschrieben, korreliert auch mit den Mutanten in allen Fällen die Stärke des Signals direkt mit der injizierten Konzentration an AdR. Die aufgenommenen Interaktionskurven wurden daher mit dem Biacore Programm 4.1 mittels eines 1:1 Bindemechanismus ausgewertet.

Die Untersuchungen zur Interaktion zwischen AdR und dem AdxWT zeigten zum Teil ein auffällig anderes Bindungsverhalten als die Interaktion der Mutanten zur AdR (**Tabelle 3.10** und **Abbildung 3.23**).

**Tabelle 3.10: SPR-Analyse der Interaktion zwischen Adx<sub>ox</sub> (WT und Mutanten) mit AdR<sub>ox</sub> in Anwesenheit von Polyaminen und Salzen**

Das Bindungsverhalten von AdR (Konzentration zwischen 100 - 500 nM) an Adx WT oder den Mutanten AdxD15K, AdxD15N, AdxD39K oder AdxD39N, die zuvor auf einen CM5 Chip (~300 RU) immobilisiert wurden, wurde in Biacore HBS-EP Puffer (0,01 M HEPES Puffer, pH 7,4, 0,15 M NaCl mit 0,005% Surfactant P20) bei 25°C untersucht. Die Bindungskurven (Sensorgramme) der Interaktionspartner ohne (Puffer) und in Anwesenheit von Salzen (KCl, MgCl<sub>2</sub>) oder der Polyamine (alle bei einer Ionenstärke von I = 0,4 mM) wurden mit dem Biacore Evaluierungsprogramm 4.1 als ein 1:1 Bindungsmodell analysiert. Standardabweichungen (n ≥ 4) zu den gezeigten Werten waren innerhalb ± 10 %.

Adx	Puffer			+ I = 0,4 mM KCl		
	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$ ( $k_{off}/k_{on}$ )	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$ ( $k_{off}/k_{on}$ )
	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]
AdxWT	3,81 10 <sup>3</sup>	2,86 10 <sup>-3</sup>	7,50 10 <sup>-7</sup>	5,78 10 <sup>4</sup>	3,84 10 <sup>-3</sup>	6,64 10 <sup>-8</sup>
AdxD15K	1,97 10 <sup>4</sup>	1,83 10 <sup>-3</sup>	9,29 10 <sup>-8</sup>	3,23 10 <sup>3</sup>	8,69 10 <sup>-4</sup>	2,69 10 <sup>-7</sup>
AdxD15N	1,10 10 <sup>4</sup>	3,46 10 <sup>-3</sup>	3,15 10 <sup>-7</sup>	7,65 10 <sup>3</sup>	1,50 10 <sup>-3</sup>	1,96 10 <sup>-7</sup>
AdxD39K	2,64 10 <sup>4</sup>	3,95 10 <sup>-3</sup>	1,50 10 <sup>-7</sup>	2,22 10 <sup>4</sup>	1,20 10 <sup>-3</sup>	3,75 10 <sup>-8</sup>
AdxD39N	2,07 10 <sup>4</sup>	8,50 10 <sup>-4</sup>	4,11 10 <sup>-8</sup>	2,89 10 <sup>4</sup>	1,07 10 <sup>-3</sup>	3,70 10 <sup>-8</sup>

Adx	+ I = 0,4 mM MgCl <sub>2</sub>			+ I = 0,4 mM Putrescin		
	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$ ( $k_{off}/k_{on}$ )	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$ ( $k_{off}/k_{on}$ )
	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]
AdxWT	2,77 10 <sup>3</sup>	2,54 10 <sup>-3</sup>	9,17 10 <sup>-7</sup>	6,43 10 <sup>4</sup>	2,14 10 <sup>-3</sup>	3,33 10 <sup>-8</sup>
AdxD15K	2,38 10 <sup>4</sup>	2,43 10 <sup>-3</sup>	1,02 10 <sup>-7</sup>	1,78 10 <sup>4</sup>	2,63 10 <sup>-3</sup>	1,48 10 <sup>-7</sup>
AdxD15N	1,22 10 <sup>4</sup>	2,47 10 <sup>-3</sup>	2,03 10 <sup>-7</sup>	1,70 10 <sup>4</sup>	6,11 10 <sup>-4</sup>	3,59 10 <sup>-7</sup>
AdxD39K	5,23 10 <sup>4</sup>	2,28 10 <sup>-3</sup>	4,36 10 <sup>-8</sup>	2,89 10 <sup>4</sup>	1,59 10 <sup>-3</sup>	5,50 10 <sup>-8</sup>
AdxD39N	1,21 10 <sup>4</sup>	2,00 10 <sup>-3</sup>	1,65 10 <sup>-7</sup>	1,42 10 <sup>4</sup>	1,90 10 <sup>-3</sup>	3,71 10 <sup>-8</sup>

Adx	+ I = 0,4 mM Spermidin			+ I = 0,4 mM Spermin		
	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$ ( $k_{off}/k_{on}$ )	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$ ( $k_{off}/k_{on}$ )
	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]
AdxWT	3,22 10 <sup>3</sup>	6,68 10 <sup>-3</sup>	2,07 10 <sup>-6</sup>	3,40 10 <sup>4</sup>	2,07 10 <sup>-3</sup>	6,09 10 <sup>-8</sup>
AdxD15K	3,37 10 <sup>3</sup>	1,13 10 <sup>-3</sup>	3,35 10 <sup>-7</sup>	3,58 10 <sup>3</sup>	8,71 10 <sup>-4</sup>	2,43 10 <sup>-7</sup>
AdxD15N	3,20 10 <sup>3</sup>	1,54 10 <sup>-3</sup>	4,81 10 <sup>-7</sup>	3,34 10 <sup>3</sup>	9,88 10 <sup>-4</sup>	2,96 10 <sup>-7</sup>
AdxD39K	1,32 10 <sup>4</sup>	7,82 10 <sup>-4</sup>	5,92 10 <sup>-8</sup>	6,71 10 <sup>3</sup>	1,18 10 <sup>-3</sup>	1,76 10 <sup>-7</sup>
AdxD39N	9,54 10 <sup>3</sup>	1,02 10 <sup>-3</sup>	1,07 10 <sup>-7</sup>	2,65 10 <sup>3</sup>	1,10 10 <sup>-3</sup>	4,15 10 <sup>-7</sup>

In Puffer (**Tabelle 3.10** und **Abbildung 3.22**) waren die Assoziationsraten ( $k_{on}$ ) des AdR-Adx Komplexes bei allen Mutanten bis um das siebenfache (AdxD39K) erhöht (AdxWT  $3,81 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; AdxD15K  $1,97 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; AdxD15N  $1,10 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; AdxD39K  $2,64 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , AdxD39N  $2,07 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), während die Dissoziation ( $k_{off}$ ) mit Ausnahme von AdxD39N ( $k_{off}$  AdxWT  $2,86 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ; AdxD39N  $8,50 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ) kaum beeinflusst wird. Dies führt bei allen Mutanten zu einer festeren Bindung (abnehmender  $K_D$ ) in der Reihenfolge AdxWT ( $7,50 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ) > AdxD15N ( $3,15 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ) > AdxD39K ( $1,50 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ) > AdxD15K ( $9,29 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ ) > AdxD39N ( $4,11 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ ).

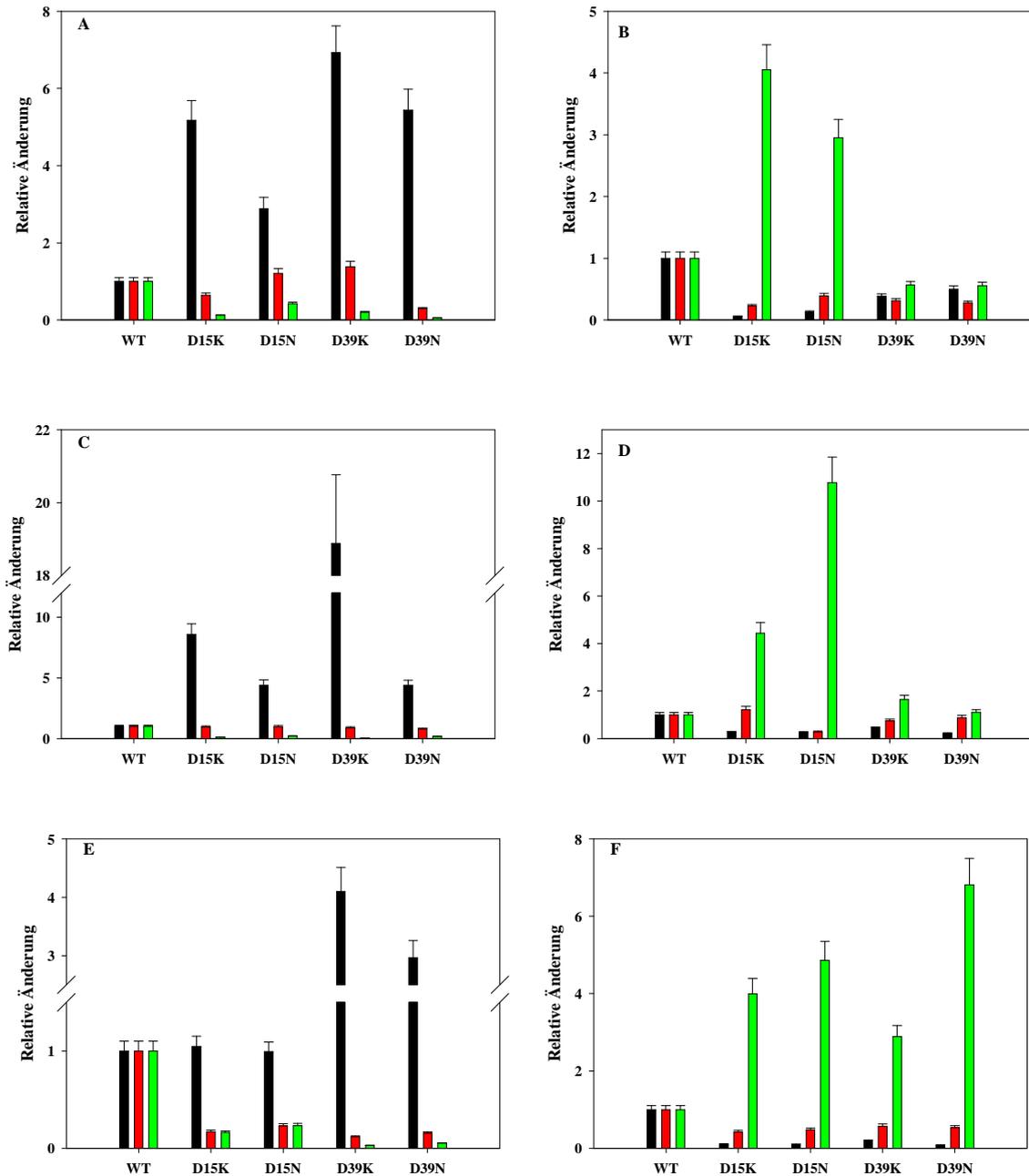
Bei einer Ionenstärke von  $I = 0,4 \text{ mM KCl}$  nehmen sowohl  $k_{on}$  als auch  $k_{off}$  aller Mutanten ab,  $k_{on}$  bei den AdxD15 Mutanten stärker als bei den AdxD39 Mutanten,  $k_{off}$  in der Reihenfolge AdxD15N ( $1,50 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) > AdxD39K > AdxD39N > AdxD15K ( $8,69 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ). Dies führt im Vergleich zu AdxWT bei den AdxD39 Mutanten zu einer festeren, bei den AdxD15 Mutanten zu einer schlechteren Bindung an die AdR.

In der Lösung mit  $I = 0,4 \text{ mM MgCl}_2$  stärken die Mutanten die Bindung über die Assoziationsrate und verändern die Dissoziationsrate kaum. Dies ist sowohl an AdxD15 als auch an AdxD39 durch eine Substitution mit Lysin stärker als mit Asparagin.

Mit Putrescin nimmt der  $k_{on}$  der Mutanten in der Reihenfolge (AdxD39K ( $2,89 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) < AdxD15K~AdxD15N < AdxD39N ( $1,42 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )) zum Wildtyp ( $6,43 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) deutlich ab, während der  $k_{off}$  mit Ausnahme von AdxD15N kaum beeinflusst wird. Die AdxD15 Mutanten verschlechtern die Bindung an die Reduktase um eine Größenordnung, AdxD39K verschlechtert sie etwas, AdxD39N ändert sie nicht.

In Anwesenheit von Spermidin stärkt eine stark geschwächte Dissoziationsrate die Bindung der Mutanten an die AdR. Die AdxD15 Mutanten verändern die Assoziation nicht, die AdxD39 Mutanten verdreifachen sie. In allen Fällen bilden die Mutanten stabilere Komplexe mit der AdR als der Wildtyp.

In Spermin enthaltender Lösung nehmen sowohl die Assoziations- ( $k_{on}$ ) als auch die Dissoziationsrate ( $k_{off}$ ) des AdR-Adx Verbandes bei allen Mutanten ab. Dies führte in einer Reihenfolge von AdxD39K ( $K_D$   $1,76 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ) < AdxD15K < AdxD15N < AdxD39N ( $K_D$   $4,15 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ) zu einer Schwächung der Bindung an die Reduktase.



**Abb. 3.22: Relative Änderung der mittels Biacore erhaltenen kinetischen Parameter  $k_{on}$  (schwarz),  $k_{off}$  (rot),  $K_D$  (grün)** Die Änderungen durch die Mutanten wurden in Relation zu den auf 1 gesetzten Werten, die mit dem Wildtypen gemessen wurden, dargestellt. (A) Puffer, (B) + I = 1,0 mM KCl, (C) + I = 1,0 mM MgCl<sub>2</sub>, (D) + I = 1,0 mM Putrescin, (E) + I = 1,0 mM Spermidin (F) + I = 1,0 mM Spermin

Insgesamt zeigen die Mutanten in Anwesenheit von zusätzlicher positiver Ladung ein eher uneinheitliches Verhaltensmuster (**Tabelle 3.10** und **Abbildung 3.22**).

In einem zweiten Schritt wurde nun der Einfluss der Salze und Polyamine bei einer Ionenstärke von 0,4 mM (um Ionenstärkeeffekte der Salze und Polyamine durch die

unterschiedliche Ladungszahl zu vermeiden) auf die Adx-AdR Bindung betrachtet (**Tabelle 3.11** und **Abbildung 3.23**).

Bei einer Ionenstärke von  $I = 0,4 \text{ mM}$  (**Tabelle 3.11** und **Abbildung 3.23**) steigern alle Polyamine mit Ausnahme von Spermidin die Assoziationsrate ( $k_{on}$ ) des AdxWT an die AdR bis um das neunfache (Puffer  $3,81 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; Putrescin  $6,43 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; Spermin  $3,40 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), während die Dissoziation ( $k_{off}$ ) mit Ausnahme von Spermidin ( $k_{off}$ ; Puffer  $2,86 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ; Spermidin  $6,68 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) kaum beeinflusst wird. Dies führt mit einer abnehmender Ladung der Polyamine zu einer festeren Bindung, die sich in einem abnehmenden  $K_D$  zeigt (Puffer  $7,50 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ; Putrescin  $3,33 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ ; Spermin  $6,09 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ ). Das zweiwertige Salz  $\text{MgCl}_2$  verändert die Werte im Vergleich zu den Werten aus der Kontrolle (Puffer) nicht. Spermidin steigert als einziges die Dissoziationsrate und damit den  $K_D$ .

KCl, Spermidin und Spermin reduzieren den  $k_{on}$  der AdxD15K um das sechsfache (Puffer  $1,97 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , KCl  $3,23 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), verringern aber auch den  $k_{off}$ , was insgesamt zu einer Verdreifachung des  $K_D$  und somit zu einem instabiler AdR-Adx Komplex führt. Im Gegensatz dazu beeinflussen  $\text{MgCl}_2$  und Putrescin die Bindung kaum.

Sowohl die Salze als auch die Polyamine verringern die Dissoziation, KCl, Spermidin und Spermin auch die Assoziation des AdxD15N-AdR Komplexes. In Anwesenheit der Salze wird der Komplex etwas stärker, Putrescin und Spermidin schwächen ihn etwas, Spermin verändert ihn nicht.

Bei der Bildung des AdR-AdxD39K Komplexes verbessern die Salze und die Polyamine die Bindung hauptsächlich über die Dissoziationskonstante. Die Ausnahme ist Spermin, die sowohl die Assoziation- als auch die Dissoziation so stark verlangsamt, das der  $K_D$  leicht ansteigt.

Dagegen erfolgt die Schwächung des AdxD39N-AdR Komplexes durch die Polyamine hauptsächlich über die Assoziationsrate. Die relative Änderung in den  $k_{on}$ -Werten bei der Komplexbildungen (Putrescin ( $1,42 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) > Spermidin > Spermin ( $2,65 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )) korrespondiert mit einer abnehmenden molekularen Konzentration der Polyamine (zweiwertig > dreiwertig > vierwertig), die jeweils bei der gleichen Ionenstärke betrachtet wird. KCl verhält sich wie der Puffer,  $\text{MgCl}_2$  wie Putrescin.

**Tabelle 3.11: SPR-Analyse der Interaktion zwischen Adx<sub>ox</sub> mit AdR<sub>ox</sub> in Anwesenheit von Polyaminen und Salzen.**

Das Bindungsverhalten von AdR (Konzentration zwischen 100 - 500 nM) an Adx WT oder die Mutanten AdxD15K, AdxD15N, AdxD39K und AdxD39N, die zuvor auf einen CM5 Chip (~300 RU) immobilisiert wurden, wurde in Biacore HBS-EP Puffer (0,01 M HEPES Puffer, pH 7,4, 0,15 M NaCl mit 0,005% Surfactant P20) bei 25°C untersucht. Die Bindungskurven (Sensorgramme) der Interaktionspartner ohne (Puffer) und in Anwesenheit von Salzen (KCl, MgCl<sub>2</sub>) oder Polyaminen (alle bei einer Ionenstärke von I = 0,4 mM) wurden mit dem Biacore Evaluierungsprogramm 4.1 als ein 1:1 Bindungsmodell analysiert. Standardabweichungen (n ≥ 4) zu den gezeigten Werten waren innerhalb ± 10 %.

	AdxWT			AdxD15K		
	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$ ( $k_{off}/k_{on}$ )	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$ ( $k_{off}/k_{on}$ )
	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]
<b>Puffer</b>	3,81 10 <sup>3</sup>	2,86 10 <sup>-3</sup>	7,50 10 <sup>-7</sup>	1,97 10 <sup>4</sup>	1,83 10 <sup>-3</sup>	9,29 10 <sup>-8</sup>
<b>+ I = 0,4 mM KCl</b>	5,78 10 <sup>4</sup>	3,84 10 <sup>-3</sup>	6,64 10 <sup>-8</sup>	3,23 10 <sup>3</sup>	8,69 10 <sup>-4</sup>	2,69 10 <sup>-7</sup>
<b>+ I = 0,4 mM MgCl<sub>2</sub></b>	2,77 10 <sup>3</sup>	2,54 10 <sup>-3</sup>	9,17 10 <sup>-7</sup>	2,38 10 <sup>4</sup>	2,43 10 <sup>-3</sup>	1,02 10 <sup>-7</sup>
<b>+ I = 0,4 mM Putrescin</b>	6,43 10 <sup>4</sup>	2,14 10 <sup>-3</sup>	3,33 10 <sup>-8</sup>	1,78 10 <sup>4</sup>	2,63 10 <sup>-3</sup>	1,48 10 <sup>-7</sup>
<b>+ I = 0,4 mM Spermidin</b>	3,22 10 <sup>3</sup>	6,68 10 <sup>-3</sup>	2,07 10 <sup>-6</sup>	3,37 10 <sup>3</sup>	1,13 10 <sup>-3</sup>	3,35 10 <sup>-7</sup>
<b>+ I = 0,4 mM Spermin</b>	3,40 10 <sup>4</sup>	2,07 10 <sup>-3</sup>	6,09 10 <sup>-8</sup>	3,58 10 <sup>3</sup>	8,71 10 <sup>-4</sup>	2,43 10 <sup>-7</sup>

	AdxD15N			AdxD39K		
	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$ ( $k_{off}/k_{on}$ )	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$ ( $k_{off}/k_{on}$ )
	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]
<b>Puffer</b>	1,10 10 <sup>4</sup>	3,46 10 <sup>-3</sup>	3,15 10 <sup>-7</sup>	2,64 10 <sup>4</sup>	3,95 10 <sup>-3</sup>	1,50 10 <sup>-7</sup>
<b>+ I = 0,4 mM KCl</b>	7,65 10 <sup>3</sup>	1,50 10 <sup>-3</sup>	1,96 10 <sup>-7</sup>	2,22 10 <sup>4</sup>	1,20 10 <sup>-3</sup>	3,75 10 <sup>-8</sup>
<b>+ I = 0,4 mM MgCl<sub>2</sub></b>	1,22 10 <sup>4</sup>	2,47 10 <sup>-3</sup>	2,03 10 <sup>-7</sup>	5,23 10 <sup>4</sup>	2,28 10 <sup>-3</sup>	4,36 10 <sup>-8</sup>
<b>+ I = 0,4 mM Putrescin</b>	1,70 10 <sup>4</sup>	6,11 10 <sup>-4</sup>	3,59 10 <sup>-7</sup>	2,89 10 <sup>4</sup>	1,59 10 <sup>-3</sup>	5,50 10 <sup>-8</sup>
<b>+ I = 0,4 mM Spermidin</b>	3,20 10 <sup>3</sup>	1,54 10 <sup>-3</sup>	4,81 10 <sup>-7</sup>	1,32 10 <sup>4</sup>	7,82 10 <sup>-4</sup>	5,92 10 <sup>-8</sup>
<b>+ I = 0,4 mM Spermin</b>	3,34 10 <sup>3</sup>	9,88 10 <sup>-4</sup>	2,96 10 <sup>-7</sup>	6,71 10 <sup>3</sup>	1,18 10 <sup>-3</sup>	1,76 10 <sup>-7</sup>

	AdxD39N		
	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$ ( $k_{off}/k_{on}$ )
	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]
<b>Puffer</b>	2,07 10 <sup>4</sup>	8,50 10 <sup>-4</sup>	4,11 10 <sup>-8</sup>
<b>+ I = 0,4 mM KCl</b>	2,89 10 <sup>4</sup>	1,07 10 <sup>-3</sup>	3,70 10 <sup>-8</sup>
<b>+ I = 0,4 mM MgCl<sub>2</sub></b>	1,21 10 <sup>4</sup>	2,00 10 <sup>-3</sup>	1,65 10 <sup>-7</sup>
<b>+ I = 0,4 mM Putrescin</b>	1,42 10 <sup>4</sup>	1,90 10 <sup>-3</sup>	1,34 10 <sup>-7</sup>
<b>+ I = 0,4 mM Spermidin</b>	9,54 10 <sup>3</sup>	1,02 10 <sup>-3</sup>	1,07 10 <sup>-7</sup>
<b>+ I = 0,4 mM Spermin</b>	2,65 10 <sup>3</sup>	1,10 10 <sup>-3</sup>	4,15 10 <sup>-7</sup>

Auch wenn die Salze und die Polyamine bei einer Ionenstärke von 0,4 mM die Interaktion zwischen den Mutanten und der AdR sowohl über die Assoziations- als auch über die Dissoziationsrate beeinflussen, so ist ihr Einfluss bei den Mutanten geringer als beim Wildtyp (Tabelle 3.11 und Abbildung 3.23).

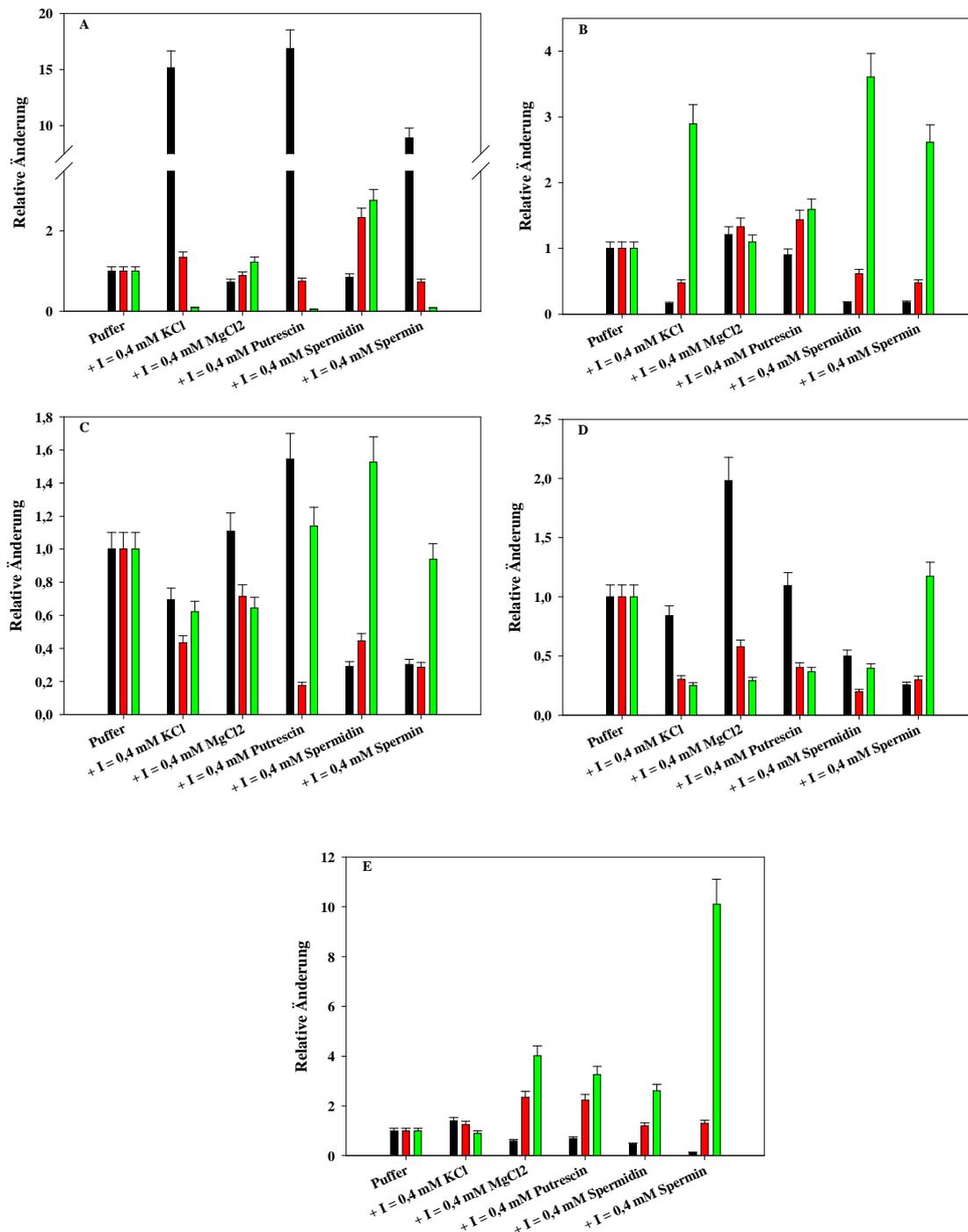


Abb. 3.23: Relative Änderung der aus den Biacore Experimenten erhaltenen kinetischen Parameter  $k_{on}$  (schwarz),  $k_{off}$  (rot),  $K_D$  (grün) Die Änderungen durch die Salze und Polyamine ( $I = 0,4$  mM) wurden in Relation zu den auf 1 gesetzten Werten, die im Puffer gemessen wurden, dargestellt. (A) AdxWT, (B) AdxD15K, (C) AdxD15N, (D) AdxD39K, (E) AdxD39N

Die gleichen Untersuchungen wurden auch bei einer höheren Ionenstärke ( $I = 1,0 \text{ mM}$ ) der Salze und Polyamine durchgeführt, und ebenso die Änderung durch die Mutanten (**Tabelle 3.12** und **Abbildung 3.24**) und durch die Salze/ Polyamine (**Tabelle 3.13** und **Abbildung 3.25**) betrachtet.

In Puffer (**Tabelle 3.12** und **Abbildung 3.24**) steigen die Assoziationsraten ( $k_{on}$ ) des AdR-Adx Komplexes bei allen Mutanten bis um das siebenfache (AdxD39K) ( $\text{AdxWT } 3,81 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; AdxD15K  $1,97 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; AdxD15N  $1,10 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; AdxD39K  $2,64 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , AdxD39N  $2,07 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), während die Dissoziation ( $k_{off}$ ) mit Ausnahme von AdxD39K ( $k_{off}$  AdxWT  $2,86 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ; AdxD39K  $8,50 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ) kaum beeinflusst wird. Dies führt bei allen Mutanten zu einer festeren Bindung (abnehmender  $K_D$ ) in der Reihenfolge AdxWT ( $7,50 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ) > AdxD15N ( $3,15 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ) > AdxD39K ( $1,50 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ) > AdxD15K ( $9,29 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ ) > AdxD39K ( $4,11 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ ).

Bei einer Ionenstärke von  $I = 1,0 \text{ mM KCl}$  nehmen sowohl  $k_{on}$  als auch  $k_{off}$  aller Mutanten ab,  $k_{on}$  stärker bei den AdxD15 Mutanten,  $k_{off}$  stärker als bei den AdxD39 Mutanten. Dies führt bei den AdxD39 Mutanten zu einer festeren, bei den AdxD15 Mutanten zu einer im Vergleich zum Wildtyp kaum veränderten Bindung an die AdR.

In der Lösung mit  $I = 1,0 \text{ mM MgCl}_2$  stärken die Mutanten die Bindung hauptsächlich über die Assoziationsrate (AdxD15 > AdxD39). Die AdxD15 Mutanten bilden somit auch stabilere Komplexe als die AdxD39 Mutanten mit der AdR.

Mit Putrescin nimmt sowohl der  $k_{on}$  als auch der  $k_{off}$  aller Mutanten ab. Die AdxD39 Mutanten verbessern deutlich die Bindung an die Reduktase, die AdxD15 ändern die Bindung im Vergleich zum AdxWT kaum.

In Anwesenheit von Spermidin verringern alle Mutanten sowohl die Assoziation als auch die Dissoziation deutlich. Dies führt bei AdxD39K zu einem stabileren, bei AdxD15N zu einem instabileren und bei den beiden anderen Mutanten zu einem kaum veränderten Komplex.

In Spermin enthaltender Lösung nehmen sowohl die Assoziationsrate ( $k_{on}$ ) (AdxD39N = AdxD39K > AdxD15K > AdxD15N) als auch die Dissoziationsrate ( $k_{off}$ ) (AdxD15K = AdxD15N = AdxD39N > AdxD39K) des AdR-Adx Verbandes bei allen Mutanten im Vergleich zum Wildtypen ab. Dies führt bei den AdxD15 Mutanten zu einer leicht geschwächten, bei den AdxD39 Mutanten zu einer stärkeren Bindung an die Reduktase.

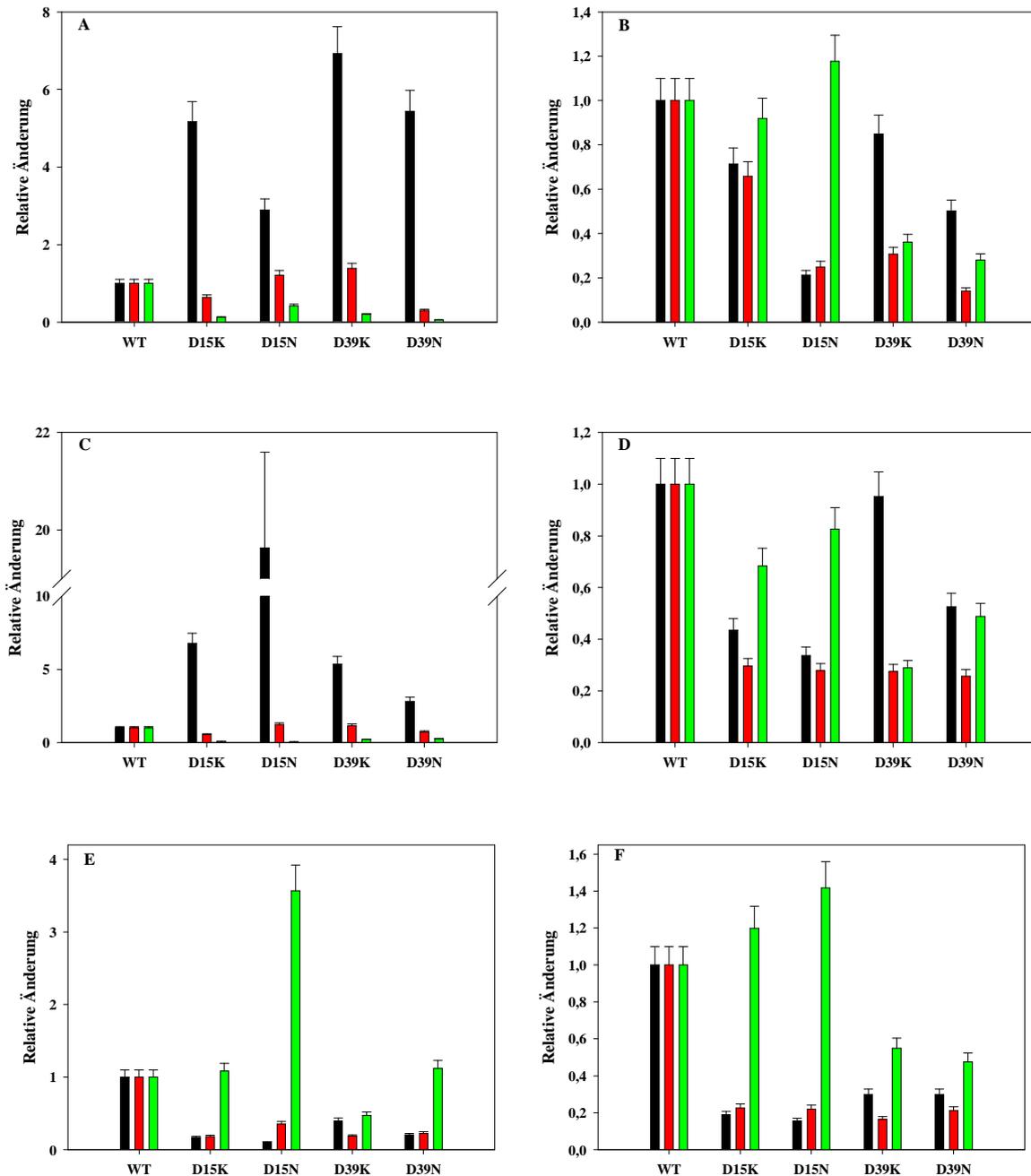
**Tabelle 3.12: SPR-Analyse der Interaktion zwischen Adx<sub>ox</sub> mit AdR<sub>ox</sub> in Anwesenheit von Polyaminen und Salzen.**

Das Bindungsverhalten von AdR (Konzentration zwischen 100 - 500 nM) an Adx WT oder den Mutanten AdxD15K, AdxD15N, AdxD39K oder AdxD39N, die zuvor auf einen CM5 Chip (~300 RU) immobilisiert wurden, wurde in Biacore HBS-EP Puffer (0,01 M HEPES Puffer, pH 7,4, 0,15 M NaCl mit 0,005% Surfactant P20) bei 25°C untersucht. Die Bindungskurven (Sensorgramme) der Interaktionspartner ohne (Puffer) und in Anwesenheit von Salzen (KCl, MgCl<sub>2</sub>) oder der Polyamine (alle bei einer Ionenstärke von I = 1,0 mM) wurden mit dem Biacore Evaluierungsprogramm 4.1 als ein 1:1 Bindungsmodell analysiert. Standardabweichungen (n ≥ 4) zu den gezeigten Werten waren innerhalb ± 10 %.

	Puffer			+ I = 1,0 mM KCl		
	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$ ( $k_{off}/k_{on}$ )	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$ ( $k_{off}/k_{on}$ )
	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]
<b>AdxWT</b>	3,81 10 <sup>3</sup>	2,86 10 <sup>-3</sup>	7,50 10 <sup>-7</sup>	4,13 10 <sup>4</sup>	6,06 10 <sup>-3</sup>	1,47 10 <sup>-7</sup>
<b>AdxD15K</b>	1,97 10 <sup>4</sup>	1,83 10 <sup>-3</sup>	9,29 10 <sup>-8</sup>	2,95 10 <sup>4</sup>	3,99 10 <sup>-3</sup>	1,35 10 <sup>-7</sup>
<b>AdxD15N</b>	1,10 10 <sup>4</sup>	3,46 10 <sup>-3</sup>	3,15 10 <sup>-7</sup>	8,76 10 <sup>3</sup>	1,51 10 <sup>-3</sup>	1,73 10 <sup>-7</sup>
<b>AdxD39K</b>	2,64 10 <sup>4</sup>	3,95 10 <sup>-3</sup>	1,50 10 <sup>-7</sup>	3,51 10 <sup>4</sup>	1,86 10 <sup>-3</sup>	5,30 10 <sup>-8</sup>
<b>AdxD39N</b>	2,07 10 <sup>4</sup>	8,50 10 <sup>-4</sup>	4,11 10 <sup>-8</sup>	3,53 10 <sup>4</sup>	1,34 10 <sup>-3</sup>	3,80 10 <sup>-8</sup>

	+ I = 1,0 mM MgCl <sub>2</sub>			+ I = 1,0 mM Putrescin		
	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$ ( $k_{off}/k_{on}$ )	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$ ( $k_{off}/k_{on}$ )
	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]
<b>AdxWT</b>	2,99 10 <sup>3</sup>	2,50 10 <sup>-3</sup>	8,36 10 <sup>-7</sup>	3,12 10 <sup>4</sup>	5,03 10 <sup>-3</sup>	1,61 10 <sup>-7</sup>
<b>AdxD15K</b>	2,03 10 <sup>4</sup>	1,37 10 <sup>-3</sup>	6,75 10 <sup>-8</sup>	1,36 10 <sup>4</sup>	1,49 10 <sup>-3</sup>	1,10 10 <sup>-7</sup>
<b>AdxD15N</b>	5,87 10 <sup>4</sup>	3,10 10 <sup>-3</sup>	5,28 10 <sup>-8</sup>	1,05 10 <sup>4</sup>	1,40 10 <sup>-3</sup>	1,33 10 <sup>-7</sup>
<b>AdxD39K</b>	1,60 10 <sup>4</sup>	2,90 10 <sup>-3</sup>	1,81 10 <sup>-7</sup>	2,97 10 <sup>4</sup>	1,38 10 <sup>-3</sup>	4,65 10 <sup>-8</sup>
<b>AdxD39N</b>	8,45 10 <sup>3</sup>	1,81 10 <sup>-3</sup>	2,14 10 <sup>-7</sup>	1,64 10 <sup>4</sup>	1,29 10 <sup>-3</sup>	7,87 10 <sup>-8</sup>

	+ I = 1,0 mM Spermidin			+ I = 1,0 mM Spermin		
	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$ ( $k_{off}/k_{on}$ )	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$ ( $k_{off}/k_{on}$ )
	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]
<b>AdxWT</b>	2,74 10 <sup>4</sup>	4,71 10 <sup>-3</sup>	1,71 10 <sup>-7</sup>	1,76 10 <sup>4</sup>	5,77 10 <sup>-3</sup>	3,28 10 <sup>-7</sup>
<b>AdxD15K</b>	4,60 10 <sup>3</sup>	8,53 10 <sup>-4</sup>	1,85 10 <sup>-7</sup>	3,31 10 <sup>3</sup>	1,30 10 <sup>-3</sup>	3,93 10 <sup>-7</sup>
<b>AdxD15N</b>	2,72 10 <sup>3</sup>	1,66 10 <sup>-3</sup>	6,10 10 <sup>-7</sup>	2,73 10 <sup>3</sup>	1,27 10 <sup>-3</sup>	4,65 10 <sup>-7</sup>
<b>AdxD39K</b>	1,09 10 <sup>4</sup>	8,77 10 <sup>-4</sup>	8,05 10 <sup>-8</sup>	5,24 10 <sup>3</sup>	9,43 10 <sup>-4</sup>	1,80 10 <sup>-7</sup>
<b>AdxD39N</b>	5,55 10 <sup>3</sup>	1,06 10 <sup>-3</sup>	1,91 10 <sup>-7</sup>	5,26 10 <sup>3</sup>	1,22 10 <sup>-3</sup>	1,56 10 <sup>-7</sup>



**Abb. 3.24: Relative Änderung der aus den Biacore Experimenten erhaltenen kinetischen Parameter  $k_{on}$  (schwarz),  $k_{off}$  (rot),  $K_D$  (grün)** Die Änderungen durch die Mutanten wurden in Relation zu den auf 1 gesetzten Werten, die mit dem Wildtypen gemessen wurden, dargestellt. (A) Puffer, (B) + I = 1,0 mM KCl, (C) + I = 1,0 mM MgCl<sub>2</sub>, (D) + I = 1,0 mM Putrescin, (E) + I = 1,0 mM Spermidin (F) + I = 1,0 mM Spermin

In Puffer und in Anwesenheit von I = 1,0 mM MgCl<sub>2</sub> steigern alle Mutanten die Assoziationsrate, verändern kaum die Dissoziationsrate und festigen so im Vergleich zum Wildtyp die Bindung zur AdR (abnehmender  $K_D$ ). In Spermidin erniedrigen alle Mutanten

sowohl die Assoziations- als auch die Dissoziationsrate. Der  $K_D$  bleibt bei AdxD15K und AdxD39N unverändert, er nimmt bei AdxD39K ab und verdreifacht sich bei AdxD15N. Im Gegensatz dazu schwächen alle Mutanten in  $MgCl_2$ , Putrescin und Spermin gleichzeitig die Assoziations- als auch die Dissoziationsrate, was mit den AdxD39 Mutanten zu einem instabileren AdR-Adx Komplex führt. Bei den AdxD15 Mutanten führt dies im Vergleich zum Wildtyp zu einem unveränderten (KCl, **Abbildung 3.24 B**), leicht gefallenem (Putrescin, **Abbildung 3.24 D**), oder leicht gestiegenem (Spermin, **Abbildung 3.24 F**)  $K_D$ .

Abschließend wurde auch hier der Einfluss der Salze und Polyamine auf die Adx-AdR Bindung betrachtet (**Tabelle 3.13** und **Abbildung 3.25**).

Bei einer Ionenstärke von  $I = 1,0$  mM (**Tabelle 3.13** und **Abbildung 3.25**) steigern alle drei Polyamine die Assoziationsrate des AdR-Adx Verbandes bis um das achtfache (Kontrolle  $3,81 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; Putrescin  $3,12 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; Spermidin  $2,74 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; Spermin  $1,76 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), während die Dissoziation geringer beeinflusst wird. Dies führt mit einer abnehmender Ladung der Polyamine zu einer festeren Bindung, die sich in einem abnehmenden  $K_D$  zeigt (Kontrolle  $7,50 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ; Putrescin  $1,61 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ; Spermidin  $1,71 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ; Spermin  $3,28 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ). Die Effekte des einwertigen Salzes KCl auf die Adx-AdR Bindung stimmen sehr gut mit den Ergebnissen der Polyamine, vor allem von Putrescin und Spermidin, überein. Überraschenderweise verhält sich das zweiwertige Salz  $MgCl_2$  während der Adx-AdR Interaktion wie die Kontrolle (Puffer).

Die Polyamine reduzieren den  $k_{on}$  der AdxD15K um das sechsfache (Puffer  $1,97 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , Spermin  $3,31 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), erniedrigen aber auch den  $k_{off}$ , was zu einer Erhöhung des  $K_D$  und somit zu einem instabiler AdR-Adx Komplex (Putrescin < Spermidin < Spermin) führt. Im Gegensatz dazu beeinflusst  $MgCl_2$  die Bindung kaum. KCl erhöht  $k_{on}$  und  $k_{off}$ , was wie bei den Polyaminen zu einem instabileren Komplex führt.

Sowohl die Salze als auch die Polyamine verlangsamen die Dissoziation, KCl, Spermidin und Spermin erniedrigen auch die Assoziation des AdxD15N-AdR Komplexes. In Anwesenheit der Salze und Putrescin wird der Komplex stabiler, Spermidin und Spermin schwächen ihn.

**Tabelle 3.13: SPR-Analyse der Interaktion zwischen Adx<sub>ox</sub> mit AdR<sub>ox</sub> in Anwesenheit von Polyaminen und Salzen.**

Das Bindungsverhalten von AdR (Konzentration zwischen 100 - 500 nM) an Adx WT oder den Adx-Mutanten AdxD15K, AdxD15N, AdxD39K oder AdxD39N, die zuvor auf einen CM5 Chip (~300 RU) immobilisiert wurden, wurde in Biacore HBS-EP Puffer (0,01 M HEPES Puffer, pH 7,4, 0,15 M NaCl mit 0,005% Surfactant P20) bei 25°C untersucht. Die Sensorgramme der Interaktionspartner ohne (Puffer) und in Anwesenheit von Salzen (KCl, MgCl<sub>2</sub>) oder der Polyamine (alle bei einer Ionenstärke von I = 1,0 mM) wurden mit dem Biacore Evaluierungsprogramm 4.1 als ein 1:1 Bindungsmodell analysiert. Standardabweichungen (n ≥ 4) zu den gezeigten Werten waren innerhalb ± 10 %.

	AdxWT			AdxD15K		
	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$ ( $k_{off}/k_{on}$ )	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$ ( $k_{off}/k_{on}$ )
	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]
<b>Puffer</b>	3,81 10 <sup>3</sup>	2,86 10 <sup>-3</sup>	7,50 10 <sup>-7</sup>	1,97 10 <sup>4</sup>	1,83 10 <sup>-3</sup>	9,29 10 <sup>-8</sup>
<b>+ I = 1,0 mM KCl</b>	4,13 10 <sup>4</sup>	6,06 10 <sup>-3</sup>	1,47 10 <sup>-7</sup>	2,95 10 <sup>4</sup>	3,99 10 <sup>-3</sup>	1,35 10 <sup>-7</sup>
<b>+ I = 1,0 mM MgCl<sub>2</sub></b>	2,99 10 <sup>3</sup>	2,50 10 <sup>-3</sup>	8,36 10 <sup>-7</sup>	2,03 10 <sup>4</sup>	1,37 10 <sup>-3</sup>	6,75 10 <sup>-8</sup>
<b>+ I = 1,0 mM Putrescin</b>	3,12 10 <sup>4</sup>	5,03 10 <sup>-3</sup>	1,61 10 <sup>-7</sup>	1,36 10 <sup>4</sup>	1,49 10 <sup>-3</sup>	1,10 10 <sup>-7</sup>
<b>+ I = 1,0 mM Spermidin</b>	2,74 10 <sup>4</sup>	4,71 10 <sup>-3</sup>	1,71 10 <sup>-7</sup>	4,60 10 <sup>3</sup>	8,53 10 <sup>-4</sup>	1,85 10 <sup>-7</sup>
<b>+ I = 1,0 mM Spermin</b>	1,76 10 <sup>4</sup>	5,77 10 <sup>-3</sup>	3,28 10 <sup>-7</sup>	3,31 10 <sup>3</sup>	1,30 10 <sup>-3</sup>	3,93 10 <sup>-7</sup>

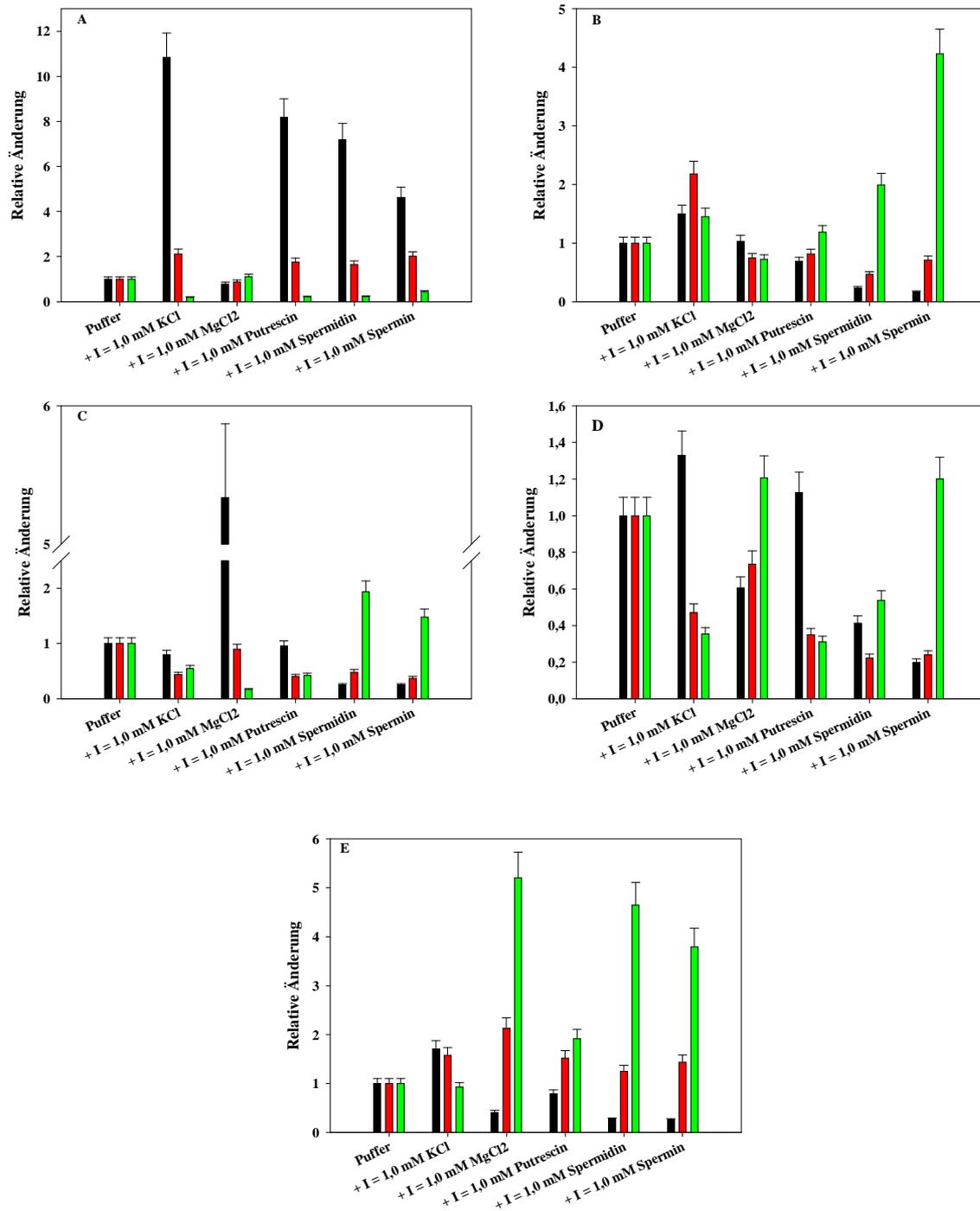
	AdxD15N			AdxD39K		
	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$ ( $k_{off}/k_{on}$ )	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$ ( $k_{off}/k_{on}$ )
	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]
<b>Puffer</b>	1,10 10 <sup>4</sup>	3,46 10 <sup>-3</sup>	3,15 10 <sup>-7</sup>	2,64 10 <sup>4</sup>	3,95 10 <sup>-3</sup>	1,50 10 <sup>-7</sup>
<b>+ I = 1,0 mM KCl</b>	8,76 10 <sup>3</sup>	1,51 10 <sup>-3</sup>	1,73 10 <sup>-7</sup>	3,51 10 <sup>4</sup>	1,86 10 <sup>-3</sup>	5,30 10 <sup>-8</sup>
<b>+ I = 1,0 mM MgCl<sub>2</sub></b>	5,87 10 <sup>4</sup>	3,10 10 <sup>-3</sup>	5,28 10 <sup>-8</sup>	1,60 10 <sup>4</sup>	2,90 10 <sup>-3</sup>	1,81 10 <sup>-7</sup>
<b>+ I = 1,0 mM Putrescin</b>	1,05 10 <sup>4</sup>	1,40 10 <sup>-3</sup>	1,33 10 <sup>-7</sup>	2,97 10 <sup>4</sup>	1,38 10 <sup>-3</sup>	4,65 10 <sup>-8</sup>
<b>+ I = 1,0 mM Spermidin</b>	2,72 10 <sup>3</sup>	1,66 10 <sup>-3</sup>	6,10 10 <sup>-7</sup>	1,09 10 <sup>4</sup>	8,77 10 <sup>-4</sup>	8,05 10 <sup>-8</sup>
<b>+ I = 1,0 mM Spermin</b>	2,73 10 <sup>3</sup>	1,27 10 <sup>-3</sup>	4,65 10 <sup>-7</sup>	5,24 10 <sup>3</sup>	9,43 10 <sup>-4</sup>	1,80 10 <sup>-7</sup>

	AdxD39N		
	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$ ( $k_{off}/k_{on}$ )
	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]
<b>Puffer</b>	2,07 10 <sup>4</sup>	8,50 10 <sup>-4</sup>	4,11 10 <sup>-8</sup>
<b>+ I = 1,0 mM KCl</b>	3,53 10 <sup>4</sup>	1,34 10 <sup>-3</sup>	3,80 10 <sup>-8</sup>
<b>+ I = 1,0 mM MgCl<sub>2</sub></b>	8,45 10 <sup>3</sup>	1,81 10 <sup>-3</sup>	2,14 10 <sup>-7</sup>
<b>+ I = 1,0 mM Putrescin</b>	1,64 10 <sup>4</sup>	1,29 10 <sup>-3</sup>	7,87 10 <sup>-8</sup>
<b>+ I = 1,0 mM Spermidin</b>	5,55 10 <sup>3</sup>	1,06 10 <sup>-3</sup>	1,91 10 <sup>-7</sup>
<b>+ I = 1,0 mM Spermin</b>	5,26 10 <sup>3</sup>	1,22 10 <sup>-3</sup>	1,56 10 <sup>-7</sup>

Zur Festigung des AdR-AdxD39K Komplexes (**Tabelle 3.13**) schwächt Spermidin die Bindung hauptsächlich über die Dissoziationsrate. MgCl<sub>2</sub> und Spermin verlangsamen sowohl die Assoziations- als auch die Dissoziation, so dass der  $K_D$  leicht ansteigt. KCl und Putrescin erhöhen  $k_{on}$ , erniedrigen  $k_{off}$  und festigen die Bindung der Mutanten an die AdR.

Die Schwächung des AdxD39N-AdR Komplexes erfolgt durch die Polyamine hauptsächlich über die Assoziationsrate. Die relative Änderung in den  $k_{on}$ -Werten bei der Komplexbildungen (Putrescin > Spermidin > Spermin) korrespondiert mit einer abnehmenden molekularen Konzentration der Polyamine (zweiwertig > dreiwertig > vierwertig). MgCl<sub>2</sub> verhält sich wie die Polyamine. Das einwertige Salz KCl erhöht in gleichen Maße  $k_{on}$  und  $k_{off}$ , so dass sich der  $K_D$  im Vergleich zum Puffer kaum ändert (**Tabelle 3.13** und **Abbildung 3.25**).

In Puffer und in Anwesenheit von  $I = 1,0$  mM MgCl<sub>2</sub> steigern alle Mutanten die Assoziationsrate, verändern kaum die Dissoziationsrate und festigen so im Vergleich zum Wildtyp die Bindung zur AdR (abnehmender  $K_D$ ). In Spermidin erniedrigen alle Mutanten sowohl die Assoziations- als auch die Dissoziationsrate. Der  $K_D$  bleibt bei AdxD15K und AdxD39N unverändert, er nimmt bei AdxD39K ab und verdreifacht sich bei AdxD15N. Im Gegensatz dazu schwächen alle Mutanten in MgCl<sub>2</sub>, Putrescin und Spermin gleichzeitig die Assoziations- als auch die Dissoziationsrate, was mit den AdxD39 Mutanten zu einem instabileren AdR-Adx Komplex führt. Bei den AdxD15 Mutanten führt dies im Vergleich zum Wildtyp zu einem unveränderten (KCl, **Abbildung 3.25 B**), leicht gefallenem (Putrescin, **Abbildung 3.25 D**), oder leicht gestiegenem (Spermin, **Abbildung 3.25 F**)  $K_D$ . Auch bei einer höheren Ionenstärke wird deutlich, dass der Einfluss der Salze und Polyamine auf den Wildtypen deutlicher, eindeutiger und stärker sind als auf die Mutanten (**Tabelle 3.13** und **Abbildung 3.25**).



**Abb. 3.25: Relative Änderung der aus den Biacore Experimenten erhaltenen kinetischen Parameter  $k_{on}$  (schwarz),  $k_{off}$  (rot),  $K_D$  (grün)** Die Änderungen durch die Salze und Polyamine (I = 1,0 mM) wurden in Relation zu den auf 1 gesetzten Werten, die im Puffer gemessen wurden, dargestellt. (A) AdxWT, (B) AdxD15K, (C) AdxD15N, (D) AdxD39K, (E) AdxD39N

### 3.3.4 Interaktion der Adx-Mutanten mit der AdR

Um zu bestimmen, in welchem Ausmaß die Polyamine die Interaktion der Mutanten mit der AdR beeinflussen, wurde ein Assay mit Cytochrom *c* als einem artifiziellen Elektronenakzeptor verwendet. Unter diesen Bedingungen liegt Cytochrom *c* in einem großen Überschuss vor und die erhaltenen  $K_m$  Werte der Cytochrom *c* Reduktion sind im Wesentlichen äquivalent zu den Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) des AdR-Adx Komplexes (Lambeth & Kamin, 1977). Obwohl diese Reaktion physiologisch nicht vorkommt, ist sie ein häufig benutztes Modell (Lambeth *et al.*, 1979 + 1982; Geren *et al.*, 1984; Coghlan *et al.*, 1988; Cupp & Vickery 1989; Coghlan & Vickery 1991; Uhlmann *et al.*, 1994) für den Elektrontransfer von der reduzierten Adrenodoxin Reduktase zum Adrenodoxin.

Vergleicht man in einem ersten Schritt die Mutanten mit dem Wildtypen, so zeigen sich folgende Unterschiede (**Tabelle 3.14**).

- A)** Nur in Puffer ist die Affinität der Mutanten AdxD39K und AdxD39N ( $K_m$ ) zu AdR im Vergleich zum Wildtyp leicht erniedrigt, während  $V_{max}$  in etwa gleich bleibt. AdxD15K und AdxD15N verdoppeln die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung ( $V_{max}$ ), steigern gleichzeitig aber auch den  $K_m$  um das 5,6- (AdxD15K) beziehungsweise 3,5-fache (AdxD15N). Die AdxD15 Mutanten zeigen somit eine Abnahme in ihrer Affinität zur Reduktase, gleichzeitig aber auch einen verbesserten Elektronentransfer im Vergleich zum Wildtyp.
- B)** In Anwesenheit von 0,1 mM des Salzes KCl zeigen im Vergleich zum Wildtyp ( $K_m = 1,27 \mu\text{M}$ ) alle Mutanten erhöhte  $K_m$ -Werte, bei den AdxD39-Mutanten etwas stärker als bei den AdxD15-Mutanten. Auch  $V_{max}$  wurde durch alle Mutanten verdoppelt. Das bedeutet, dass alle Mutanten eine geringere Reduktase-Affinität als der Wildtyp besitzen, der Elektronentransfer aber durch alle Mutanten beschleunigt wird.
- C)** In Anwesenheit von 0,1 mM Putrescin nimmt der  $K_m$  aller Mutanten (AdxD15N auf 65%, AdxD15K und AdxD39K auf 46%, AdxD39N auf 39%) ab. Während AdxD15N und AdxD39K  $V_{max}$  steigern, zeigen AdxD15K und AdxD39N einen Rückgang auf 60% (AdxD15K) bzw. 78% (AdxD39N). Alle Mutanten binden besser an die AdR, aber nur AdxD15N und AdxD39K verbessern auch den Elektronentransfer.
- D)** Bei 0,1 mM Spermidin zeigen sich für  $K_m$  und  $V_{max}$  ähnliche Muster. In der Reihenfolge AdxD15N ( $0,52 \mu\text{M}$ ) < AdxD39N < AdxD15K ( $1,07 \mu\text{M}$ ) wird  $K_m$  verdreifacht, gleichzeitig steigt  $V_{max}$ . AdxD39K verursacht eine Reduzierung des  $K_m$  auf 28% und einen Rückgang des  $V_{max}$  auf 65%. AdxD39K besitzt also eine höhere

Affinität zur AdR, verringert aber auch den Elektronentransfer. Bei allen anderen Mutanten verringert sich die Affinität zur AdR, aber der Elektronentransfer wird schneller.

- E)** Der  $K_m$  Wert steigt bei allen Mutanten in 0,1 mM Spermin (verdoppelt bei AdxD39K, verdreifacht bei AdxD15N), AdxD15K verursacht allerdings eine 20-fache Steigerung. Der  $V_{max}$  fällt bei beiden K-Mutanten um 34% (AdxD15K) bzw. 16% (AdxD39K), bleibt bei AdxD15N gleich und steigt bei AdxD39N um 10%.

**Tabelle 3.14: Kinetische Konstanten der Adx Mutanten im Cytochrom c Assay**

Die Interaktion der Adrenodoxin Mutanten mit der Adrenodoxin Reduktase wurde über die Reduktion des Cytochrom c bei 550 nm in Puffer oder mit einer zusätzlichen Ionenkonzentration der Salze und Polyamine von 0,1 mM betrachtet.

	AdxWT		AdxD15K		AdxD15N		AdxD39K		AdxD39N	
	$K_m$	$V_{max}$								
	$\mu\text{M}$	Nanomol red. Cytochrom c /min								
Puffer	0,30 $\pm 0,03$	359 $\pm 14$	1,68 $\pm 0,20$	658 $\pm 44$	1,06 $\pm 0,32$	665 $\pm 94$	0,45 $\pm 0,05$	350 $\pm 14$	0,52 $\pm 0,05$	339 $\pm 11$
+ 0,1 mM KCl	1,27 $\pm 0,35$	157 $\pm 20$	2,86 $\pm 1,05$	292 $\pm 62$	2,39 $\pm 0,81$	324 $\pm 59$	3,15 $\pm 1,06$	370 $\pm 74$	3,03 $\pm 1,63$	294 $\pm 98$
+ 0,1 mM Put	0,79 $\pm 0,31$	244 $\pm 36$	0,36 $\pm 0,15$	147 $\pm 23$	0,51 $\pm 0,16$	451 $\pm 51$	0,36 $\pm 0,13$	396 $\pm 37$	0,31 $\pm 0,13$	190 $\pm 19$
+ 0,1 mM Spd	0,39 $\pm 0,04$	289 $\pm 9$	1,07 $\pm 0,11$	416 $\pm 20$	0,52 $\pm 0,03$	308 $\pm 7$	0,11 $\pm 0,03$	188 $\pm 19$	0,68 $\pm 0,10$	324 $\pm 22$
+ 0,1 mM Spn	0,21 $\pm 0,02$	298 $\pm 9$	4,09 $\pm 1,92$	221 $\pm 65$	0,58 $\pm 0,15$	296 $\pm 29$	0,40 $\pm 0,05$	256 $\pm 10$	0,52 $\pm 0,06$	336 $\pm 14$

Betrachtet man nun  $K_m$  und  $V_{max}$  bei jeweils einer Konzentration von 1,0 mM an Salzen und Polyaminen ergibt sich folgendes Bild (**Tabelle 3.15**)

**Tabelle 3.15: Kinetische Konstanten der Adx Mutanten im Cytochrom *c* Assay**

Die Interaktion der Adrenodoxin Mutanten mit der Adrenodoxin Reduktase wurde über die Reduktion des Cytochrom *c* bei 550 nm in Puffer oder mit einer zusätzlichen Ionenkonzentration der Salze und Polyamine von 1,0 mM betrachtet.

	AdxWT		AdxD15K		AdxD15N		AdxD39K		AdxD39N	
	$K_m$	$V_{max}$								
	$\mu\text{M}$	Nanomol red. Cytochrom <i>c</i> /min								
Puffer	0,30 $\pm 0,03$	359 $\pm 14$	1,68 $\pm 0,20$	658 $\pm 44$	1,06 $\pm 0,32$	665 $\pm 94$	0,45 $\pm 0,05$	350 $\pm 14$	0,52 $\pm 0,05$	339 $\pm 11$
+ 1,0 mM KCl	1,40 $\pm 0,34$	224 $\pm 26$	2,48 $\pm 1,10$	239 $\pm 57$	4,12 $\pm 1,79$	263 $\pm 76$	1,22 $\pm 0,43$	179 $\pm 26$	1,23 $\pm 0,45$	115 $\pm 20$
+ 1,0 mM Put	0,23 $\pm 0,03$	256 $\pm 10$	2,68 $\pm 0,76$	421 $\pm 67$	0,65 $\pm 0,11$	296 $\pm 18$	0,18 $\pm 0,05$	189 $\pm 12$	0,79 $\pm 0,28$	331 $\pm 38$
+ 1,0 mM Spd	0,32 $\pm 0,04$	291 $\pm 11$	1,45 $\pm 0,32$	399 $\pm 51$	0,38 $\pm 0,07$	287 $\pm 18$	0,33 $\pm 0,07$	299 $\pm 20$	0,34 $\pm 0,07$	283 $\pm 23$
+ 1,0 mM Spn	0,96 $\pm 0,44$	150 $\pm 39$	1,80 $\pm 0,14$	156 $\pm 7$	0,60 $\pm 0,17$	195 $\pm 22$	0,71 $\pm 0,22$	150 $\pm 15$	1,21 $\pm 0,26$	257 $\pm 29$

- F)** Bei 1,0 mM KCl fällt der  $K_m$  der AdxD39-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp um 13%. Dagegen wird der  $K_m$  bei AdxD15K fast verdoppelt, durch AdxD15N sogar verdreifacht. Während  $V_{max}$  bei AdxD39K auf 80% und bei AdxD39N auf 51% zurückgeht, steigert AdxD15K ihn um 7% und AdxD15N um 17%. Die AdxD15 Mutanten binden schlechter an die Reduktase, verbessern aber den Elektronentransfer. Die AdxD39 Mutanten binden besser an die AdR, verlangsamen aber auch den Elektronentransfer.
- G)** In Anwesenheit von 1,0 mM Putrescin nimmt der  $K_m$  des AdxD39K um 22% ab. Die übrigen Mutanten steigern alle den  $K_m$  in der Reihenfolge AdxD15N (um das 3-fache) < AdxD39N < AdxD15K (um das 11-fache). Mit dem  $V_{max}$  Wert verhält es sich ähnlich. AdxD39K zeigt im Vergleich zum Wildtyp einen Rückgang um 30%, während ihn AdxD15N (um 16%) < AdxD39N (um 29%) < AdxD15K (um 65%) steigern. AdxD39K erhöht die Affinität zur AdR, verringert aber auch den Elektronentransfer. Bei den übrigen Mutanten zeigt sich eine Verringerung der Affinität zur AdR und eine Steigerung des Elektronentransfers.
- H)** 1,0 mM Spermidin: Der  $K_m$  Wert der Mutanten AdxD15N (0,38  $\mu\text{M}$ ) AdxD39K (0,33  $\mu\text{M}$ ) und AdxD39N (0,34  $\mu\text{M}$ ) zeigt eine ähnlichen Wert wie der Wildtyp (0,32  $\mu\text{M}$ ). AdxD15K verursacht allerdings eine Steigerung des  $K_m$  um das 4,5-fache, bindet also schlechter an die Reduktase. Beim  $V_{max}$  verhält es sich ähnlich. Die Werte für

AdxD15N, und die AdxD39 Mutanten liegen in der gleichen Größenordnung wie der Wildtyp, AdxD15K verbessert ihn um 37%.

- D)** Betrachtet man die Veränderung bei 1,0 mM Spermin so steigt der  $K_m$  durch AdxD39N um 26% und durch AdxD15K sogar um 88%. Er fällt bei AdxD15N auf 63% und auf 74% bei AdxD39K.  $V_{max}$  ändert sich durch die K-Mutanten kaum, die N-Mutanten steigern ihn (AdxD15N um 30%; AdxD39N um 71%).

Vergleicht man nun den Einfluss der verschiedenen Konzentrationen an Salzen und Polyaminen auf den  $K_m$  und  $V_{max}$  Wert des Wildtypen und der Mutanten, ergibt sich ein komplexes und uneinheitliches Bild (**Tabelle 3.14** und **3.15**).

- I.)** AdxWT: Für  $V_{max}$  gilt, dass er sowohl bei einer zugegeben Konzentration von 0,1 mM als von 1,0 mM an Salz oder Polyaminen erniedrigt wird. Bei 0,1 mM in der Reihenfolge  $KCl < Put < Spd < Spn$ , bei 1,0 mM in der Reihenfolge  $Spn \ll KCl < Put < Spd$ . Sowohl 0,1 mM als auch 1,0 mM KCl erhöhen den  $K_m$  Wert um das vier- (0,1 mM) bzw. 4,5-fache (1,0 mM). Er steigt sowohl bei 0,1 mM Putrescin, 0,1 mM Spermidin als auch bei 1,0 mM Spermin, wird durch 1,0 mM Putrescin und 0,1 mM Spermin erniedrigt und bleibt bei 1,0 mM Spermidin unverändert. Berücksichtigt man die Konkurrenz zwischen Adx und den Polyaminen um die Interaktion mit der AdR, so agieren KCl, 0,1 mM Putrescin, 0,1 mM Spermidin als auch 1,0 mM Spermin wie ein Mischtyp, 1,0 mM Putrescin und 0,1 mM Spermin wie ein unkompetitiver und 1,0 mM Spermidin wie ein nicht-kompetitiver Inhibitor.
- II.)** AdxD15K: Der  $V_{max}$  Wert wird im Vergleich zur Kontrolle (Reaktion nur im Puffer) in allen Fällen erniedrigt. Bei 0,1 mM in der Reihenfolge  $Put < Spn \sim KCl < Spd$  und bei 1,0 mM in der Reihenfolge  $Spn < KCl < Spd < Put$ . KCl, 1,0 mM Putrescin erhöhen den  $K_m$  um das doppelte, 0,1 mM Spermin sogar um das dreifach. 0,1 mM Putrescin, und Spermidin erniedrigen ihn, er bleibt gleich bei 1,0 mM Spermin. Somit sind alle getestete Bedingungen potentielle Konkurrenten um die Interaktion mit AdR. KCl, Putrescin in einer Konzentration von 1,0 mM und 0,1 mM Spermin agieren wie ein Mischtyp, 1,0 mM Spermin wie ein nichtkompetitiver und Spermidin und 0,1 mM Putrescin wie ein unkompetitiver Inhibitor.
- III.)** AdxD15N: Der  $V_{max}$  Wert wird im Vergleich zur Kontrolle (Reaktion nur im Puffer) in allen Fällen erniedrigt. Bei 0,1 mM in der Reihenfolge  $Spn < Spd \sim KCl < Put$  und bei

1,0 mM in der Reihenfolge Spn < KCl < Spd < Put. Einzig KCl steigert den  $K_m$ , alle Polyamine senken ihn um 40% - 50%. KCl ist ein Mischtyp, die Polyamine verhalten sich wie unkompetitive Inhibitoren.

- IV.) AdxD39K: Der  $V_{max}$  Wert wird bei 0,1 mM KCl und 0,1 mM Putrescin erhöht, er nimmt bei 0,1 mM Spermidin und Spermin ab. Bei 1,0 mM nimmt er in der Reihenfolge Spn < KCl ~ Put << Spd ab. Hier steigern KCl und 1,0 mM Spermin den  $K_m$ , alle anderen Bedingungen reduzieren ihn. KCl und 1,0 mM Spermin agieren wie ein Mischtyp, Putrescin, Spermidin und 0,1 mM Spermin wie ein unkompetitiver Inhibitor.
- V.) AdxD39N: Der  $V_{max}$  Wert wird im Vergleich zur Kontrolle (Reaktion nur im Puffer) in allen Fällen erniedrigt. Bei 0,1 mM in der Reihenfolge Put << KCl < Spd ~ Spn und bei 1,0 mM in der Reihenfolge KCl < Spn ~ Spd < Put. Der  $K_m$  Wert wird durch KCl 1,0 mM Putrescin, 0,1 mM Spermidin und 1,0 mM Spermin gesteigert, verändert sich bei 0,1 mM Spermin nicht, nimmt bei 0,1 mM Putrescin und 1,0 mM Spermidin ab. Demnach wirken KCl, 1,0 mM Putrescin, 0,1 mM Spermidin und 1,0 mM Spermin wie ein Mischtyp, während 0,1 mM Spermin wie ein nicht-kompetitiver und 0,1 mM Putrescin und 1,0 mM Spermidin wie ein unkompetitiver Inhibitor agieren.

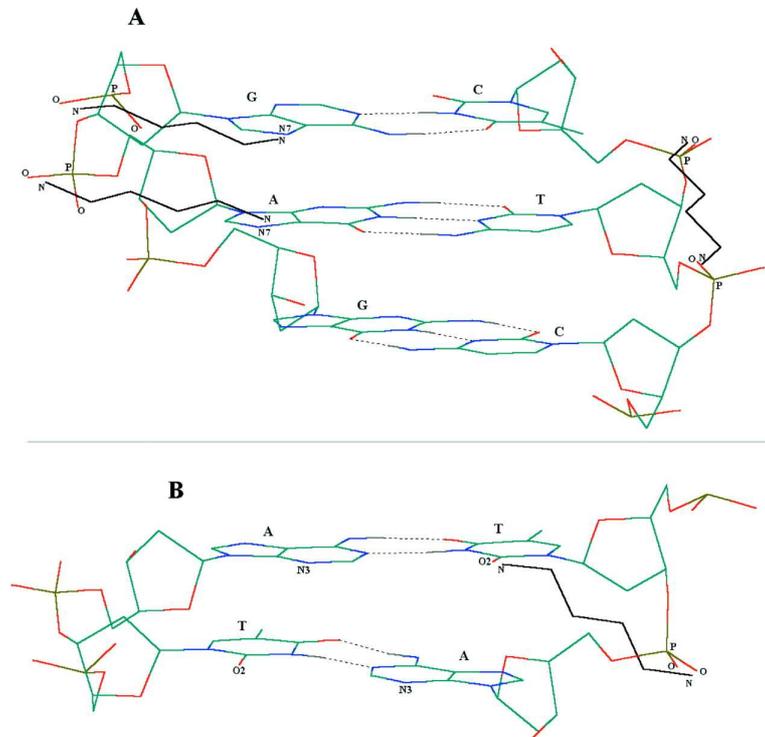
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in jeder Konzentration KCl bei allen Adx Spezies als Mischtyp fungiert. Die Funktion der Polyamine war in dieser Testreihe abhängig von der eingesetzten Konzentration und der Mutante, mit der sie interagierten. Putrescin agierte hauptsächlich wie ein Mischtyp oder ein unkompetitiver Inhibitor, Spermidin agiert bei den Mutanten mit einer Ausnahme (0,1 mM bei AdxD39N als Mischtyp) wie ein unkompetitiver Inhibitor, beim Wildtyp wie ein nicht-kompetitiver Inhibitor. 1,0 mM Spermin verhielt sich wie ein Mischtyp beim Wildtyp und den AdxD39-Mutanten, unkompetitiv bei AdxD15K und nicht-kompetitiver bei AdxD15N. 0,1mM Spermin verhielt sich sowohl wie ein Mischtyp (AdxD15K) auch als wie ein nicht-kompetitiver (AdxD39N) oder ein unkompetitiver (AdxWT, AdxD15N, AdxD39K) Inhibitor.

### Diskussion und Ausblick

Protein-Protein Interaktionen sind von zentraler Bedeutung für die meisten biologischen Prozesse – von der interzellulären Kommunikation bis zum programmierten Zelltod – und repräsentieren daher wichtige Angriffspunkte für menschliche Therapeutika. Die Möglichkeit, in spezifische Protein-Protein Interaktionen einzugreifen, birgt ein beträchtliches Potential, die Funktion ausgewählter Proteine innerhalb der Zelle zu beeinflussen. Zellpermeable, kleine, organische Modulatoren oder sogar Inhibitoren von Protein-Protein Interaktionen sind daher sehr wichtige Werkzeuge sowohl für die Untersuchung von physiologisch bedeutsamen, zellulären Prozessen als auch für die Behandlung einer Vielzahl schwerwiegender Erkrankungen des Menschen. Das gegenwärtig hohe Interesse der Arzneimittelforschung an therapeutischen Antikörpern spiegelt den Wert solcher Targets wider (Stockwin & Holmes, 2003). Damit einhergehend wächst die Zahl der Veröffentlichungen, die über kleine Moleküle als erfolgreich eingesetzte Inhibitoren von Protein-Protein Interaktionen berichten. Die Entwicklung solcher Inhibitoren stellt sich allerdings als schwierig heraus (Berg, 2003; Arkin & Wells, 2004). Bisher wurden zum Finden von Modulatoren entweder neue Moleküle anhand der Proteinstruktur entworfen oder kombinatorische Bibliotheken nach Molekülen durchsucht, deren Struktur bekannten Inhibitoren ähnelt (Zutshi *et al.*, 1998; Cochran, 2001; Berg, 2003). Einen interessanten Ansatz entwickelte 2000 die Gruppe um P. Schultz (Guo *et al.*, 2000), die einen Hohlraum am Protein-Protein Interface erzeugten, der zu einer  $10^6$ -fachen Reduzierung in der Bindung führte, und anschließend nach Verbindungen suchten, die die Assoziation (teilweise) wieder herstellten. Jedoch konnten bis jetzt nur wenige Beispiele von kleinen Antagonisten der Proteinkomplexe beschrieben werden (Cochran, 2000, 2001), die die Kriterien für die Applikation auf zellulärer Ebene erfüllen und für Studien am gesamten Organismus einsetzbar sind. Besonders im Hinblick auf eine therapeutische Entwicklung sind hohe Wirksamkeit, Selektivität und biologische Verfügbarkeit kombiniert mit einer geringen Toxizität unerlässliche Eigenschaften (Wells & McClendon, 2007).

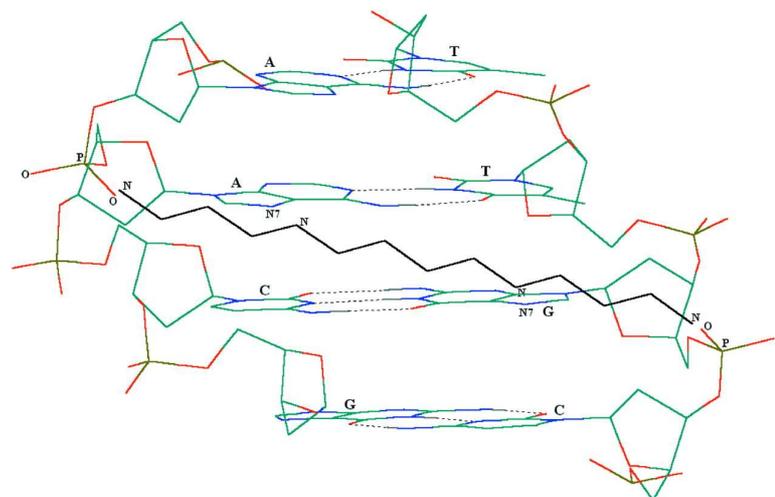
Einen weiteren möglichen Ansatz bei der Suche nach Modulatoren besteht nun darin, kleine körpereigene Moleküle, wie zum Beispiel die Polyamine, dazu zu verwenden, die elektrostatische Anziehung zwischen assoziierenden Proteinen zu überlagern, und somit neue Einblicke zu möglichen Konsequenzen für die Protein-Protein Wechselwirkungen und z.B. den intermolekularen Elektronentransport zu gewinnen. Polyamine können aufgrund ihrer mehrfachen Ladung, ihrer Flexibilität, ihres hohen Vorkommens und der Anwesenheit effizienter Transportsysteme die Struktur und die Funktion negativ geladener Biopolymere in der Zelle und im extrazellulären Raum beeinflussen. Elektrostatische Interaktionen der Polyamine

mit DNA und RNA (**Abbildungen 4.1 bis 4.3**) stabilisieren die Nukleinsäurestrukturen und beeinflussen unterschiedliche Schritte der Proteinbiosynthese unter physiologischen Bedingungen (Matthews, 1993).



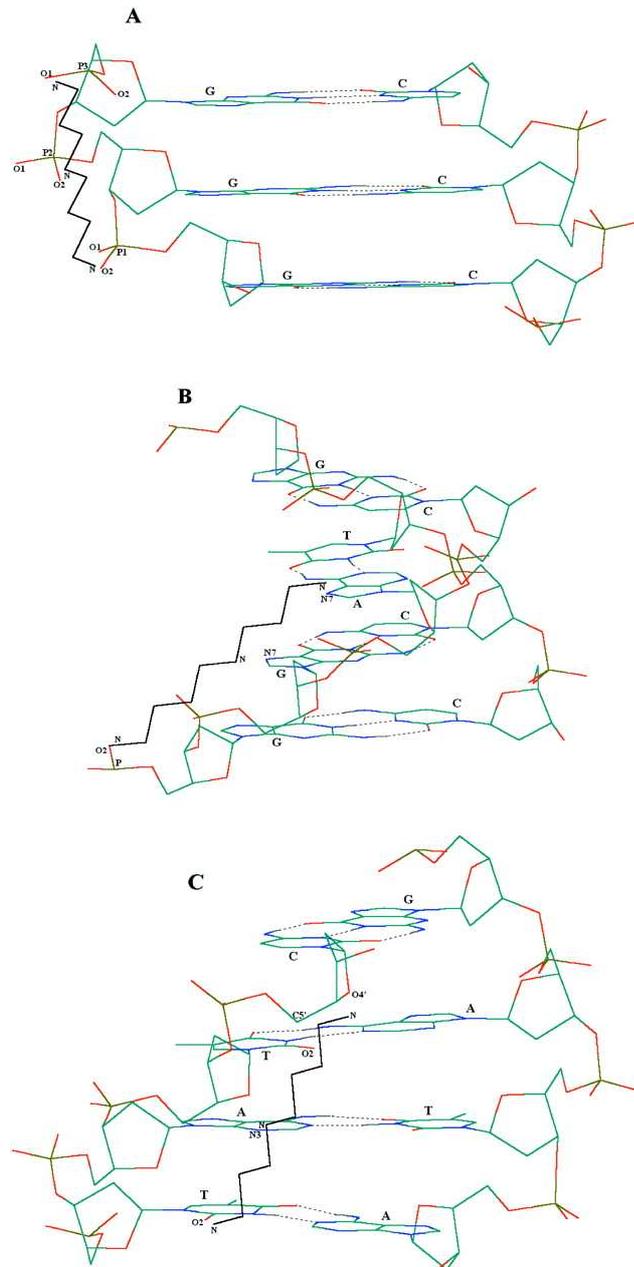
**Abb. 4.1: Vorschlag für die bevorzugte Bindung der Putrescin-DNA Komplexe.**

(A) Entlang der großen Furche. (B) Entlang der kleinen Furche. Abbildung aus Ouameur & Tajmir-Riahi, 2004; nach Ruiz-Chica *et al.*, 2001. Das Polyamin ist jeweils schwarz dargestellt.



**Abb. 4.2 Vorschlag für die bevorzugte Bindung der Spermin-DNA Komplexe.**

Entlang der großen Furche. Abbildung aus Ouameur & Tajmir-Riahi, 2004 nach Ruiz-Chica *et al.*, 2001. Das Polyamin ist jeweils schwarz dargestellt.



**Abb. 4.3: Vorschlag für die bevorzugte Bindung der Spermidin-DNA Komplexe.**

(A) Entlang der großen Furche. (B) Durch die große Furche. (C) Durch die kleinen Furche. Abbildung aus Ouameur & Tajmir-Riahi, 2004 nach Ruiz-Chica *et al.*, 2001. Das Polyamin ist jeweils schwarz dargestellt.

Um nachweisen zu können, dass Moleküle als Modulatoren agieren können, ist die Wahl eines bekannten und regulierbaren Protein-Protein Systems von großer Bedeutung. Von Vorteil ist die Kenntnis der genauen Bindestelle der Modulatoren, die durch NMR und Röntgenkristallstrukturen der Proteine identifiziert werden kann. Die bisherigen Erfahrungen bei der Inhibition mit kleinen Molekülen zeigen, dass es von Vorteil ist, wenn die Zielproteine Regionen mit hoher Bindungsaffinität, so genannte Hot Spots, besitzen, die auch von kleinen

Teilchen oder Peptiden bedeckt werden können. Diese Hot Spots müssen nicht in der Nähe der Protein-Protein Bindestelle sitzen, sondern werden auch an anderen, allosterischen, Stellen gefunden. Gezieltes Besetzen dieser Seiten mit kleinen Molekülen kann die Interaktionen zwischen den Proteinen und dadurch die enzymatische Funktion modulieren.

Das mitochondriale Elektronentransfersystem besteht aus einem Ferredoxin mit einem [2Fe-2S] Cluster (Adrenodoxin, Adx), einer FAD beinhaltenden Ferredoxinreduktase (Adrenodoxin-Reduktase, AdR) und einem Cytochrom P450. NADPH liefert Elektronen zur AdR und diese werden zum Adx und von dort zu den membrangebundenen Cytochromen P450 (CYP11A1, CYP11B1) übertragen, welche diese Elektronen zur anschließenden Substrathydroxylierungsreaktion nutzen. Es gibt eindeutige Beweise, dass die Komponenten der Cytochrom P450-abhängigen Elektronentransfersysteme in einer koordinierten, sehr spezifischen Art und Weise miteinander interagieren (Bernhardt, 1996; Grinberg *et al.*, 2000; Usanov *et al.*, 2002). Der Mechanismus wurde in vielen Untersuchungen mittels NMR Spektroskopie, ortsgerechter Mutagenese und der Röntgenstrukturanalyse untersucht. Mittlerweile sind auch Strukturen für die meisten Redoxpartner der Cytochrome (bakterielles PTR und PTX, microsomales CPR, cytb5 und b5R, mitochondriales Adx und der AdR-Adx Komplex (Wang *et al.*, 1997, Müller *et al.*, 1998, 2001; Lewis & Hlavica, 2000)) bekannt. Alle Studien zeigten, dass die Hauptkräfte zwischen den einzelnen Komponenten der Elektronentransferkette der Cytochrome elektrostatischer Natur sind. Hinzu kommt, dass elektrostatische Kräfte zwischen nur einigen wenigen Aminosäuren – hot spots – an den großen Kontaktstellen eine entscheidende Rolle spielen (Bernhardt, 1996; Grinberg *et al.*, 2000; Usanov *et al.*, 2002).

Das CYP11A1-System war Ausgangspunkt vieler Studien, da die benötigten Proteine in großer Menge sehr effizient in *E. coli* exprimiert und auch aus Säugetiergeweben sehr gut gereinigt werden können. So wurden in unserer Arbeitsgruppe z.B. schon die Auswirkung der Phosphorylierung des Adx auf den Elektronentransport (Zöllner *et al.*, 2004, 2007) sowie die Ionenstärkeabhängigkeit dieses Systems (Schiffler *et al.*, 2004) untersucht.

Aus früheren CYP-Untersuchungen ist durch mehrere Gruppen bekannt, dass die Polyamine Einfluss auf die Funktionen der Cytochrome nehmen, allerdings ohne den zu Grunde liegenden Mechanismus zu untersuchen: In mikrosomalen und in einem rekonstituierten CYP-System stimulierten Polyamine die Oxidation verschiedener Medikamente (Dalet *et al.*, 1983; Kulkarni & Gonzales, 1985, Osimitz & Kulkarni, 1985).

Jedoch wurde der Einfluss von Polyaminen auf diese Elektronentransportsysteme bisher nicht charakterisiert. Daher steht im Fokus der vorliegenden Arbeit die umfassende Analyse der Einflussmöglichkeiten von Polyaminen auf das mitochondriale CYP11A1-

Steroidhydroxylierungssystem der bovinen Nebennieren mittels Oberflächenplasmonresonanz, Stopped-Flow Messungen, Substratumwandlungsassays, UV/Vis und CD-Spektroskopie.

Es wird zum ersten Mal berichtet, dass kleine endogene Polyamine die Fähigkeit besitzen, mit Protein-Protein Interaktionen zu interferieren und somit eine wichtige regulatorische Rolle im physiologischen Proteinnetzwerk spielen können.

### 4.1 Die vielfältigen Effekte der Polyamine auf das CYP11A1 System

#### 4.1.1 Effekte der Polyamine auf die Spektraleigenschaften von CYP11A1

Polyamine besitzen Aminogruppen, die über das freie Elektronenpaar des Stickstoffs an das Häm-Eisen der Cytochrome P450 binden und somit ein so genanntes Typ II Differenzspektrum ausbilden können (Vaz *et al.*, 1992; Locuson *et al.*, 2007). Typ II Liganden werden als Inhibitoren der P450 Funktionen betrachtet, da sie das niedrige Redoxpotential der Cytochrome stabilisieren und mit dem Sauerstoff um die Bindung an das Häm Eisen konkurrieren. Dennoch sind einige Typ II Liganden wie zum Beispiel Anilin (Yamazaki *et al.*, 1996) oder Substanzen, die Imidazol- und Triazolreste besitzen, auch als Substrate für P450 bekannt (Pearson *et al.*, 2006; Kunze *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden daher durch spektroskopische Titration die Bindungsspektren der Polyamine an das CYP11A1 untersucht. Bei diesen Experimenten musste berücksichtigt werden, dass die Polyamine bei neutralem pH zwar positiv geladen sind (Bencini *et al.*, 1999), die Aminogruppen mit steigenden pH Werten aber zunehmend deprotoniert werden, und die Polyamine sich damit an das Häm-Eisen anlagern können (**Abbildung 1.1**). In der Tat zeigen die Polyamine Spermidin und Spermin bei pH-Werten  $> 8,3$  eine Typ II Bindung ( $\lambda_{\max}$  424 – 435 nm,  $\lambda_{\min}$  392 – 410 nm), da sie unter diesen Bedingungen teilweise deprotoniert vorlagen (**Abbildung 3.1**). Überraschenderweise wurde bei niedrigen Polyaminkonzentrationen ( $\leq 1$  mM), bei denen sie normalerweise auch in den Zellen vorliegen, eine Reverse Typ I (RI) Bindung ( $\lambda_{\max}$  420 nm,  $\lambda_{\min}$  um 386 nm) sichtbar (**Abbildung 3.1**). In diesem Fall interagieren die Polyamine mit dem Cytochrom an einer anderen als der Typ I Stelle und eindeutig an einer anderen Stelle als dem Häm-Eisen (Typ II Bindestelle) (Schenkman *et al.*, 1972). Darüber hinaus beeinträchtigt die durch die Polyamine verursachte RI Bindung nicht die Interaktion von reduziertem CYP11A1 mit Kohlenstoffmonooxid (**Abbildung 3.2**). Dies bedeutet, dass die physiologischen Eigenschaften des Cytochroms nicht beeinträchtigt sind, also ein Elektronentransfer vom Cytochrom zum Substrat Cholesterol weiterhin gewährleistet ist. Ähnliche Beobachtungen zeigten sich bei früheren Untersuchungen von anderen P450 Liganden. Sie zeigten eine

zusätzliche Interaktion mit Positionen, die von der Häm- bzw. Substrattasche weiter entfernt liegen, die zu konformellen Änderungen und zu einer veränderten Häm Absorption führen können (Schuster *et al.*, 1975; Chun *et al.*, 2001; Isin & Guengerich, 2006).

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse daraufhin, dass die Art und Weise, wie die Polyamine an das Cytochrom binden, abhängig vom Puffer-pH ist. Es scheint jedoch unwahrscheinlich, dass bei einer kleinen („physiologischen“) Polyaminkonzentration um 1,0 mM die schwache Typ II Interaktion mit CYP11A1 einen Einfluss auf die Enzymaktivität haben könnte.

#### 4.1.2 Polyamine üben spezifische Einflüsse auf die Protein-Protein Interaktion im CYP11A1 System aus.

Um die oben aufgestellte Hypothese, wonach kleine endogene Polyamine die Fähigkeit besitzen, das Bindungsverhalten von Adx zu seinen Redoxpartnern zu beeinflussen, experimentell zu beweisen, wurde die optische Biosensorik angewendet. Mit Hilfe dieser Technik ist es möglich, die Bindung zwischen Adx und seinen Redoxpartnern direkt zu verfolgen. In dieser Arbeit wurde das Biacore3000 zur Charakterisierung der Interaktionen zwischen oxidiertem Adx und AdR<sub>ox</sub> beziehungsweise CYP11A1<sub>ox</sub> eingesetzt. Freie Aminogruppen des Ferredoxins, welche gleichmäßig auf der Proteinoberfläche verteilt sind, wurden benutzt, um das Protein an die mit EDC/NHS aktivierten Carboxylgruppen der Dextranmatrix des Sensorchips zu binden. **Abbildung 3.7** zeigt ein typisches Sensorgramm zur Kopplung von Adx. Verglichen mit anderen publizierten Immobilisierungsmethoden (Ivanov *et al.*, 1999) benötigt die hier verwendete Prozedur kein azidisches Puffersystem. Da der Eisen-Schwefel Cluster des Adx sensitiv auf eine azidische Umgebung reagiert, würde eine Immobilisierungsmethode bei oder unter pH 6, die Bildung und Bindung von inaktivem Apoprotein an den Sensorchip erhöhen. Die in unserer Arbeitsgruppe entwickelte und in dieser Arbeit verwendete Methode wurde dagegen unter neutralen Bedingungen durchgeführt, und stabilisiert somit die Bindung des Holo Proteins (Schiffler *et al.*, 2004; Zöllner *et al.*, 2007). Wie in **Tabelle 3.3** und **3.4** gezeigt wird, weist die Komplexbildung zwischen AdxWT und AdR beziehungsweise CYP11A1 deutliche Unterschiede auf. Dabei zeigte sich, dass die Komplexbildung zwischen AdxWT und AdR ein schneller Prozess ist, der durch eine  $k_{on}$  Geschwindigkeit von  $3,81 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und einen  $K_D$  im mikromolaren Bereich bestimmt wird (**Tabelle 3.3** und **Tabelle 3.4**). Die Untersuchungen zur Interaktion zwischen AdxWT und CYP11A1 zeigten ein auffällig anderes Bindungsverhalten als AdxWT zur AdR (**Tabelle 3.3** und **Tabelle 3.4**). Für die CYP11A1 Bindung an das Adx wurde eine 48 mal schnellere  $k_{on}$ -Rate als für die Bindung der AdR bestimmt, während die *off*-Raten in der gleichen Größenordnung

waren. Auch die  $K_D$  Werte für die beiden untersuchten Komplexe weichen stark voneinander ab. So ist der AdxWT-CYP11A1 Komplex 20-fach stabiler als der AdxWT-AdR Komplex. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Untersuchungen von Ivanov, Schiffler und Zöllner überein (Ivanov *et al.*, 1999; Schiffler *et al.*, 2004; Zöllner *et al.*, 2004, 2007). Darüber hinaus sind die von Brandt und Vickery veröffentlichten  $K_D$  Werte für den Komplex zwischen humaner AdR und humanen Adx (zwischen 20 nM und 100 nM) in der gleichen Größenordnung wie die in dieser Arbeit für die beiden bovinen Proteine präsentierten Daten (Brandt & Vickery, 1993). 1999 zeigte Ivanov (Ivanov *et al.*, 1999), dass der Adx-AdR Komplex weniger stabil als der Adx-CYP11A1 Komplex ist, was ebenfalls mit den Ergebnissen der Biacore Experimente übereinstimmt. Wurden die einzelnen Komplexbildungen zwischen Adx und AdR beziehungsweise CYP11A1 in Anwesenheit der Polyamine untersucht, traten jedoch relevante Änderungen auf. Alle Experimente wurden in einem mehr als 100-fachen Überschuss an NaCl (150 mM) durchgeführt, so dass unspezifische, allgemeine Ionenstärkeeffekte anderer Kationen (KCl, MgCl<sub>2</sub>, Putrescin, Spermidin und Spermin) auf die Komplexbildung der Proteine überlagert und damit ausgeschlossen werden können. Die hohe Konzentration an NaCl dient zur Pufferung der als Laufpuffer für die meisten Biacore Anwendungen empfohlenen HEPES-Lösung.

Die Effekte des einwertigen Salzes KCl (**Tabelle 3.3** und **3.4**) waren vergleichbar mit denen der Polyamine. Daher sind auch spezifische Bindestellen für K<sup>+</sup> Ionen wahrscheinlich, wie sie auch zuvor beim bakteriellen CYP101 beobachtet wurden. Im bakteriellen Protein konnte eine spezifische K<sup>+</sup> Bindestelle in der B-B' Schleife und der B'-Helix gefunden werden, die mit der Putidaredoxin Bindestelle überlappen. Die Bindung beider Effektoren, K<sup>+</sup> und Putidaredoxin, führt zu induzierten Störungen an dieser Stelle und bewirkt gegensätzliche spektrale Änderungen (OuYang *et al.*, 2006). Gegensätzliche spektralen Änderungen wurden auch bei CYP11A1 beobachtet, nämlich ein Typ I Spektrum nach Adx-induzierter Cholesterolbindung (Kido & Kimura, 1979) und RI Spektren nach Polyaminbindung (**Abbildung 3.1**). Ob die beobachteten Änderungen bei CYP101 und CYP11A1 in einem strukturellen Zusammenhang stehen, kann allerdings erst nach der Lösung der 3D-Struktur des CYP11A1 geklärt werden.

Im Gegensatz dazu störte das zweiwertige Ion Mg<sup>2+</sup> den Adx-AdR Komplex nicht wesentlich und zeigte relativ schwache Effekte auf den Adx-CYP11A1 Komplex. Sie waren somit eher mit den Ergebnissen der Kontrolle (Biacore HBS-EP Puffer ohne weitere Zugabe von Salz oder Polyamine) vergleichbar. Wie bereits zuvor erwähnt, sollten unspezifische Salzeffekte durch den Überschuss an Na<sup>+</sup>-Kationen überlagert werden.

Dagegen zeigen die Daten, aufgeführt in **Tabelle 3.3** und **3.4**, spezifische Effekte der Polyamine. Dabei sind die beobachteten Effekte abhängig von der chemischen Struktur, der Anzahl und der Verteilung der Ladungen der Polyamine und bei einer Ionenstärke von 1,0 mM stärker als bei  $I = 0,4$  mM.

So stärken die Polyamine die AdR-Adx Interaktion, schwächen aber den Adx-CYP11A1 Komplex und modulieren bevorzugt den Zugang zu den Bindestellen, was in einer Steigerung der Assoziationsraten beider Komplexe sichtbar wird. Bereits 1996 zeigten Schreiber und Fersht, dass sich die Assoziationsrate zweier Proteine mit der Ladung (und der Salzkonzentration) nach der Debye-Hückel Theorie verändert (Schreiber & Fersht, 1996). In einer Weiterentwicklung konnte gezeigt werden, dass die Assoziationsrate direkt von der Änderung der elektrostatischen Energie der Interaktion zwischen zwei Proteinen abhängt (Selzer & Schreiber, 1999). Weitere Bemühungen der Gruppe um G. Schreiber, die Assoziationsrate zu steigern, die Dissoziationsrate aber nicht zu ändern, und somit stabilere Komplexe zwischen der TEM1- $\beta$ -lactamase und ihres Inhibitors BLIP zu erhalten, wurden 2000 publiziert. Theoretische Berechnungen sagten eine große Bandbreite von zu erwartenden Änderungen des  $k_{on}$  durch Mutationen am BLIP Protein voraus. Eine über 20-fache Steigerung wurde für die D163K Mutante vorhergesagt. Diese Daten wurden experimentell mit Biacore und Stopped-Flow Messungen bestätigt. Während die Assoziation durch die Mutation stark anstieg, blieb die Dissoziationsrate weitestgehend unverändert und führte zu einem 250-fachen stabileren Komplex (Selzer *et al.*, 2000). Ähnliche Effekte durch die Adx Mutanten AdxD15K, AdxD15N, AdxD39K und AdxD39N in der Assoziation zwischen Adx und AdR werden im **Kapitel 4.2** noch einmal aufgegriffen. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Anwesenheit der Polyamine, die ihre positive Ladung über ihr gesamtes Molekül verteilen, einen Einfluss auf diese Bindungen hat, indem sie eine Mutation mit einer positiv geladenen Aminosäuren imitieren.

Allerdings liefert die Biosensorik keine Informationen darüber, ob die Polyamine den Elektronentransfer beeinflussen oder nicht. Um diese Frage zu beantworten, wurde eine detaillierte kinetische Untersuchung durchgeführt.

### 4.1.3 Polyamine beeinflussen den Elektronentransfer und die katalytische Aktivität

Das mitochondriale Steroidhydroxylierungssystem war Gegenstand zahlreicher unterschiedlicher kinetischer Studien. Interessanterweise wurde eine komplette kinetische Analyse aller in der CYP11A1 Elektronentransferkette vorkommenden Schritte erst vor wenigen

Jahren publiziert (Schiffler *et al.*, 2004). Bis heute wurden jedoch keine Daten veröffentlicht, die das kinetische Verhalten der Komponenten in Anwesenheit von kleinen Molekülen, wie den Polyaminen, und deren Einfluss auf die Elektronenübertragungsraten beschreiben. Die CYP11A1 katalysierte Reaktion führt zur Bildung von Pregnenolon, dem Vorläufermolekül aller Steroide. Da diese Reaktion als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Biosynthese der Steroidhormone angesehen wird, ist es von großem Interesse, die beiden bedeutenden Reduktionsprozesse, die in diesem System stattfinden, nämlich die Reduktion des Adx durch AdR<sub>red</sub> und daran anschließend die Reduktion des CYP11A1 durch Adx<sub>red</sub>, einzeln in Anwesenheit von Modulatoren zu untersuchen. Mit Hilfe der Stopped-Flow Technik wurde zuerst oxidiertes Adx mit reduzierter AdR und oxidiertes CYP11A1 mit präreduziertem Adx gemischt. Die hier erhaltenen Ergebnisse mit den Wildtyp Proteinen ohne Polyaminzusatz liegen im gleichen Rahmen wie die bereits publizierten (Schiffler *et al.*, 2004, Zöllner *et al.*, 2004, 2007). Vergleicht man nun in einem nächsten Schritt das Verhalten zwischen den oxidierten Proteinen (mittels Oberflächenplasmonresonanz) (**Tabelle 3.3** und **3.4**) mit der Bildung der funktionalen ox-red Komplexe, die einen Elektronentransfer zwischen ihnen ermöglichen (**Abbildung 3.14 F** und **3.16 F**; **Tabelle 3.5** und **3.6**), so sind die Effekte der Polyamine in beiden Versuchsreihen sehr ähnlich. Da der Adx-AdR Komplex bedingt durch die Polyamine reaktiver wird, werden die Elektronen schneller vom reduzierten AdR zum Adx übertragen. Im Gegensatz dazu geht eine Schwächung der Interaktion zwischen Adx und CYP11A1 mit einem abnehmenden Elektronentransfer von Adx zu CYP11A1 einher. In beiden Komplexen erfolgte die Modulation des Elektronentransfers in der Reihenfolge Putrescin < Spermidin < Spermin. Wie im folgenden Abschnitt erläutert wird, nimmt auch die Substratumwandlung mit steigender Konzentration der Polyamine ab. Mittels der Stopped-Flow Daten wird deutlich, dass die Produktbildung trotz eines schnelleren Elektronentransfers zwischen der AdR und dem Adx, nur von dem (abnehmenden) Elektronentransfer zwischen dem Adx und dem Cytochrom P450 abhängig ist. Diese Ergebnisse unterstützen frühere Studien, zum Beispiel mit zahlreichen Adx Mutanten (Grinberg *et al.*, 2000; Bureik *et al.*, 2005), die zeigen, dass die Interaktion und der Elektronentransfer zwischen AdR und Adx nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Die Interaktion und der Elektronentransfer zwischen Adx und CYP11A1 sind für die allgemeine katalytische Aktivität verantwortlich; der geschwindigkeitsbestimmende Schritt liegt aber nach dem ersten, messbaren Elektronentransfer (von sechs benötigten) zum Cytochrom P450 (Schiffler *et al.*, 2004).

Neben den von unserer Gruppe zur Kinetik publizierten Daten (Schiffler *et al.*, 2004, Zöllner *et al.*, 2004, 2007), ist die hier vorliegende Arbeit die einzige, die sich mit einer

detaillierten Studie der Kinetiken der mitochondrialen CYP11A1 Elektronentransferkette unter Einfluss physiologisch wichtiger Konzentrationen von körpereigenen Polyaminen beschäftigt.

### **4.1.4 Effekte der Polyamine auf die Fähigkeit des CYP11A1-Systems zur Substratumwandlung**

Die Untersuchung der Wirkung von Spermidin und Spermin war experimentell gesehen anspruchsvoll, da diese Polyamine mit steigender Konzentration den Puffer pH beeinflussten. Der Reaktionspuffer bestand aus 50 mM HEPES mit einem anfänglichen pH-Wert von 7,3 beziehungsweise pH 8,0 und 0,05% Tween20, und der End-pH jedes Puffers wurde nach der jeweiligen Zugabe des Polyamins überprüft. Obwohl es bei der Zugabe von bis zu 10 mM Putrescin zu keiner pH-Änderung im Puffer kam, gab es mit steigender Spermidin/Spermin Konzentration einen pH-Anstieg in dem Reaktionsgemisch. Diese Änderungen mussten bei der Untersuchung der Wirkung der Polyamine auf die CYP11A1 Aktivität berücksichtigt werden. Im Gegensatz zu Putrescin inhibierten beide, Spermidin und Spermin, die CYP11A1-abhängige Pregnenolonbildung bei pH 7,3 und pH 8,0 und einer Adx Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  (**Abbildung 3.5**). Im Vergleich zur Aktivität ohne Zusatz von Polyamin ging die Aktivität auf etwa 25% (Spermidin) beziehungsweise auf 15% (Spermin, pH 8,0) zurück. Bei einer Adx Konzentration von 5,0  $\mu\text{M}$  konnte eine weniger ausgeprägte Abnahme beobachtet werden (**Abbildung 3.6**). Mit steigender Anzahl der Adx-Moleküle, die mit den Protein-Protein Interfaces interagieren, sinkt der inhibitorische Effekt, was auf eine vermehrte Konkurrenz mit den Polyaminen um die Bindungsstellen hinweist. In den Rekonstitutionsassays zeigte sich mit Spermidin und Spermin sowohl bei pH 7,3 als auch bei pH 8,0 eine Inhibierung der Cholesterolumwandlung zu Pregnenolon. Mit Putrescin wurde bei pH 7,3 keine (**Abbildung 3.4 A**) und bei dem physiologischen pH 8,0 ein Rückgang auf 50% sichtbar (**Abbildung 3.4 B**). Dabei gab es keinen Unterschied zwischen der Polyaminkonzentration, oder der Anzahl der Adx-Moleküle. Dies deutet darauf hin, dass unter physiologischen Bedingungen auch das kleinste der hier untersuchten Polyamine einen Effekt auf die Substratumwandlung ausübt.

### **4.1.5 Putative Bindungsstellen der Polyamine an den Proteinen**

Wie bereits erwähnt, wurden alle Docking-Experimente von Frau Susanne Eyrisch aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. V. Helms, Universität des Saarlandes, Saarbücken durchgeführt. Ein Re-docking der Polyamine, durchgeführt an fünf ausgewählten Co-

Kristallstrukturen von polyaminbindenden Proteinen (Berman *et al.*, 2000), führte zu folgenden Daten (**Tabelle 4.1**).

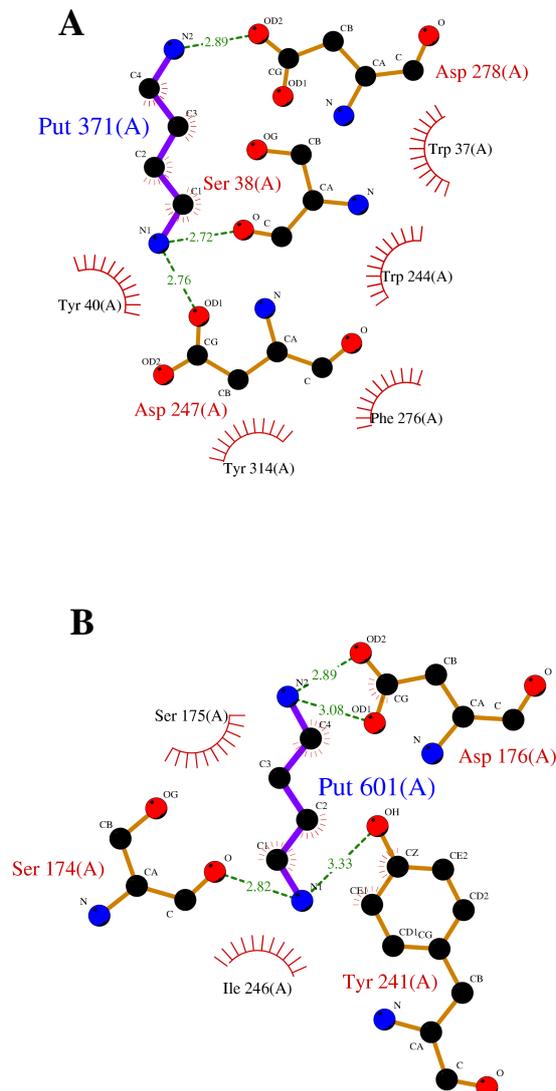
**Tabelle 4.1: Die ausgewählten Co-Kristallstrukturen und ihre Re-docking Ergebnisse.**

Die letzte Spalte beinhaltet die „Root mean square difference“ (RMSD) zwischen dem Liganden koordiniert in ihrer re-dockten Orientierung und ihrer Ausrichtung in der Kristallstruktur

PDB Eintrag	Beschreibung	Re-docking Score [kcal/mol]	RMSD [Å]
1a99	Putrescin bindet an das <i>E. coli</i> Putrescin Bindeprotein.	-7,66	0,30
2o06	Putrescin bindet an die Humane Spermidinsynthase.	-9,16	1,20
1pot	Spermidin bindet an das <i>E. coli</i> Spermidin Bindeprotein.	-13,96	0,30
2o07	Spermidin bindet an die Humane Spermidinsynthase.	-13,96	0,90
2c12	Spermin bindet als schwacher, kompetitiver Inhibitor an die Nitroalkan Oxidase.	-9,43	1,60

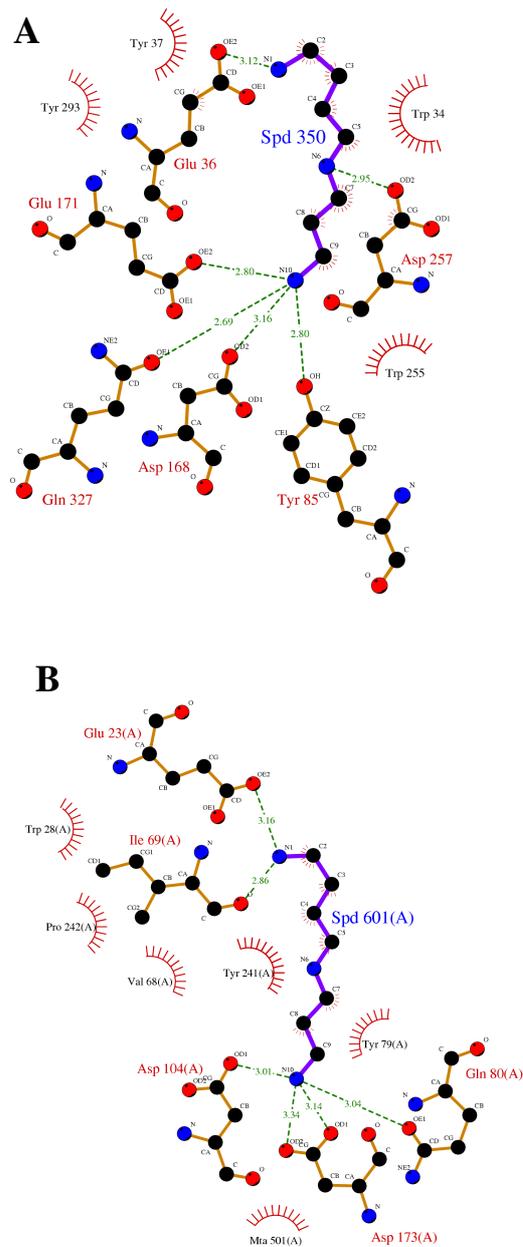
Vergleicht man die Ergebnisse der Bindung der Polyamine an bekannte und physiologisch relevante Bindungspartner, so liegen die Ergebnisse des für diese Untersuchungen durchgeführten Dockings der unterschiedlichen Polyamine an das Adx, die AdR und den Adx-AdR Komplex (**Tabelle 3.7** und **3.8**) in der gleichen Größenordnung und können somit als realistische Werte betrachtet werden. Tatsächlich konnten Stellen mit hoher Bindungsaffinität für die Polyamine vorgeschlagen werden, die aufgrund ihrer Lage sehr dazu geeignet sind, die experimentell erhaltenen Adx-AdR Bindungsdaten zu erklären. Bindungen an das CYP11A1 konnten nicht durchgeführt und berücksichtigt werden, da die Kristallstrukturen dieses Proteins und seines Komplexes mit Adx bis jetzt noch nicht vorliegen.

In seinen natürlichen Bindungstaschen bildet Putrescin drei bis vier Wasserstoffbrückenbindungen, zwei von denen zu negativ geladenen Aminosäuren, aus (**Abbildung 4.4**).



**Abb. 4.4:** Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen durch Putrescin in seinen natürlichen Bindungstaschen; Dockingbild erstellt von S. Eyrisch, Zentrum für Bioinformatik, Universität des Saarlandes. **(A)** Putrescin bindet an das E. coli Putrescin Bindeprotein (PDB Eintrag 1a99). **(B)** Putrescin bindet an die Humane Putrescin Spermidin Synthase (PDB Eintrag 2o06).

In diesem Zusammenhang ist die für Putrescin vorgeschlagene Bindung zu negativ geladenen Aminosäuren sowohl an Adx als auch an AdR sehr schlüssig. Es scheint, dass Putrescin bevorzugt an das Komplexinterface bindet und somit als ein Aktivator der Adx – AdR Interaktion agieren könnte. Ähnlich wie Putrescin bildet Spermidin in seiner natürlichen Bindungstasche sechs Wasserstoffbrückenbindungen, vier zu negativ geladenen Aminosäuren, aus (**Abbildung 4.5**). Dabei nehmen alle Aminogruppen an der Bindung teil.



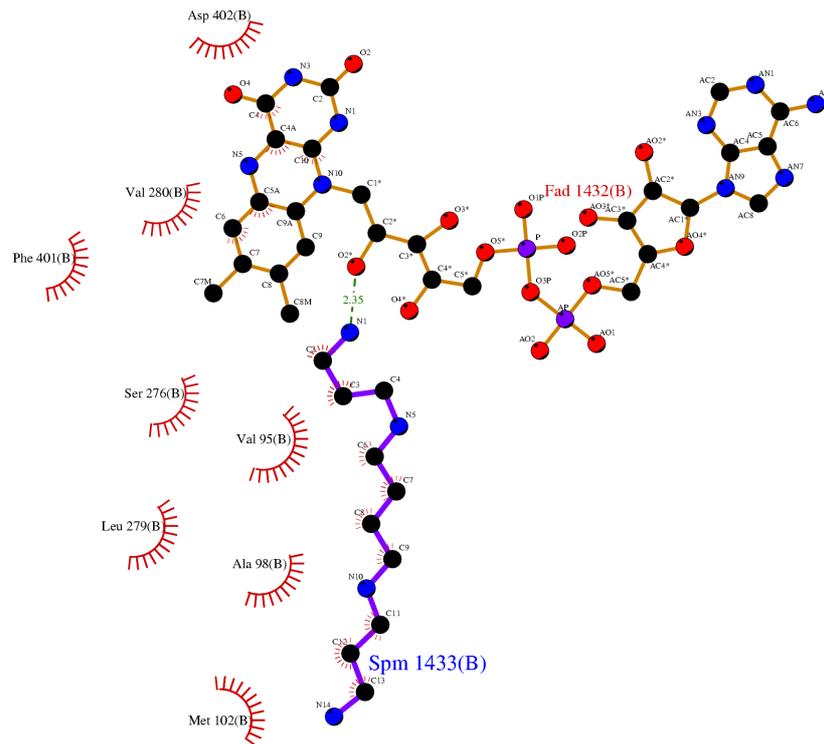
**Abb. 4.5:** Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen durch Spermidin in seinen natürlichen Bindungstaschen; Dockingbild erstellt von S. Eyrisch, Zentrum für Bioinformatik, Universität des Saarlandes. (A) Spermidin bindet an das E. coli Spermidin Bindeprotein (PDB Eintrag 1pot). (B) Spermidin bindet an die Spermidine Synthase (PDB Eintrag 2o07).

Die in den Dockingexperimente vorgeschlagene Bindung der Polyamine an Adx und AdR kann in gleicher Koordination an den re-dockten Co-Kristallstrukturen beobachtet werden. Spermidin und Spermin scheinen bevorzugt an das AdR Interface von ungebundenem Adx (Asp15, Asp39, Asp41) zu binden und somit die Komplexbildung zu fördern. Strukturanalysen

zeigten, dass diese Region als sekundäre Bindestelle für die AdR fungiert (Müller *et al.*, 2001). Somit führen Spermidin und Spermin noch mehr als Putrescin zu einer schnelleren Reduzierung des Adx (Hara & Kimura 1989 b; Hara & Miyata, 1991; Müller *et al.*, 2001).

Während Putrescin an das Adx/AdR Komplexinterface (Bindestelle Nr.3, **Tabelle 3.8**) bindet und dadurch die Interaktion zwischen den beiden Proteinen fördert, docken Spermidin und Spermin bevorzugt an die Region Asp-15, Asp-39, Asp-41 des ungebundenen Adx (Bindestelle Nr.1, **Tabelle 3.8**). Im Durchschnitt liegen die Ergebnisse für Spermin (um  $-11$  kcal/mol) etwa 2 kcal/mol unter denen von Spermidin (um  $-9$  kcal/mol) (**Tabelle 3.8**). Daher scheint das Resultat für Spermin (**Tabelle 3.8**) zum Vergleichen ungeeignet, da die Ergebnisse des Re-dockings (**Tabelle 4.1**) für Spermidin ( $-13,96$  kcal/mol) bedeutend besser sind als für Spermin ( $-9,43$  kcal/mol). Vergleicht man die Re-dockingergebnisse (**Tabelle 4.1**) mit denen, die in **Tabelle 3.7** gezeigt werden, so wird deutlich, dass die Scores für das Docking in die MD Snapshots und in die Co-Kristallstrukturen von vergleichbarer Größe sind. Besonders für das Docking von Spermidin in die Kristallstrukturen von Adx, AdR und Adx-AdR sind die Scores mit Werten von  $-10,06$  kcal/mol,  $-8,80$  kcal/mol beziehungsweise  $-9,83$  kcal/mol allerdings weniger günstig als die aus dem Re-docking ( $-13,96$  kcal/mol). Dies deutet darauf hin, dass die induced-fit Effekte eine zusätzliche Stabilisierung von 2-3 kcal/Mol erzielen, aber auch dass die konformative Flexibilität, die in molekulardynamischen (MD) Simulationen bei Raumtemperatur erhalten wurde, ausreicht, um Bindungstaschen zu erzeugen, die vergleichbare Bindungsaffinitäten wie diejenigen Proteine besitzen, von denen bekannt ist, dass sie Polyamine binden (Eyrich & Helms, 2007). Dass die Dockingergebnisse an Adx und AdR weniger günstig als die Re-dockingergebnisse sind, weist wiederum auf die Bedeutung von induced-fit Effekten für die Spermidinbindung hin. Spermin bindet an die Nitroalkanoxidase (**Abbildung 4.6**) indem sich nur eine einzige Wasserstoffbrücke zwischen Protein und Ligand ausbildet.

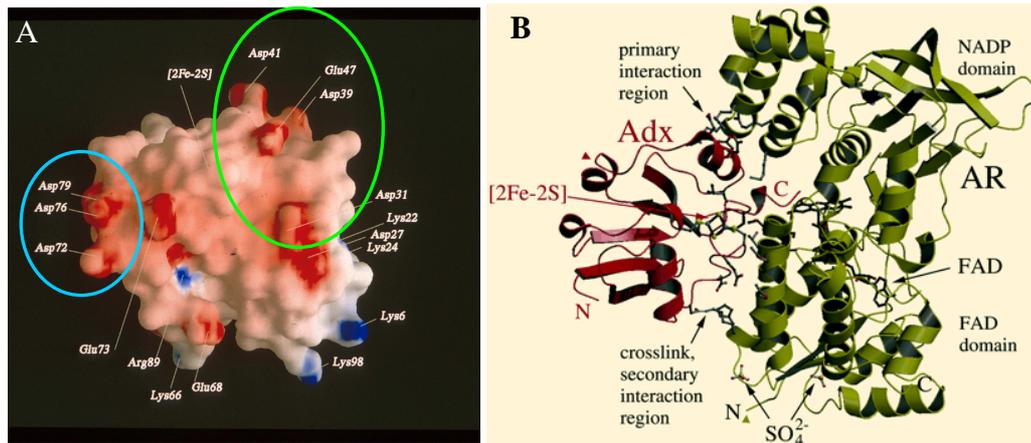
Dies erlaubt jedoch keine Schlussfolgerungen auf die natürliche Bindungsart des Spermins. Dennoch beweist dies, dass die Polyamine an das FAD binden und somit die Funktion der Oxidoreduktase inhibieren können. Dies unterstützt die Zuordnung der vermeintlichen Bindungsseite 2, bei der Putrescin an das FAD bindet. Somit zeigen die Dockingergebnisse deutlich, dass es für die Polyamine möglich ist, die sich abstoßenden Ladungen zwischen Adx und AdR zu überwinden.



**Abb. 4.6:** Spermin bindet als ein schwacher, kompetitiver Inhibitor an die Nitroalkanoxygenase (PDB Eintrag 2c12); Dockingbild erstellt von S. Eyrisch, Zentrum für Bioinformatik, Universität des Saarlandes.

#### 4.2 Einfluss der Polyamine auf die sekundäre Interaktionsdomäne des Adx

Wie im letzten Abschnitt bereits erwähnt, zeigten die Dockingergebnisse, dass die Region um die Aminosäuren Asp-15, Asp-39 und Asp-41 am Adx eine bevorzugte Bindestelle der Polyamine ist. Die bisherige Analyse der Kristallstruktur postulierte diese Stelle als die sekundäre Interaktionsdomäne des Adx zur AdR (Müller *et al.*, 2001) (**Abbildung 4.7**). Daher wurde im zweiten Teil dieser Arbeit eine detaillierte biochemische Untersuchung der Interaktion zwischen Adx und AdR an dieser Stelle durchgeführt.



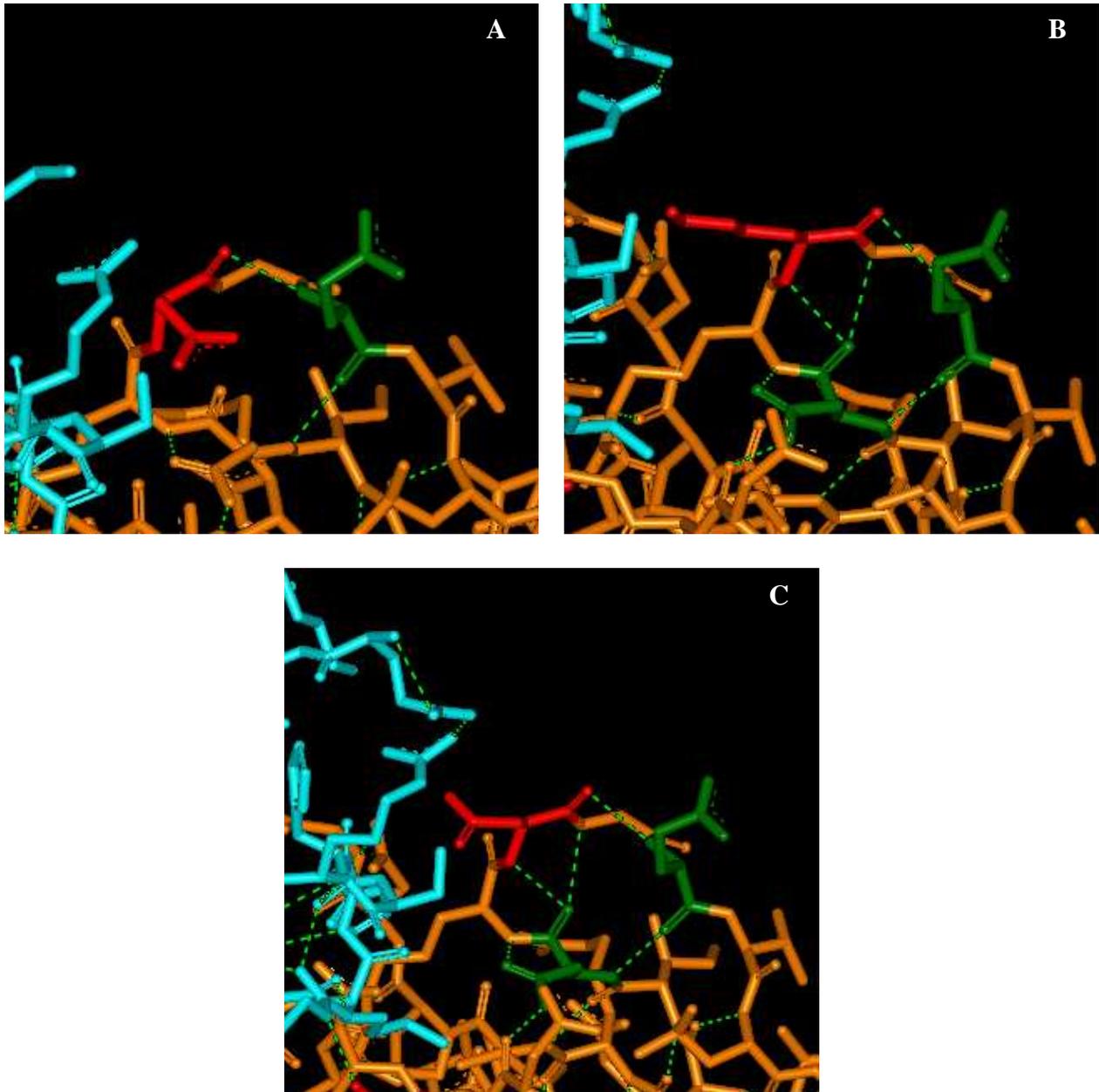
**Abb. 4.7:**

**(A) Molekulare Darstellung der Oberfläche von Adx(4-108) (Müller *et al.*, 1998):** Gefärbt wurde nach dem elektrostatischen Potential (negatives in rot, positives in blau). Die geladenen Aminosäurereste sind benannt. Der Eisen-Schwefel-Cluster [2Fe-2S] liegt in einer Vertiefung (oberer Teil der Figur). Hellblau eingekreist ist die azide Region um Asp-76, welche als primäre Interaktionsdomäne gilt (Müller *et al.*, 2001). Grün eingekreist ist die sogenannte sekundäre Interaktionsdomäne oder crosslinking Domäne.

**(B) Kristallstruktur des Adx-AdR Komplexes:** Gezeigt werden die Kontaktstellen zwischen Adx und AdR sowie die primäre und die sekundäre Interaktionsdomäne. Die daran beteiligten Aminosäuren sind als Stabmodell dargestellt. Abbildung aus Müller *et al.*, 2001.

Dazu wurden vier Adrenodoxin Mutanten (AdxD15K, AdxD15N, AdxD39K und AdxD39N) hergestellt, die die frühere negative Ladung des Asp (D) entweder durch eine neutrale Asn (N), oder eine positive Lys (K) ersetzten. Durch diese Mutanten in der sekundären Interaktionsdomäne des Adx wurde somit nicht nur die physiologische Bedeutung dieser Region zum ersten Mal, sondern auch der Einfluss der Polyamine auf eine bestimmte Stelle des Adx untersucht. Obwohl beide untersuchten Aminosäuren an der Oberfläche liegen, musste zunächst geklärt werden, ob die eingeführten Substitutionen Auswirkungen auf die Struktur oder das Redoxpotential des Adrenodoxin hatten. Weder die UV/Vis (**Abbildung 3.18**) noch die CD-Spektren (**Abbildung 3.19** und **3.20**) zeigten eine Veränderung der Sekundärstruktur bzw. der Region um den Eisen-Schwefel Cluster. Auch die Redoxpotentiale der Mutanten lagen im Bereich des Wildtypes (Adx WT  $269 \pm 4$  mV, AdxD15K  $-272 \pm 3$  mV, AdxD15N  $-266 \pm 5$  mV, AdxD39K  $-260 \pm 12$  mV, AdxD39N  $-271 \pm 5$  mV). Einzig eine erhöhte thermische Stabilität der Mutanten wurde sichtbar (**Tabelle 3.9**). Dieses Ergebnis war überraschend, da Asp-15 und Asp-39 an der Oberfläche liegen und nicht zu erwarten war, dass sie in der Stabilisierung der Proteinstruktur eine Rolle spielen. Betrachtet man die Ladungsverteilung des Adx(4-108) in der sekundären Interaktionsdomäne (grün eingekreist, **Abbildung 4.7 A**), so wird deutlich, dass die eingeführten Mutanten in einer stark negativ geladenen Region liegen, so dass es wahrscheinlich ist, dass die Abstoßung der negativ geladenen Seitenketten durch einzelne Ladungsveränderung

abgepuffert wird. Die erhöhte thermische Stabilität könnte zumindest bei den AdxD15 Mutanten mit der Ausbildung neuer Wasserstoffbrücken innerhalb des Adx erklärt werden (**Abbildung 4.8**).

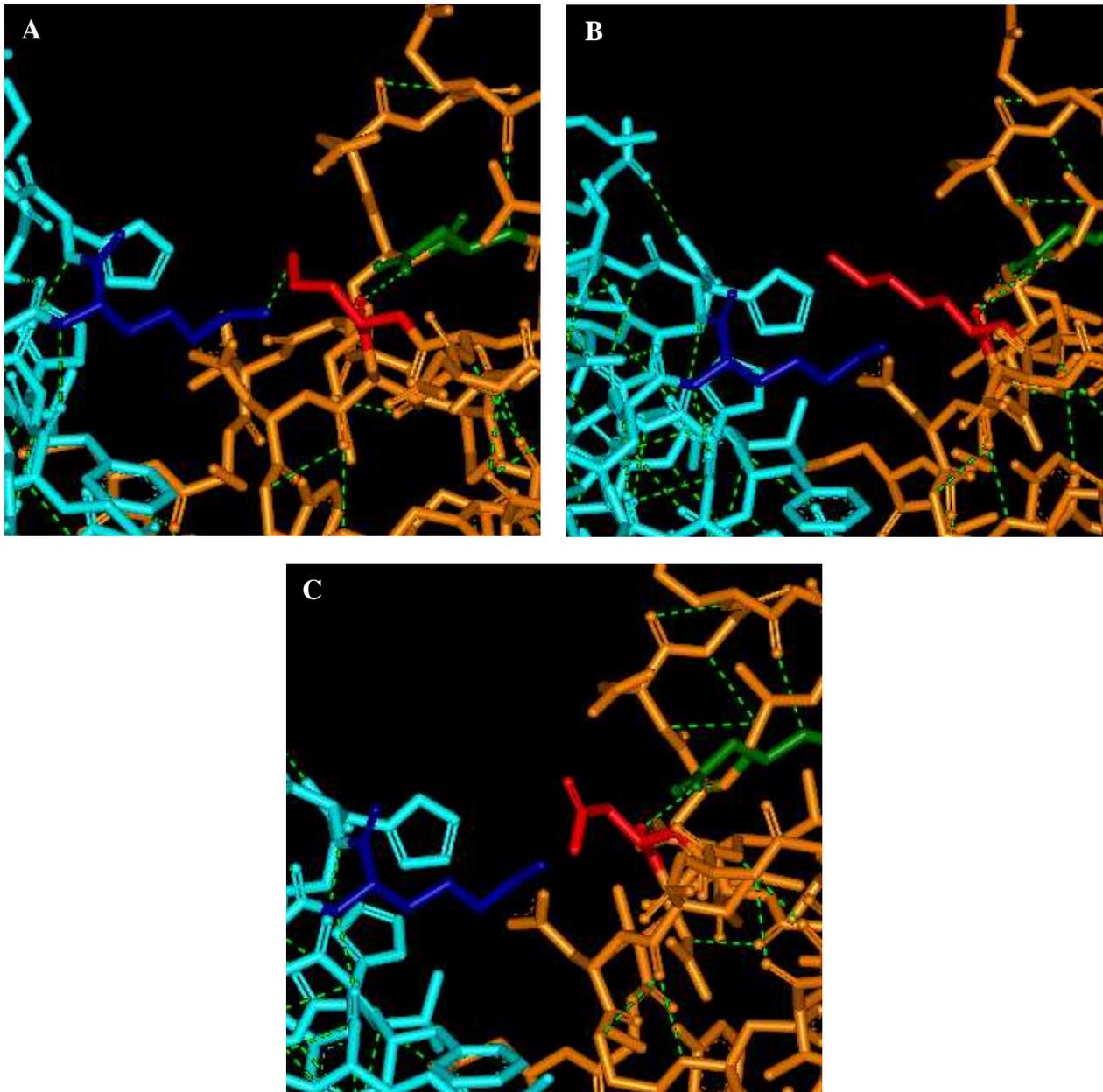


**Abb. 4.8: Wasserstoffbrücken, die von Asp-15 des Adx ausgebildet werden.**

Die Wasserstoffbrücken die von Asp-15 des AdxWT und nach der Mutation zu AdxD15K bzw. AdxD15N ausgebildet werden, wurden mit der Wasserstoffbrücken Subroutine des Programms MSViewerLite 4.2 der Firma Accelrys erstellt. **A)** Asp-15 (rotes Stab-Modell) bildet eine Wasserstoffbrücke (grün gestrichelt) zu Glu-17 (grünes Stab-Modell) des Adx (orange gefärbt) und keine zu AdR (blau gefärbt). **B)** AdxD15K (rotes Stab-Modell) bildet Wasserstoffbrücken (grün gestrichelt) zu Asn-13 (grünes Stab-Modell) und Glu-17 (grünes Stab-Modell) des Adx (orange gefärbt) und keine zu AdR (blau gefärbt) aus. **C)** AdxD15N (rotes Stab-Modell) bildet Wasserstoffbrücken (grün gestrichelt) zu Asn-13 (grünes Stab-Modell) und Glu-17 (grünes Stab-Modell) des Adx (orange gefärbt) und keine zu AdR (blau gefärbt) aus.

Die AdxD15 bildet genau eine Wasserstoffbrücke zur Aminosäure Glu-17 des Adx aus, während sowohl die AdxD15K als auch die AdxD15N Mutanten laut Modell eine weitere Wasserstoffbrücken zur Adx Aminosäure an der Position 13 (Asn-13) ausbilden (**Abbildung 4.8**).

So lässt sich die erhöhte thermische Stabilität der AdxD39 nicht erklären. Wie in der **Abbildung 4.9** gezeigt wird, bilden beiden Mutanten AdxD39K und AdxD39N die Wasserstoffbrücke zwischen Asp-39 (OH) und Lys-27 (NH), die im AdR-AdxWT Komplex vorhanden ist, nicht mehr aus. Jedoch können die mutierten Aminosäuren Verschiebungen in ihrer Umgebung zur Folge haben. Diese leichten strukturellen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp könnten zur Ausbildung einer neuen Salzbrücke, oder zur Neuordnung von Wasserstoffbrücken führen. Dies könnte auch eine mögliche Erklärung für die beobachteten Unterschiede zwischen den Mutanten sein. Jedoch ist die beobachtete Steigerung der thermischen Stabilität bis jetzt noch nicht eindeutig erklärbar. Bestätigt wurde diese erhöhte Stabilität mit der thermischen Denaturierung von AdxWT unter den gleichen Bedingungen nur in zusätzlicher Anwesenheit von  $I = 1,0 \text{ mM}$  KCl und Polyaminen. Auch in dieser Messreihe führte der Zusatz von positiver Ladung zu einer um bis zu  $4^\circ\text{C}$  höheren Schmelztemperatur im Vergleich zum Protein in Puffer. Erst eine Kristallisierung dieser Mutanten könnte helfen, darauf eine eindeutige Antwort zu finden.



**Abb. 4.9: Wasserstoffbrücken, die von Asp-39 des Adx ausgebildet werden.**

Die Wasserstoffbrücken an denen Asp-39 des AdxWT und die entsprechenden Reste nach den Mutationen AdxD39K bzw. AdxD39N beteiligt sind, wurden mit der Wasserstoffbrücken Subroutine des Programms MSViewerLite 4.2 der Firma Accelrys erstellt. **A)** Asp-39 (rotes Stab-Modell) bildet eine Wasserstoffbrücke (grün gestrichelt) zu Asn-13 (grünes Stab-Modell) des Adx (orange gefärbt) und eine zu Lys-27 (dunkelblaues Stab-Modell) der AdR (blau gefärbt). **B)** AdxD39K (rotes Stab-Modell) bildet eine Wasserstoffbrücke (grün gestrichelt) zu Asn-13 (grünes Stab-Modell) des Adx (orange gefärbt). Die Wasserstoffbrücke zu Lys-27 (dunkelblaues Stab-Modell) der AdR (blau gefärbt) fehlt. **C)** AdxD39N (rotes Stab-Modell) bildet eine Wasserstoffbrücke (grün gestrichelt) zu Asn-13 (grünes Stab-Modell) des Adx (orange gefärbt). Die Wasserstoffbrücke zu Lys-27 (dunkelblaues Stab-Modell) der AdR (blau gefärbt) fehlt.

Chemische Modifikation und Dockingstudien zeigten deutlich, dass die Aminosäuren Asp-72, Glu-73, Asp-76 und Asp-79 (Müller *et al.*, 1999) eine wichtige Rolle in der Interaktion zur AdR spielten. Zusätzlich wurde an Hand eines Crosslinks in der Kristallstruktur des Adx-AdR Komplexes postuliert, dass auch die Aminosäuren Asp-39 und Asp-41 für die Interaktion zwischen Adx und AdR von Bedeutung sind (Müller *et al.*, 2001). Die von Frau Susanne Eyrich durchgeführten Docking Untersuchungen beschreiben diese Region (Asp-15, Asp-39 und Asp-41) als einzige bevorzugte Binderegion für die Polyamine am ungebundenen Adrenodoxin. Durch Einführen von neutralen bzw. positiven Ladungen sollte überprüft werden, ob die zusätzlichen positiven Ladungen der Salze und Polyamine zu auffälligen Änderungen in den Dockingkinetiken des Adx zu seinem Redoxpartner *in vitro* führen.

Um diese Vermutung experimentell zu belegen, wurde wie zuvor bei der Untersuchung der Wechselwirkung von Adx<sup>WT</sup> mit beiden Redoxpartner zur Charakterisierung der Interaktionen zwischen den oxidierten Adx-Mutanten und AdR<sub>ox</sub> die Oberflächenplasmonresonanz mit einem Biacore3000 angewendet.

Betrachtet man die AdR-Adx Bindung, so ergibt sich durch die Mutationen ein ähnliches Bild wie für den Wildtypen in Anwesenheit der Polyamin. Im Vergleich zum Wildtyp stabilisieren die Mutanten den Adx-AdR Komplex (AdxD15N, 2,4-fach; AdxD39K, 5-fach; AdxD15K, 8,3-fach; AdxD39N 18-fach). Auch hier zeigten die Polyamine eine Stabilisierung (**Tabelle 3.3** und **3.4**).

Da es sich bei dieser Region um die sekundäre Interaktionsdomäne des Adx an die AdR handelt, wurde zur Kontrolle der erhaltenen Bindungsdaten, AdR an den Chip gekoppelt und Lösungen der fünf verschiedenen Adx Spezies als Liganden über den Reduktase-Chip geleitet. Auch in diesem Experiment bilden die Mutanten bis zu 6-fach stabilere Komplexe (AdxD15N) mit der Reduktase als der WT (**Tabelle 4.2**).

**Tabelle 4.2: Vergleich der SPR-Analysen der Interaktion zwischen Adx<sub>ox</sub> (WT oder Mutanten) mit AdR<sub>ox</sub> und AdR<sub>ox</sub> mit Adx<sub>ox</sub> (WT oder Mutanten)**

Das Bindungsverhalten von AdR (Konzentration des Analyten zwischen 100 - 500 nM) an AdxWT und den Adx-Mutanten AdxD15K, AdxD15N, AdxD39K und AdxD39N, die zuvor auf einen CM5 Chip (~300 RU) immobilisiert wurden, wurde in Biacore HBS-EP Puffer (0,01 M HEPES Puffer, pH 7,4, 0,15 M NaCl mit 0,005% Surfactant P20) bei 25°C untersucht. Zum Vergleich dazu wurde AdR<sub>ox</sub> mittels der gleichen Prozedur auf den Chip gekoppelt und die unterschiedlichen Adx-Spezies (400 und 500 nM) als Analyten gebunden. Die Bindungskurven der Interaktionen wurden mit dem Biacore Evaluierungsprogramm 4.1 als ein 1:1 Bindungsmodell analysiert. Standardabweichungen (n ≥ 4) zu den gezeigten Werten waren innerhalb ± 10 %.

	Adx – AdR			AdR-Adx		
	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D (k_{off}/k_{on})$	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D (k_{off}/k_{on})$
	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]
AdxWT	3,81 · 10 <sup>3</sup>	2,86 · 10 <sup>-3</sup>	7,50 · 10 <sup>-7</sup>	5,37 10 <sup>3</sup>	3,71 10 <sup>-4</sup>	6,91 10 <sup>-8</sup>
AdxD15K	1,97 10 <sup>4</sup>	1,83 10 <sup>-3</sup>	9,29 10 <sup>-8</sup>	1,37 10 <sup>4</sup>	1,89 10 <sup>-4</sup>	1,38 10 <sup>-8</sup>
AdxD15N	1,10 10 <sup>4</sup>	3,46 10 <sup>-3</sup>	3,15 10 <sup>-7</sup>	1,50 10 <sup>4</sup>	1,69 10 <sup>-4</sup>	1,13 10 <sup>-8</sup>
AdxD39K	2,64 10 <sup>4</sup>	3,95 10 <sup>-3</sup>	1,50 10 <sup>-7</sup>	7,24 10 <sup>3</sup>	1,88 10 <sup>-4</sup>	2,60 10 <sup>-8</sup>
AdxD39N	2,07 10 <sup>4</sup>	8,50 10 <sup>-4</sup>	4,11 10 <sup>-8</sup>	8,93 10 <sup>3</sup>	2,93 10 <sup>-4</sup>	3,28 10 <sup>-8</sup>

Unterschiedliche Kopplungsorientierung, also AdR an Adx bzw. Adx an AdR, liefert in beiden Fällen tendenziell ähnliche Ergebnisse. Zwar ist der  $K_D$  (AdR-Adx) sowohl beim Wildtyp als auch bei den Mutanten eine Größenordnung kleiner als der jeweilige  $K_D$  (Adx-AdR), dennoch sind sowohl die Mutanten-AdR Komplexe als auch die AdR-Mutanten Komplexe deutlich stabiler als der AdxWT-AdR bzw. AdR-AdxWT Komplex.

Ein ganz anderes Bild für die Komplexbildung zeigt sich, wenn folgender experimenteller Ansatz gewählt wurde. Betrachtet man die Stabilisierung des Adx-AdR Komplexes durch die Mutanten und zusätzliche positive Ladungen, immer bezogen auf den AdxWT-AdR Komplex in Puffer ( $K_D$  1,00), so zeigt sich, dass im Falle der Adx Mutanten AdxD15K und AdxD39N zusätzliche positive Ladung die Bindung zur AdR verschlechtern (**Tabelle 4.3**). Dies wird besonders deutlich, wenn man berücksichtigt, dass zur Vermeidung von Ionenstärkeeffekte der Salze und Polyamine, diese Untersuchungen nicht bei unterschiedlichen Konzentrationen an Salzen und Polyaminen, sondern bei zwei festen Ionenstärken (I) durchgeführt wurden.

**Tabelle 4.3: Relative Dissoziationskonstante für den Adx-AdR Komplex gemessen für Adx Wildtyp und Mutanten in Ab- und Anwesenheit von Salzen und Polyaminen.**

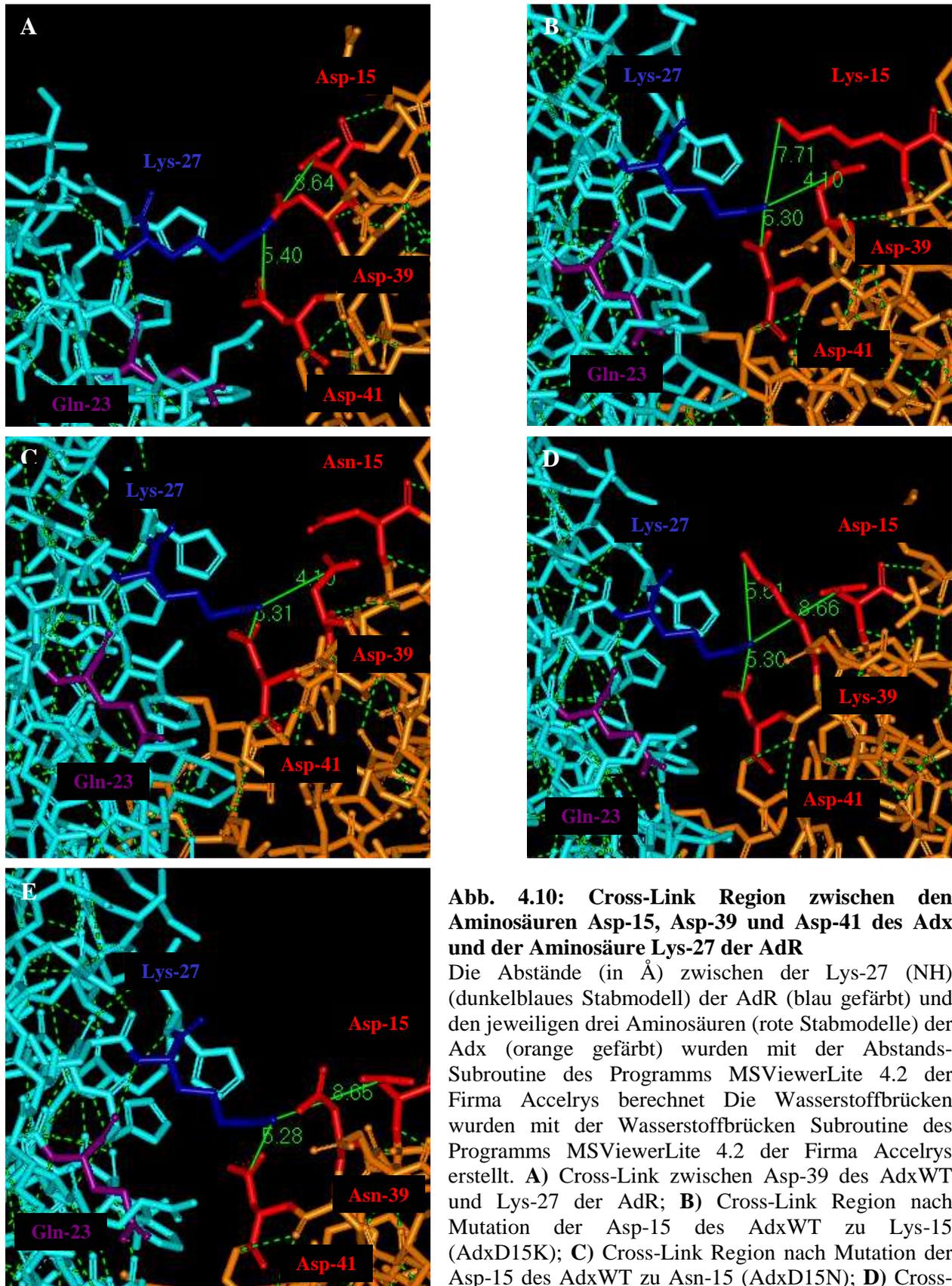
	$K_D$
AdxWT	1,00
AdxWT, I = 0,4 mM KCl	0,09
AdxWT, I = 1,0 mM KCl	0,20
AdxWT, I = 0,4 mM Put	0,04
AdxWT, I = 1,0 mM Put	0,22
AdxWT, I = 0,4 mM Spd	2,77
AdxWT, I = 1,0 mM Spd	0,23
AdxWT, I = 0,4 mM Spn	0,08
AdxWT, I = 1,0 mM Spn	0,44
<b>AdxD15K</b>	
AdxD15K	0,12
AdxD15K, I = 0,4 mM KCl	0,36
AdxD15K, I = 1,0 mM KCl	0,18
AdxD15K, I = 0,4 mM Put	0,20
AdxD15K, I = 1,0 mM Put	0,15
AdxD15K, I = 0,4 mM Spd	0,45
AdxD15K, I = 1,0 mM Spd	0,25
AdxD15K, I = 0,4 mM Spn	0,32
AdxD15K, I = 1,0 mM Spn	0,52
<b>AdxD15N</b>	
AdxD15N	0,42
AdxD15N, I = 0,4 mM KCl	0,26
AdxD15N, I = 1,0 mM KCl	0,23
AdxD15N, I = 0,4 mM Put	0,48
AdxD15N, I = 1,0 mM Put	0,18
AdxD15N, I = 0,4 mM Spd	0,64
AdxD15N, I = 1,0 mM Spd	0,81
AdxD15N, I = 0,4 mM Spn	0,40
AdxD15N, I = 1,0 mM Spn	0,62
<b>AdxD39K</b>	
AdxD39K	0,20
AdxD39K, I = 0,4 mM KCl	0,05
AdxD39K, I = 1,0 mM KCl	0,07
AdxD39K, I = 0,4 mM Put	0,07
AdxD39K, I = 1,0 mM Put	0,06
AdxD39K, I = 0,4 mM Spd	0,08
AdxD39K, I = 1,0 mM Spd	0,10
AdxD39K, I = 0,4 mM Spn	0,24
AdxD39K, I = 1,0 mM Spn	0,24
<b>AdxD39N</b>	
AdxD39N	0,06
AdxD39N, I = 0,4 mM KCl	0,05
AdxD39N, I = 1,0 mM KCl	0,05
AdxD39N, I = 0,4 mM Put	0,18
AdxD39N, I = 1,0 mM Put	0,10
AdxD39N, I = 0,4 mM Spd	0,14
AdxD39N, I = 1,0 mM Spd	0,26
AdxD39N, I = 0,4 mM Spn	0,55
AdxD39N, I = 1,0m M Spn	0,21

Trotzdem sind alle Komplexe in Anwesenheit von Salz und Polyaminen stabiler als mit AdxWT. Interessanterweise festigen sowohl bei der AdxD15N als auch bei der AdxD39K die niedrig geladenen Ionen (KCl und Putrescin bei AdxD15N, KCl bis Spermidin bei AdxD39K) den Komplex um das vierfache, und führen im Vergleich zum AdxWT-AdR Komplex zu einer Stabilisierung um das 20-fache. Allerdings ist dieser Effekt der Ionen für die Mutanten nicht einheitlich, so dass eine eindeutige Aussage des Einflusses zu diesem Zeitpunkt nicht möglich ist. Die bevorzugte Bindetasche für KCl und die Polyamine an das Adx steht nach der Mutation nicht mehr zur Verfügung. Die Bindung der Polyamine erfolgt daher nicht mehr bevorzugt oder gar nicht mehr an dieser Region. Die Effekte von KCl und Polyaminen auf die Mutanten sind damit deutlich geringer und auf andere Bindephänomene zurückzuführen.

Betrachtet man die Lage und die Ladung der Mutationen, so wird deutlich, dass der Einfluss der Polyamine in den meisten Fällen an der Position 39 stärker ist, als an der Position 15. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Adx Aminosäure Asp-39 direkt der Aminosäure Lys-27 der AdR gegenüberliegt.

Durch die Einführung der Mutationen an dieser Stelle müssten sich die positiven Ladungen deutlich mehr abstoßen als die positive mit der neutralen Ladung. Dies ist nicht der Fall. In allen Fällen ist AdxD39N instabiler als AdxD39K.

Betrachtet man sich die Cross-Link Region nach der jeweiligen Mutation (**Abbildung 4.10**), so zeigt sich, dass auch nach Lösung des Cross-Links (Lys-27 der AdR mit Asp-39 des Adx), die Abstände zwischen dem Lys-27 (NH) und den jeweils geladenen Aminosäuren sich immer, in einem Bereich zwischen 4 (Position 39 des Adx) bis 8 Å (Position 15 des Adx) bewegt. Dies ist unabhängig von der eingeführten Mutation. Somit kann weder über die Position der neu eingeführten positiven Ladung, noch über die Größe der Aminosäure dieses unerwartete Verhalten erklärt werden.



**Abb. 4.10: Cross-Link Region zwischen den Aminosäuren Asp-15, Asp-39 und Asp-41 des Adx und der Aminosäure Lys-27 der AdR**

Die Abstände (in Å) zwischen der Lys-27 (NH) (dunkelblaues Stabmodell) der AdR (blau gefärbt) und den jeweiligen drei Aminosäuren (rote Stabmodelle) der Adx (orange gefärbt) wurden mit der Abstand-Subroutine des Programms MSViewerLite 4.2 der Firma Accelrys berechnet. Die Wasserstoffbrücken wurden mit der Wasserstoffbrücken Subroutine des Programms MSViewerLite 4.2 der Firma Accelrys erstellt.

**A)** Cross-Link zwischen Asp-39 des AdxWT und Lys-27 der AdR; **B)** Cross-Link Region nach Mutation der Asp-15 des AdxWT zu Lys-15 (AdxD15K); **C)** Cross-Link Region nach Mutation der Asp-15 des AdxWT zu Asn-15 (AdxD15N); **D)** Cross-Link Region nach Mutation der Asp-39 des AdxWT zu Lys-39 (AdxD39K); **E)** Cross-Link Region nach Mutation der Asp-39 des AdxWT zu Asn-39 (AdxD15N);

Link Region nach Mutation der Asp-39 des AdxWT zu Asn-39 (AdxD15N);

Werden noch zusätzliche positive Ladungen eingeführt, so wird der AdxD39N-AdR Komplex deutlich instabiler. Dies ist aber erst mit einer zweifachen ( $\text{MgCl}_2$  und Spermidin) oder dreifachen Ladung (Spermin) zu beobachten. Hingegen wird der AdxD39K-AdR Komplex stabiler, oder verändert sich kaum zur Kontrolle. Ähnliches gilt für die Mutationen an der Aminosäure Asp-15. Für sich allein genommen verhalten sich die Mutanten, vor allem die positiven K-Mutanten, wie der Adrenodoxin Wildtyp in Anwesenheit der positiven Ladungen der Polyamine. Zusätzliche positive Ladungen führen zu unspezifischen Effekten, die keine eindeutige, klare Linie im Verhalten der Polyamine und Salze an diesen Stellen erkennen lassen oder ihr Verhalten genau erklären könnten. Um weitere Informationen über den Einfluss der durch die Mutation veränderten Ladungen auf den Elektronentransfer, und in wiefern dies noch durch die Salze oder die Polyamine verstärkt wird, zu erhalten, könnten z.B. noch Stopped-Flow Messungen durchgeführt werden.

Die Untersuchungen mittels Cytochrom *c* Assay waren so uneinheitlich, dass sie keine schlüssige Interpretation zulassen. Obwohl nicht von physiologischer Relevanz, übertragen die Mitglieder der mitochondrialen Elektronentransferkette AdR und Adx das Elektron auf Cytochrom *c*, wobei in diesem Fall der Elektronentransfer zwischen AdR und Adx der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist (Lambeth & Kamin, 1977). Wie bereits erwähnt, befinden sich die untersuchten Mutanten alle in der sekundären Interaktionsdomäne zwischen Adx und AdR. Daher wurde dieser *in vitro* Test ausgesucht, um zu untersuchen, in wiefern die neu eingeführten Ladungen an der Stelle 15 bzw. 39 einen Effekt auf den Elektronentransfer haben (**Tabelle 3.14** und **3.15**). Wie in **Tabelle 4.4** gezeigt wird, sind die kinetischen Konstanten zwischen AdxWT und den Mutanten AdxD39K und AdxD39N in der Bindung der Reduktase und in der Cytochrom *c* Reduktion ähnlich. Das ist erstaunlich, da der Adx Aminosäure D39 die positiv geladene Seitenkette Lys-27 der Reduktase gegenüberliegt. Frühere Studien zeigten, dass die Bindungsaffinität hundertfach zurück geht, wenn man Asp-76 oder Asp-79 mit Asn ersetzt (Coghlan & Vickery, 1991). Da auch den Aminosäuren Asp-76 und Asp-79 des Adx die AdR-Aminosäuren Arg-240 und Arg-244 gegenüberliegen, hätte man ein ähnliches Ergebnis erwartet. Dagegen zeigen die Mutanten AdxD15K und AdxD15N einen bis zu 5,6-fachen gesteigerten  $K_m$  und einen um 85% gesteigerten  $V_{max}$ . Beide zeigen somit eine geringere Affinität zum Elektronendonator, aber einen effizienteren Elektronentransfer. Dies deutet darauf hin, dass die Einführung einer neutralen oder positiven Ladung an dieser Stelle zwar zur Abstoßung zwischen

den Redoxpartner führt, den Elektronenfluss aber nicht behindert. Dies widerspricht den Biacore Daten, die einen stabileren AdxD15K/AdxD15N-AdR Komplex zeigen.

Sowohl die Anwesenheit von Salz als auch von Polyaminen führt zu einer Verschlechterung des Elektronenflusses. Dies könnte sich, wie schon bei den Biacore Ergebnissen, über eine Anwesenheit von „zu vielen“ positiven Ladungen erklären, die die komplexen, elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Adx und AdR stören. Dagegen spricht allerdings, dass mit Ausnahme von 0,1 mM Putrescin und 1,0 mM Spermin, in Anwesenheit von positiver Ladung die Affinität zwischen AdR und Adx gleich bleibt oder sogar verbessert wird.

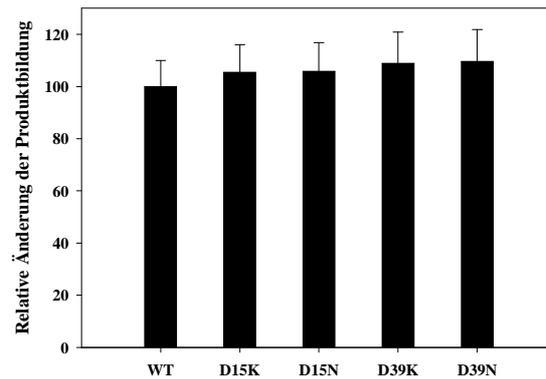
Die Anwesenheit des einwertigen Salzes KCl zeigt in Kombination sowohl mit dem Wildtyp als auch mit allen Mutanten einen gestiegenen  $K_m$  und in den meisten Fällen einen Rückgang des  $V_{max}$ . Das deutet eher daraufhin, dass die Änderungen über die positive Ladungen des Salzes als durch die Mutanten hervorgerufen werden. Auch die Polyamine zeigen ein ähnliches Verhalten mit den Mutanten wie mit dem Wildtypen (**Tabelle 4.4**).

**Tabelle 4.4: Relative kinetische Konstante für die Interaktion von AdxWT oder Mutanten mit der Adrenodoxin Reduktase**

	$K_m$	$V_{max}$
AdxWT	1,00	1,00
AdxWT, 0,1 mM KCl	4,23	0,42
AdxWT, 1,0 mM KCl	4,67	0,62
AdxWT, 0,1 mM Put	2,63	0,68
AdxWT, 1,0 mM Put	0,77	0,71
AdxWT, 0,1 mM Spd	1,30	0,81
AdxWT, 1,0 mM Spd	1,07	0,81
AdxWT, 0,1 mM Spn	0,70	0,83
AdxWT, 1,0 mM Spn	3,20	0,42
<b>AdxD15K</b>		
AdxD15K	5,60	1,83
AdxD15K, 0,1 mM KCl	9,53	0,67
AdxD15K, 1,0 mM KCl	8,27	1,83
AdxD15K, 0,1 mM Put	1,20	0,41
AdxD15K, 1,0 mM Put	8,93	1,17
AdxD15K, 0,1 mM Spd	3,67	1,16
AdxD15K, 1,0 mM Spd	4,83	1,11
AdxD15K, 0,1 mM Spn	13,63	0,62
AdxD15K, 1,0mM Spn	6,00	0,44
<b>AdxD15N</b>		
AdxD15N	3,53	1,85
AdxD15N, 0,1 mM KCl	7,97	0,90
AdxD15N, 1,0 mM KCl	13,73	0,73
AdxD15N, 0,1 mM Put	1,70	1,26
AdxD15N, 1,0 mM Put	2,17	0,83
AdxD15N, 0,1 mM Spd	1,73	0,86
AdxD15N, 1,0 mM Spd	1,27	0,80
AdxD15N, 0,1 mM Spn	1,97	0,83
AdxD15N, 1,0mM Spn	2,00	0,54
<b>AdxD39K</b>		
AdxD39K	1,50	0,98
AdxD39K, 0,1 mM KCl	10,50	1,03
AdxD39K, 1,0 mM KCl	4,07	0,50
AdxD39K, 0,1 mM Put	1,20	1,10
AdxD39K, 1,0 mM Put	0,60	0,53
AdxD39K, 0,1 mM Spd	0,33	0,52
AdxD39K, 1,0 mM Spd	1,10	0,83
AdxD39K, 0,1 mM Spn	1,33	0,71
AdxD39K, 1,0mM Spn	2,37	0,42
<b>AdxD39N</b>		
AdxD39N	1,73	0,94
AdxD39N, 0,1 mM KCl	10,16	0,82
AdxD39N, 1,0 mM KCl	4,10	0,32
AdxD39N, 0,1 mM Put	1,03	0,53
AdxD39N, 1,0 mM Put	2,63	0,92
AdxD39N, 0,1 mM Spd	2,27	0,90
AdxD39N, 1,0 mM Spd	1,13	0,79
AdxD39N, 0,1 mM Spn	1,73	0,94
AdxD39N, 1,0mM Spn	4,03	0,72

Verglichen mit früheren Analysen der Crosslinking Domäne und ihrer Bedeutung auf den Elektronentransport des Steroidhydroxylierungssystems, deuten die in dieser Arbeit gezeigten Daten trotz aller Unterschiede auf eine andere Bedeutung dieser Region des Adx im CYP11A1-Hydroxylierungssystem, als bei Müller *et al.* angenommen (Müller *et al.*, 2001), hin. Der von Müller *et al.* 2001 publizierte Crosslink und die Identifizierung der sogenannten sekundären Interaktionsdomäne um die Aminosäure Asp-39 des Adx konnten dahingehend experimentell belegt werden, dass über diese Region tatsächlich die Interaktion zwischen Adx und AdR gesteuert werden kann. Die Einführung der Mutationen in die sekundäre Interaktionsdomäne zeigten aber genau gegensätzliche Ergebnisse als die, die man durch ähnliche Mutationen an der primären Interaktionsdomäne (Asp-72, Asp-76, Asp-79) erhält (Coghlan & Vickery, 1991) und somit erwartet hätte. Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse sind die erste ausführliche biochemische Analyse dieser Region. Sie zeigen, dass die bisherige Rolle dieser postulierten, mittels eines Crosslinks theoretisch bestimmten Interaktionsdomäne zumindest angezweifelt werden muss. Zwar hat diese Region um die Aminosäuren Asp-15 und Asp-39 eine Bedeutung für die Bindung und den Elektronentransfer zur AdR, allerdings erst mit einer Neutralisierung oder Umkehrung der Ladung an diesen Stellen wird dies sichtbar und ist anders als erwartet.

Da die Reduktion des Adx durch die AdR bedeutend schneller als der Elektronentransfer vom Adx zum CYP11A1 ist (Schiffler *et al.*, 2004), sollte die Substratumwandlungaktivität des Cytochrom P450 durch eine geänderte Affinität der Adx-Mutanten zur AdR nicht beeinflusst werden. In der Tat konnten mittels HPLC keine bedeutende Änderung der Pregnenolonproduktion durch die Mutationen an der Stelle AdxD15 und AdxD39 der Crosslinking-Domäne nachgewiesen werden (**Abbildung 4.11**).



**Abb. 4.11: Vergleich zwischen der CYP11A1-Produktbildung mit den unterschiedlichen Adx-Mutanten.** Der Substratumsatz erfolgte mittels des beschriebenen CYP11A1-Assays ( $n \geq 3$ ). Die Produktbildung des AdxWT wurde auf 100% gesetzt.

Hierbei handelt es sich um einen gegenteiligen Effekt der Mutanten im Vergleich zu den Polyaminen. In Anwesenheit der Polyamine ging die Produktbildung deutlich zurück (**Abbildung 3.4 bis 3.6**). Das bedeutet aber auch, dass diese Bindestelle der Polyamine am Adx-AdR Komplex bzw. diese Region nicht für die Eigenschaften Adx-CYP11A1 Komplexes relevant sein kann.

Somit ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Steroidhydroxylierungsreaktion (Übertragung des Elektrons vom Adx zum Cytochrom P450 (Schiffler *et al.*, 2004)) von den Mutationen nicht beeinflusst. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob die eingeführten Mutationen eine Veränderung in der Interaktion mit dem Cytochrom P450 aufweisen. Zum besseren Verständnis muss man die Lage der mutierten Aminosäuren im Vergleich zu den Aminosäuren, die eine wichtige Rolle in der Bindung des Cytochroms spielen, betrachten. Da die Region um Asp-72 und Glu-73, die essentiell für eine funktionale Komplexbildung mit CYP11A1 ist, (Coghlan & Vickery, 1991, 1992; Usanov *et al.*, 2002) im Modell von Müller *et al.* auf der von der Sekundären Interaktionsdomäne des Adx-AdR Komplexes abgewandten Seite liegt (Müller *et al.*, 2001), sollten Mutationen und veränderte Ladungen an der Stelle Asp-15 und der Stelle Asp-39 kaum einen Effekt auf die Interaktion mit dem Cytochrom ausüben. Allerdings zeigten Untersuchungen der Interaktion zwischen AdxWT und den Mutanten mittels Biacore auch einen Einfluss der Mutationen am Adx auf die Interaktion zum Cytochrom P450. Auch in dieser Komplexbildung (**Tabelle 4.5**) verhalten sich die Mutanten wie der Wildtyp mit den Polyaminen (**Tabelle 3.3 und 3.4**).

**Tabelle 4.5: Vergleich der SPR-Analysen der Interaktion zwischen Adx<sub>ox</sub> (WT oder Mutanten) mit CYP11A1**

Das Bindungsverhalten von CYP11A1 (Konzentration des Analyten zwischen 100 - 500 nM) an AdxWT und den Mutanten AdxD15K, AdxD15N, AdxD39K und AdxD39N, die zuvor auf einen CM5 Chip (~300 RU) immobilisiert wurden, wurde in Biacore HBS-EP Puffer (0,01 M HEPES Puffer, pH 7,4, 0,15 M NaCl mit 0,005% Surfactant P20) bei 25°C untersucht. Die Bindungskurven der Interaktionen wurden mit dem Biacore Evaluierungsprogramm 4.1 als ein 1:1 Bindungsmodell analysiert. Standardabweichungen (n ≥ 4) zu den gezeigten Werten waren innerhalb ± 10 %.

	Adx – CYP11A1		
	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D (k_{off}/k_{on})$
	[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	[s <sup>-1</sup> ]	[M]
AdxWT	1,83 · 10 <sup>5</sup>	6,76 · 10 <sup>-3</sup>	3,69 · 10 <sup>-8</sup>
AdxD15K	3,76 10 <sup>3</sup>	4,14 10 <sup>-3</sup>	1,01 10 <sup>-6</sup>
AdxD15N	2,08 10 <sup>3</sup>	4,41 10 <sup>-3</sup>	2,12 10 <sup>-6</sup>
AdxD39K	4,98 10 <sup>3</sup>	2,26 10 <sup>-3</sup>	4,54 10 <sup>-7</sup>
AdxD39N	3,70 10 <sup>4</sup>	3,84 10 <sup>-3</sup>	1,04 10 <sup>-7</sup>

Dennoch ist die offensichtliche Fähigkeit der Polyamine, das AdR-Adx System zu aktivieren und das Adx-CYP11A1 System zu deaktivieren von großem Interesse. Berücksichtigt man, dass die Kombination aus AdR-Adx für eine Vielzahl von Cytochromen P450 als Elektronendonator dient, wie im abschließenden Kapitel dieser Arbeit näher erläutert wird, so könnte die Aktivität anderer Cytochrome P450 auch über die Verfügbarkeit des Elektronenüberträgers Adx gesteuert werden.

### 4.3 Konkurrenz der verschiedenen Cytochrome um den gleichen Vorrat an Adx und AdR und möglicher Einfluss auf die biologische Funktion und Einsatz der Polyamine in anderen Elektronentransfersystemen

Zum Abschluss möchte ich im letzten Teil aufzeigen, welche weiterreichenden Schlussfolgerungen über die Einsatzmöglichkeiten der Polyamine aus den Erkenntnissen dieser Arbeit abgeleitet werden können.

Wie bereits erwähnt, finden in der inneren Mitochondrienmembran nicht nur Elektronentransferprozesse zur Bildung von Steroiden, sondern auch zur Bildung von Vitamin D<sub>3</sub> statt. Darüber hinaus ist weder die Steroidbiosynthese auf die klassischen Organe der Nebennierenrinde und der Gonaden beschränkt, noch kommen die Komponenten der Vitamin D Kaskade nur an den klassischen Orten wie der Leber und der Niere vor. In vielen Säugetierzellen, enthalten die Mitochondrien eine große Zahl von Cytochromen P450, die um

Elektronen aus dem gleichen AdR-Adx Vorrat konkurrieren. Ein besonderes Beispiel sind Keratinozyten, welche sowohl Cytochrome P450 der Steroidbiosynthese (Slominski *et al.*, 1996, 2000) als auch Cytochrome P450 enthalten, die an der Vitamin D Kaskade beteiligt sind (Lehmann *et al.*, 2001).

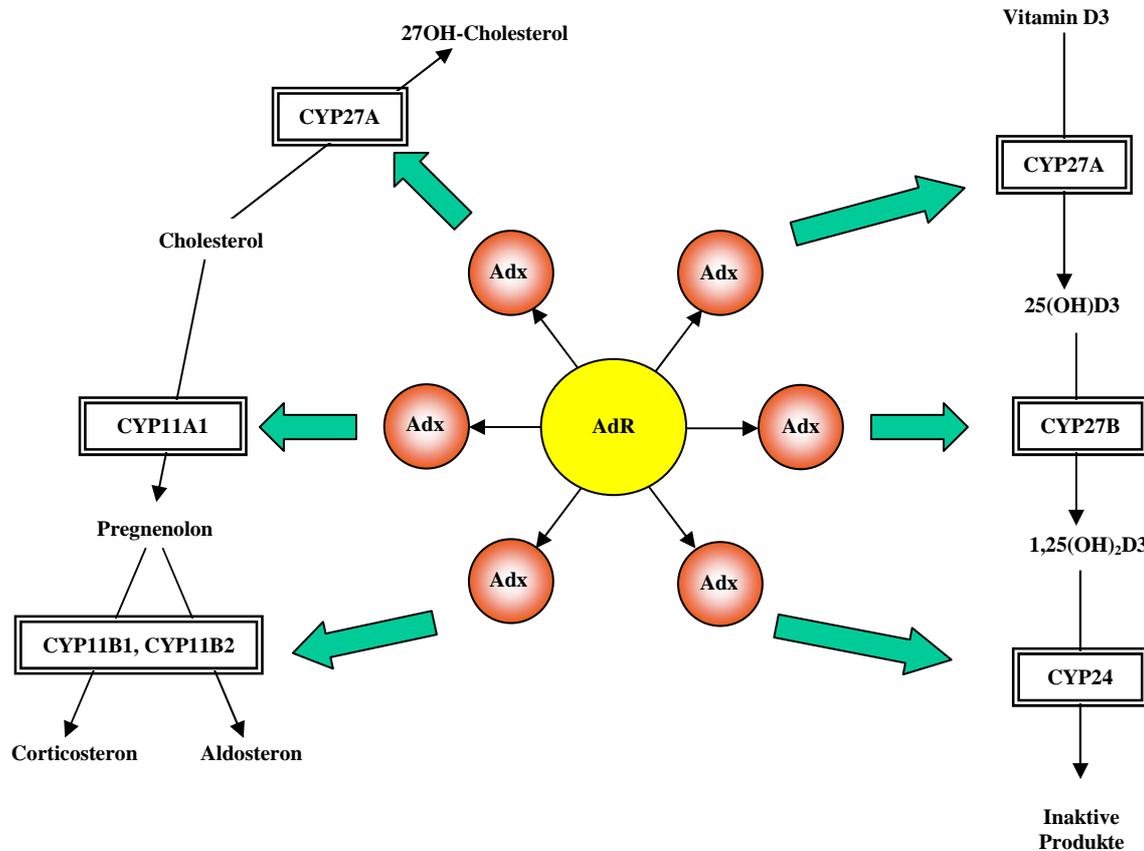
In der inneren Mitochondrienmembran findet nicht nur die Biosynthese der Steroidhormone sondern auch der Vitamin D<sub>3</sub> Metabolismus statt (Bernhardt, 1996; Pikuleva & Waterman, 1999; Omdahl *et al.*, 2001). Bis jetzt wurden sechs unterschiedliche Cytochrome P450 in beiden Kaskaden identifiziert, die Mitglieder dreier Genfamilien (CYP11, CYP27, CYP24) sind. In der Steroidhormonkaskade sind dies CYP11A1 (katalysiert die Abspaltung der Seitenkette des Cholesterols zur Bildung von Pregnenolon), CYP11B1, CYP11B2 (die 11 $\beta$ - und 18-Hydroxylierungen führen zu Glucocorticoiden und Mineralcorticoiden) und CYP27A (oxidiert Cholesterol am C-27 zu Vorläufern der Gallensäure). Im Vitamin D System hydroxyliert in einem ersten Schritt CYP27A (neben Cholesterol) Vitamin D<sub>3</sub> am C-25. Anschließend erfolgt durch das verwandte CYP27B (25-HydroxyvitaminD<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -hydroxylase) eine 1 $\alpha$ -Oxidation, die zur Bildung von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> führt. 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> induziert die Expression von CYP24 (1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-24-hydroxylase), das die C-20 – C-27 Seitenkette angreift (Reddy & Tserng 1989; Jones *et al.*, 1998; Omdahl *et al.*, 2001; Schuster *et al.*, 2001 a,b).

Darüber hinaus können Cytochrome P450, die durch Fremdstoffe induziert werden und normalerweise in den Microsomen lokalisiert sind, in einer gekürzten aber immer noch aktiven Form auch in den Mitochondrien gefunden werden (z.B. CYP1A1, CYP2B1, CYP2E1 (Addya *et al.*, 1997, Neve & Ingelman-Sundberg, 2001)). Auch diese Cytochrome erhalten ihre Elektronen über das AdR/Adx System, da sie über die putative G-Helix mit beiden, dem mitochondrialen Adx und dem microsomalen CPR, interagieren können (Robin *et al.*, 2001).

Um Konsequenzen für die unterschiedlichen Cytochrome P450, die um einen begrenzten Pool an AdR und Adx konkurrieren, ableiten zu können, haben verschiedene Gruppen die Effekte von CYP11A1 und CYP11B auf die Aktivitäten und die sich ergebenden Profile der Metabolite, in einer Vielzahl von Testsystemen untersucht (Ikushiro *et al.*, 1992; Yamazaki *et al.*, 1993; Cao & Bernhardt, 1999). Abhängig von der Anwesenheit von Adx ändern sich die Aktivitäten und Hormonprofile erheblich, was auf eine bevorzugte Interaktion des Adx mit CYP11A1 hinweist. Mit einem limitierten Pool an AdR und Adx könnten die sich sehr schnell ändernden CYP24 Expressionslevel zu einem cross-talk zwischen den Steroidhormonen und dem Vitamin D System und zu einer dazugehörigen Änderung in den Hormonprofilen und Pathways

(Abbildung 4.12) führen. Der spezifische Effekt der Polyamine auf die Adx Komplexbildung mit unterschiedlichen Cytochromen könnte dieses „pathway-switching“ verstärken oder aufheben.

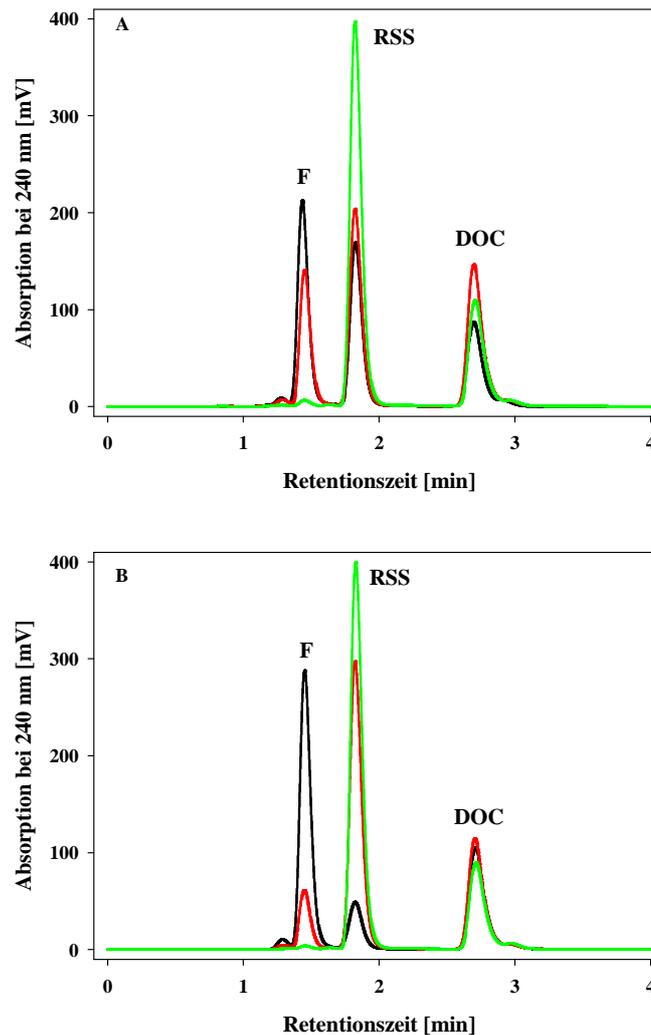
Die in dieser Arbeit am Beispiel des CYP11A1 System durchgeführten Untersuchungen bezüglich der Produktbildung, der Affinität und der Kinetik der Assoziation und Dissoziation des Cytochroms könnten auch an zahlreichen anderen Cytochromen durchgeführt werden. Dies würde eine bis jetzt noch nicht absehbare Fülle an Informationen nicht nur über die Verhaltensweisen und Funktion der Cytochrome P450 liefern, sondern auch das Potential und den Einflussbereich der Polyamine als pharmazeutische Modulatoren enorm erweitern.



**Abb. 4.12:** AdR und Adx liefern Elektronen (Pfeile) zu den unterschiedlichen mitochondrialen Cytochromen, die sowohl in der Steroidhormonsynthese, als auch in der Vitamin D Kaskade Schlüsselfunktionen einnehmen.

Darüber hinaus wären auch Untersuchungen zur Interaktion in dem komplett löslichen bakteriellen CYP101 System und in dem mikrosomalen CYP3A4-CPR System denkbar. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, ob die untersuchten Polyamine, die cytochromkatalysierten Reaktionen jeweils speziell oder auf eine allgemeinere Art und Weise an einem einzigen oder an mehreren Redoxpartner regulieren.

Dass die Polyamine auch andere Cytochrom-Elektronentransfersysteme beeinflussen, zeigen erste Untersuchungen zur Substratumwandlung des CYP11B1. Ähnlich durchgeführt wie die CYP11A1-abhängige Substratumsetzung, wurde mit zunehmender Polyaminkonzentration die Umwandlung des Substrates 11-Deoxycortisol (RSS) zu Hydrocortisol (F) inhibiert (**Abbildung 4.13**)



**Abb. 4.13: HPLC-Chromatogramm eines *in-vitro*-Rekonstitutionsassays von CYP11B1.**

11-Deoxycortisol (RSS) als Substrat, das zu Hydrocortisol (F) umgewandelt wird, und 11-Deoxycorticosteron (DOC) als internem Standard in Anwesenheit der Polyamine (A) Spermidin (B) Spermin. Die Kontrolle (schwarze Linie) enthielt kein Polyamin. Die rote Linie zeigt den Umsatz in Anwesenheit von 1 mM, die grüne Linie mit 6 mM des jeweiligen Polyamins.

Ein weiterer Schritt wäre auch eine Untersuchungen der Polyamine *in vivo* in intakten Mitochondrien oder Zellkulturen (COS-1 Zellen, Nebennierenzellen, Keratinocyten). Ein Transportsystem für Polyamine in die Mitochondrien durch ein spezifisches Uptake-System konnte bereits nachgewiesen werden (Toninello *et al.*, 1992). Dennoch müsste an allen Testsystemen in einem ersten Schritt die Menge der aufgenommenen Polyamine nachgewiesen werden. Dies wäre zum Beispiel unter Verwendung radioaktiv markierter Polyamine möglich. Damit einhergehend müsste zu Beginn die Verträglichkeit der Zellen auf die Polyaminmenge mit denen sie inkubiert werden, überprüft werden. COS-1 Zellen könnten dann z.B. mit CYP11A1 oder CYP11B1 alleine oder mit AdR und Adx co-transfiziert werden (Cao & Bernhardt, 1999).

Die Substratumwandlung von Cholesterol (für CYP11A1) oder von Deoxycholesterol (für CYP11B1) in An- und Abwesenheit der Polyamine könnten dann mittels HPLC bzw. HPTLC analysiert werden. Zusätzliche Testbedingungen wie die optimale Substratkonzentration, oder die Dauer der Inkubierung müssen bestimmt und festgelegt werden.

Somit könnten sich für die Polyamine weitere neue Anwendungen für noch nicht berücksichtigte oder bisher noch unbekannte Krankheitstargets ergeben.

## 5. Literaturverzeichnis

Abad, M.F.C., Di Benedetto, G., Magalhaes, P.J., Filippin, L. & Pozzan, T. (2004) "Mitochondrial pH monitored by a new engineered green fluorescent protein mutant." *J. Biol. Chem.* 279(12): 11521-11529.

Adamovich, T.B., Pikuleva, I.A., Chashchin, V.L. & Usanov, S.A. (1989) "Selective chemical modification of cytochrome P-450<sub>scc</sub> lysine residues. Identification of lysines involved in the interaction with adrenodoxin." *Biochim. Biophys. Acta* 996(3): 247-253.

Addya, S., Anandatheerthavarada, H.K., Biswas, G., Bhagwat, S.V., Mullick, J. & Avadhani, N.G. (1997) "Targeting of NH<sub>2</sub>-terminal-processed microsomal protein to mitochondria: a novel pathway for the biogenesis of hepatic mitochondrial P450<sub>MT2</sub>." *J. Cell Biol.* 139(3): 589-599.

Akhrem, A.A., Lapko, V.N., Lapko, A.G., Shkumatov, V.M. & Chashchin, V.L. (1979) "Isolation, structural organization and mechanism of action of mitochondrial steroid hydroxylating systems." *Acta Biol. Med. Ger.* 38(2-3): 257-273.

Aoyama, Y., Noshiro, M., Gotoh, O., Imaoka, S., Funae, Y., Kurosawa, N., Horiuchi, T. & Yoshida, Y. (1996) "Sterol 14-Demethylase P450 (P450<sub>14DM\*</sub>) is one of the most ancient and conserved P450 species." *J. Biochem.* 119(5): 926-33.

Araneda, R.C, Lan, J.Y., Zheng, X., Zukin, R.S. & Bennett, M.V. (1999) "Spermine and arcaine block and permeate N-methyl-D-aspartate receptor channels." *Biophys. J.* 76(6): 2899-2911.

Arinc, E. (1993) "Extrahepatic microsomal forms: lung microsomal cytochrome P450 isozymes." In *Cytochrome P450* (Schenkman, J.B. & Griem, H. (eds.)), Springer-Verlag, Berlin, pp. 373-386.

Arkin, M.R. & Wells, J.A. (2004) "Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream." *Nat. Rev. Drug Discov.* 3(4): 301-317.

Atkins, P.W. (1996) *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim.

Bachrach, U. (1973) *Function of Natural Occurring Polyamines*, Academic Press, New York.

Bachrach, U. (2004) "Polyamines and cancer: Minireview article." *Amino Acids* 26(4): 307-309.

Bartsch, R.G. (1991) "The distribution of soluble metallo-redox proteins in purple phototrophic bacteria." *Biochim. Biophys. Acta* 1058(1): 28-30.

Beckert, V & Bernhardt, R. (1997) "Specific aspects of electron transfer from adrenodoxin to cytochromes P450<sub>scc</sub> and P450<sub>11beta</sub>." *J. Biol. Chem.* 272(8): 4883-4888.

Behlke, J., Ristau, O., Müller, E.C., Hannemann, F. & Bernhardt, R. (2007) "Self-association of adrenodoxin studied by using analytical ultracentrifugation." *Biophys. Chem.* 125(1):159-165.

Beilke, D., Weiss, R., Löhr, F., Pristovek, P., Hannemann, F., Bernhardt, R. & Rüterjans, H. (2002) "A new electron transport mechanism in mitochondrial steroid hydroxylase systems based on structural changes upon the reduction of adrenodoxin." *Biochemistry* 41(25): 7969 - 7978.

Bencini, A., Bianchi, A., Garcia-Espana, E., Micheloni, M. & Ramirez, J.A. (1999) "Proton coordination by polyamine compounds in aqueous solution." *Coord. Chem. Rev.* 188(1): 97-156.

Beratan, D.N., Onuchic, J.N., Winkler, J.R. & Gray, H.B. (1992). "Electron-tunneling pathways in proteins." *Science* 258(5089): 1740-1741.

- Beratan, D.N. & Skourtis, S.S. (1998) "Electron transfer mechanisms." *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2(2): 235-243.
- Berg, T. (2003) "Modulation of protein-protein interactions with small organic molecules." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42(22): 2462-2481.
- Bergethon, P.R. (1998) *The physical basis of biochemistry: the foundations of molecular biophysics*, Springer-Verlag, Berlin.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. & Bourne, P.E. (2000) "The Protein Data Bank." *Nucleic Acids Res.* 28(1): 235-242.
- Bernhardt, R. (1996) "Cytochrome P450: structure, function, and generation of reactive oxygen species." *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 127: 137-221.
- Bernhardt, R. (2006) "Cytochromes P450 as versatile biocatalysts." *J. Biotechnol.* 124(1): 128-145.
- Bettuzzi, S., Davalli, P., Astancolle, S., Pinna, C., Roncaglia, R., Boraldi, F., Tiozzo, R., Sharrard, M. & Corti, A. (1999) "Coordinate changes of polyamine metabolism regulatory proteins during the cell cycle of normal human dermal fibroblasts." *FEBS Lett.* 446(1): 18-22.
- Bezkorovainy, A. (1980) *The iron-sulfur proteins: Biochemistry of nonheme iron*, Plenum, New York.
- Biacore (2004) *Surface Plasmon Resonance, Technology Note 1*.
- Brandt, M.E. & Vickery, L.E. (1993) "Charge pair interactions stabilizing ferredoxin-ferredoxin reductase complexes. Identification by complementary site-specific mutations." *J. Biol. Chem.* 268(23): 17126-17130.
- Bruschi, M. & Guerlesquin, F. (1988) "Structure, function and evolution of bacterial ferredoxins." *FEMS Microbiol. Rev.* 4(2): 155-175.
- Bureik, M., Zollner, A., Schuster, N., Montenarh, M. & Bernhardt, R. (2005) "Phosphorylation of bovine adrenodoxin by protein kinase CK2 affects the interaction with its redox partner cytochrome P450(scc) (CYP11A1)." *Biochemistry* 44(10): 3821-3830.
- Burova, T.V., Bernhardt, R. & Pfeil, W. (1995) "Conformational stability of bovine holo and apo adrenodoxin -- A scanning calorimetric study." *Protein Sci.* 4(5): 909-916.
- Burova, T.V., Beckert, V., Uhlmann, H., Ristau, O., Bernhardt, R. & Pfeil, W. (1996) "Conformational stability of adrenodoxin mutant proteins." *Protein Sci.* 5(9): 1890-1897.
- Cammack, R., Rao, K.K., Barger, C.P., Hutson, K.G., Andrew, P.W. & Rogers, L.J. (1977) "Midpoint redox potentials of plant and algal ferredoxins." *Biochem. J.* 168(2): 205-209.
- Cao, P.R. & Bernhardt, R. (1999) "Interaction of CYP11B1 (cytochrome P-45011 beta) with CYP11A1 (cytochrome P-450scc) in COS-1 cells." *Eur. J. Biochem.* 262(3): 720-726.
- Childs, A.C., Mehta, D.J. & Gerner, E.W. (2003) "Polyamine-dependent gene expression." *Cell. Mol. Life Sci.* 60(7): 1394-1406.
- Chu, J.-W. & Kimura, T. (1973 a) "Studies on adrenal steroid hydroxylases. Molecular and catalytic properties of adrenodoxin reductase (a flavoprotein)." *J. Biol. Chem.* 248(6): 2089-2094.
- Chu, J.-W. & Kimura, T. (1973 b) "Studies on adrenal steroid hydroxylases. Complex formation of the hydroxylase components." *J. Biol. Chem.* 248(14): 5183-5187.

- Chun, Y.-J., Kim, S., Kim, D., Lee, S.-K. & Guengerich, F.P. (2001) "A new selective and potent inhibitor of human cytochrome P450 1B1 and its application to antimutagenesis." *Cancer Res.* 61(22): 8164-8170.
- Clark, B.J., Wells, J., King, S.R. & Stocco, D.M. (1994) "The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR)." *J. Biol. Chem.* 269(45): 28314-28322.
- Cochran, A.G. (2000) "Antagonists of protein-protein interactions." *Chemistry & Biology* 7(4): R85-R94.
- Cochran, A.G. (2001) "Protein-protein interfaces: mimics and inhibitors." *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5(6): 654-659.
- Coghlan, V.M., Cupp, J.R. & Vickery, L.E. (1988) "Purification and characterization of human placental ferredoxin." *Arch. Biochem. Biophys.* 264(2): 376-382.
- Coghlan, V.M. & Vickery, L.E. (1991) "Site-specific mutations in human ferredoxin that affect binding to ferredoxin reductase and cytochrome P450<sub>scc</sub>." *J. Biol. Chem.* 266(28): 18606-18612.
- Coghlan, V.M. & Vickery, L.E. (1992) "Electrostatic interactions stabilizing ferredoxin electron transfer complexes. Disruption by "conservative" mutations." *J. Biol. Chem.* 267(13): 8932-8935.
- Cohen, S.S. (1998) *A Guide to the Polyamines*, Oxford University Press, New York.
- Cupp, J.R. & Vickery, L.E. (1989) "Adrenodoxin with a COOH-terminal deletion (des 116-128) exhibits enhanced activity." *J. Biol. Chem.* 264(3): 1602-1607.
- D'Agostino, L., Di Pietro, M. & Di Luccia, A. (2006) "Nuclear aggregates of polyamines." *IUBMB Life* 58(2): 75-82.
- Daiber, A., H. Shoun, H. & Ullrich, V. (2005) Nitric oxide reductase (P450<sub>nor</sub>) from *Fusarium oxysporum*, *J. Inorg. Biochem.* 99(1): 185-193.
- Dalet, C., Andersson, K.K., Dalet-Beluche, I., Bonfils, C. & Maurel, P. (1983) "Polyamines as modulators of drug oxidation reactions catalyzed by cytochrome P-450 from liver microsomes." *Biochem. Pharmacol.* 32(4): 593-601.
- Davidson, V.L. (2000) "What controls the rates of interprotein electron-transfer reactions." *Acc. Chem. Res.* 33(2): 87-93.
- Davidson, V.L. (2002) "Chemically gated electron transfer. A means of accelerating and regulating rates of biological electron transfer." *Biochemistry* 41(50): 14633-14636.
- Denisov, I.G., Makris, T.M., Sligar, S.G. & Schlichting, I. (2005) "Structure and chemistry of cytochrome P450." *Chem. Rev.* 105(6): 2253-2277.
- Derouet-Hümbert, E., Roemer, K. & Bureik, M. (2005) "Adrenodoxin (Adx) and CYP11A1 (P450<sub>scc</sub>) induce apoptosis by the generation of reactive oxygen species in mitochondria." *Biological Chemistry* 386(5): 453-461.
- Dudley, H.W., Rosenheim, M.C. & Rosenheim, O. (1924) "The chemical constitution of spermine. I. The isolation of spermine from animal tissues, and the preparation of its salts." *Biochem. J.* 18(6): 1263-1272.

- Dudley, H.W., Rosenheim, O. & Starling, W.W. (1926) "The chemical constitution of spermine. III. Structure and synthesis." *Biochem. J.* 20(5): 1082-1094.
- Dudley, H.W., Rosenheim, O. & Starling, W.W. (1927) "The constitution and synthesis of spermidine, a newly discovered base isolated from animal tissues." *Biochem. J.* 21(1): 97-103.
- Dugad, L.B., La Mar, G.N., Banci, L. & Bertini, I. (1990) "Identification of localized redox states in plant-type two-iron ferredoxins using the nuclear Overhauser effect." *Biochemistry* 29(9): 2263-2271.
- Erdmann, B., Denner, K., Gerst, H., Lenz, D. & Bernhardt, R. (1995 a) "Human adrenal CYP11B1: localization by in situ-hybridization and functional expression in cell cultures." *Endocr. Res.* 21(1-2):425-435.
- Erdmann, B., Gerst, H., Bülow, H., Lenz, D., Bähr, V., & Bernhardt, R. (1995 b) "Zone-specific localization of cytochrome P45011B1 in human adrenal tissue by PCR-derived riboprobes." *Histochem. Cell Biol.* 104(4):301-307.
- Erdmann, B., Gerst, H., Lippoldt, A., Bülow, H., Ganten, D., Fuxe, K. & Bernhard, R. (1996) "Expression of cytochrome P45011B1 mRNA in the brain of normal and hypertensive transgenic rats." *Brain Res.* 773(1): 73-82.
- Estabrook, R.W., Suzuki, K., Mason, J.I., Baron, J., Taylor, W.E., Simpson, J.P., Purvis, J. & McCarthy, J. (1973) *Adrenodoxin: An iron-sulfur protein of adrenal cortex mitochondria*, Academic Press, New York.
- Eyrisch, S. & Helms, V. (2007) "Transient pockets on protein surfaces involved in protein-protein interaction." *J. Med. Chem.* 50(15): 3457-3464.
- Fersht, A. (1998) *Electron transfer in chemistry and biology: an introduction to the theory*, W.H. Freeman, New York. .
- Feuerstein, B.G., Pattabiraman, N. & Marton, L.J. (1986) "Spermine-DNA interactions: a theoretical study." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83(16): 5948-5952.
- Feuerstein, B.G., Pattabiraman, N. & Marton, L.J. (1989) "Molecular dynamics of spermine-DNA interactions: sequence specificity and DNA bending for a simple ligand." *Nucleic Acids Res.* 17(17): 6883-6892.
- Fujihara, S., Abe, H. & Yoneyama, T. (1995) "A new polyamine 4-aminobutylcadaverine." *J. Biol. Chem.* 270(17): 9932-9938.
- Gabdoulline, R.R. & Wade, R.C. (1998) "Brownian dynamics simulation of protein-protein diffusional encounter." *Methods* 14(3): 329-341.
- Gamielidien, K. & Maritz, G.S. (2004) "Postnatal expression of cytochrome P450 1A1, 2A3, and 2B1 mRNA in neonatal rat lung: influence of maternal nicotine exposure." *Exp. Lung Res.* 30(2): 121-133.
- Garfinkel, D. (1958) "Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions." *Arch. Biochem. Biophys.* 77(2): 493-509.
- Geren, L.M., O'Brien, P., Stonehuerner, J., Millett, F. (1984) "Identification of specific carboxylate groups on adrenodoxin that are involved in the interaction with adrenodoxin reductase." *J. Biol. Chem.* 259(4): 2155-2160.
- Graham, S.E. & Peterson, J.A. (1999) "How similar are P450s and what can their differences teach us?" *Arch. Biochem. Biophys.* 369(1): 24-29.

- Grinberg, A.V., Hannemann, F., Schiffler, B., Müller, J., Heinemann, U. & Bernhardt, R. (2000) "Adrenodoxin: structure, stability, and electron transfer properties." *Proteins* 40(4): 590-612.
- Grinberg, A.V. & Bernhardt, R. (2001) "Contribution of a salt bridge to the thermostability of adrenodoxin determined by site-directed mutagenesis." *Arch. Biochem. Biophys.* 396(1): 25-34.
- Guo, Z., Zhou, D. & Schltz, P.G. (2000) "Designing small-molecule switches for protein-protein interactions." *Science* 288(5473): 2042-2045.
- Guryev, O., Carvalho, R.A., Usanov, S., Gilep, A. & Estabrook, R.W.(2003) "A pathway for the metabolism of vitamin D3: Unique hydroxylated metabolites formed during catalysis with cytochrome P450<sub>scc</sub> (CYP11A1)." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(25): 14754-14759.
- Hakki, T., Zearo, S., Dragan, C.-A., Bureik, M. & Bernhardt, R. (2008) "Coexpression of redox partners increases the hydrocortisone (cortisol) production efficiency in CYP11B1 expressing fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *J. Biotechnol.* 133(3): 351-359.
- Hamana, K. & Matsuzaki, S. (1982) "Widespread occurrence of norspermidine and norspermine in eukaryotic algae." *J. Biochem.* 91(4): 1321-1328.
- Hamana, K. & Matsuzaki, S. (1985) "Distinct difference in the polyamine compositions of Bryophyta and Pteridophyta." *J. Biochem.* 97(6): 1595-1601.
- Hannemann, F., Rottmann, M., Schiffler, B., Zapp, J. & Bernhardt, R. (2001) "The loop region covering the iron-sulfur cluster in bovine adrenodoxin comprises a new interaction site for redox partners." *J. Biol. Chem.* 276(2): 1369-1375.
- Hannemann, F., Bichet, A. Ewen, K.M. & Bernhardt, R. (2007) "Cytochrome P450 systems--biological variations of electron transport chains." *Biochim. Biophys. Acta* 1770(3): 330-344.
- Hanukoglu, I., Rapoport, R., Weiner, L. & Sklan, D. (1993) "Electron leakage from the mitochondrial NADPH-adrenodoxin reductase-adrenodoxin-P450<sub>scc</sub> (cholesterol side chain cleavage) system." *Arch. Biochem. Biophys.* 305(2): 489-498.
- Hara, T. & Kimura, T. (1989a) "Purification and catalytic properties of a cross-linked complex between adrenodoxin reductase and adrenodoxin." *J. Biochem. (Tokyo)* 105(4): 594-600.
- Hara, T. & Kimura, T. (1989b) "Active complex between adrenodoxin reductase and adrenodoxin in the cytochrome P-450<sub>scc</sub> reduction reaction." *J. Biochem. (Tokyo)* 105(4): 601-605.
- Hara, T. & Miyata, T. (1991) "Identification of a cross-linked peptide of a covalent complex between adrenodoxin reductase and adrenodoxin." *J. Biochem.* 110(2): 261-266.
- Hara, T., Koba, C., Takeshima, M. & Sagara, Y. (2000) "Evidence for the cluster model of mitochondrial steroid hydroxylase system derived from dissociation constants of the complex between adrenodoxin reductase and adrenodoxin." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276(1): 210-215.
- Hayaishi, O. & Nozaki, M. (1969). "Nature and mechanisms of oxygenases." *Science* 164(878): 389-396.
- Heby, O. & Persson, L. (1990) "Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells." *Trends Biochem. Sci.* 15(4): 153-158.
- Holden, H.M., Jacobson, B.L., Hurley, J.K., Tollin, G., Oh, B.H., Skjeldal, L., Chae, Y.K., Cheng, H., Xia, B. & Markley, J.L. (1994) "Structure-function studies of [2Fe-2S] ferredoxins." *J. Bioenerg. Biomembr.* 26(1): 67-88.

- Holtzhauser (1996) *Methoden in der Proteinanalytik*, Springer Verlag, Berlin.
- Hopfield, J.J. (1974) "Electron transfer between biological molecules by thermally activated tunneling." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71(9): 3640-3644.
- Hoshino, K., Momiyama, E., Yoshida, K., Nishimura, K., Sakai, S., Toida, T., Kashiwagi, K. & Igarashi, K. (2005) "Polyamine transport by mammalian cells and mitochondria." *J. Biol. Chem.* 280(52): 42801-42808.
- Huang, J.J. & Kimura, T. (1973) "Studies on adrenal steroid hydroxylases. Oxidation-reduction properties of adrenal iron-sulfur protein (adrenodoxin)." *Biochemistry* 12(3): 406-409.
- Hurley, J.K., Hazzard, J.T., Martinez-Julvez, M., Medina, M., Gomez-Moreno, C. & Tollin, G. (1999) "Electrostatic forces involved in orienting Anabaena ferredoxin during binding to Anabaena ferredoxin:NADP<sup>+</sup> reductase: site-specific mutagenesis, transient kinetic measurements, and electrostatic surface potentials." *Protein Sci.* 8(8): 1614-1622.
- Ichikawa, Y., Hamamoto, I., Waki, N., Iwahashi, K., Hiwatashi, A. & Tsubaki, M. (1987) *Iron-Sulfur Protein Research*, Japan Societies Press, Tokio, pp. 97-105.
- Ikushiro, S., Kominami, S. & Takemori, S. (1992) "Adrenal P-450<sub>scc</sub> modulates activity of P-450<sub>11</sub> beta in liposomal and mitochondrial membranes. Implication of P-450<sub>scc</sub> in zone specificity of aldosterone biosynthesis in bovine adrenal." *J. Biol. Chem.* 267(3): 1464-1469.
- Isin, E.M. & Guengerich, F.P. (2006) "Kinetics and thermodynamics of ligand binding by cytochrome P450 3A4." *J. Biol. Chem.* 281(14): 9127-9136.
- Ito, K. & Igarashi, K. (1986) "The increase by spermidine of fidelity of protamine synthesis in a wheat-germ cell-free system." *Eur. J. Biochem.* 156(3): 505-510.
- Ivanov, Y.D., Usanov, S.A. & Archakov, A.I. (1999) "Optical biosensor studies on the productive complex formation between the components of cytochrome P450<sub>scc</sub> dependent monooxygenase system." *Biochem. Mol. Biol. Int.* 47(2): 327-336.
- Jones, G., Strugnell, S.A. & DeLuca, H.F. (1998) "Current understanding of the molecular actions of vitamin D." *Physiol. Rev.* 78(4): 1193-1231.
- Jones, M.L., Kurnikov, I.V. & Beratan, D.N. (2002) "The nature of tunneling pathway and average packing density models for protein-mediated electron transfer." *J. Phys. Chem.* 106(10): 2002-2006.
- Jönsson, U., Fägerstam, L., Ivarsson, B., Johnsson, B., Karlsson, R., Lundh, K., Läfas, S., Persson, B., Roos, H., Rönnerberg, I., Sjölander, S., Stenberg, E., Stahlberg, R., Urbaniczky, C., Ostlin, H. & Malmqvist, M. (1991) "Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology." *Biotechniques* 11(5): 620-627.
- Jugert, F.K., Agarwal, R., Kuhn, A., Bickers, D.R., Merk, H.F. & Mukhtar, H. (1994) "Multiple cytochrome P450 isozymes in murine skin: induction of P450 1A, 2B, 2E, and 3A by dexamethasone." *J. Invest. Dermatol.* 102(6): 970-975.
- Kido, T. & Kimura, T. (1979) "The formation of binary and ternary complexes of cytochrome P-450<sub>scc</sub> with adrenodoxin and adrenodoxin reductase.adrenodoxin complex. The implication in ACTH function." *J. Biol. Chem.* 254(23): 11806-11815.
- Kimura, T. (1968) "Biochemical aspects of iron-sulfur linkage in none-heme iron protein, with special reference to adrenodoxin." (Jorgensen, C.K., J.B. Neilands, R.S. Nyholm, D. Reinen, & R.J.P. Williams, eds.) *Structure and Bonding*. Springer, New York.

- Klingenberg, M. (1958) "Pigments of rat liver microsomes." *Arch. Biochem. Biophys.* 75(2): 376-386.
- Kudo, T., Tomura, D., Liu, D.L., Dai, X.Q. & Shoun, H. (1996) "Two isozymes of P450nor of *Cylindrocarpus tonkinensis*: molecular cloning of the cDNAs and genes, expressions in the yeast, and the putative NAD(P)H-binding site." *Biochimie* 78(8-9): 792-799.
- Kulkarni, A.P. & Gonzales, I. (1985) "Stimulation of the mouse hepatic microsomal aniline p-hydroxylases by acetone and polyamines." *Gen. Pharmacol.* 16(1): 13-18.
- Kunze, K.L., Nelson, W.L., Kharasch, E.D., Thummel, K.E. & Isoherranen, N. (2006) "Stereochemical aspects of itraconazole metabolism in vitro and in vivo." *Drug Metab. Dispos.* 34(4): 583-590.
- Ladenburg, A. (1886) "Über die Identität des Cadaverin mit dem Pentamethyldiamin." *Ber. dtsh. chem. Ges.* 19: 2585-2586.
- Ladenburg, A. & Abel, A. (1888) "Über das Aethylenimin (Spermin?)." *Ber. dtsh. chem. Ges.* 21: 758-766.
- Lambeth, J.D. & Kamin, H. (1977) "Adrenodoxin reductase and adrenodoxin. Mechanisms of reduction of ferricyanide and cytochrome c." *J. Biol. Chem.* 252(9): 2908-2917.
- Lambeth, J.D., Seybert, D.W. & Kamin, H. (1979) "Ionic effects on adrenal steroidogenic electron transport. The role of adrenodoxin as an electron shuttle." *J. Biol. Chem.* 254(15): 7255-7264.
- Lambeth, J.D., Seybert, D.W. & Kamin, H. (1980) "Adrenodoxin reductase - adrenodoxin complex. Rapid formation and breakdown of the complex and a slow conformational change in the flavoprotein." *J. Biol. Chem.* 255(10): 4667-4672.
- Lambeth, J.D., Kitchen, S.E., Farooqui, A.A., Tuckey, R. & Kamin, H. (1982) "Cytochrome P-450<sub>scc</sub>-substrate interactions. Studies of binding and catalytic activity using hydroxycholesterols." *J. Biol. Chem.* 257(4): 1876-1884.
- Lambeth, J.D. & Pember, S.O. (1983) "Cytochrome P-450<sub>scc</sub>-adrenodoxin complex. Reduction properties of the substrate-associated cytochrome and relation of the reduction states of heme and iron-sulfur centers to association of the proteins." *J. Biol. Chem.* 258(9): 5596-5602.
- Lambeth, J.D., Geren, L.M. & Millett, F. (1984) "Adrenodoxin interaction with adrenodoxin reductase and cytochrome P450<sub>scc</sub>. Cross-linking of protein complexes and effects of adrenodoxin modification by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide." *J. Biol. Chem.* 259(16): 10025-10029.
- Lambeth, J.D. (1990) "Enzymology of mitochondrial side-chain cleavage by cytochrome P-450<sub>scc</sub>." (Ruckpaul, K., Rein, H., eds.) *Frontiers in Biotransformation* Volume 3. Molecular Mechanisms of Adrenal Steroidogenesis and Aspects of Regulation and Application, Akademie-Verlag, Berlin, pp. 58-100.
- Lehmann, B., Genehr, T., Knuschke, P., Pietzsch, J. & Meurer M. (2001) "UVB-induced conversion of 7-dehydrocholesterol to 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in an in vitro human skin equivalent model." *J. Invest. Dermatol.* 117(5): 1179-1185.
- Lehninger. (1994) *Prinzipien der Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Lepesheva, G.I. & Usanov, S.A. (1998) "Comparative structural and immunochemical characterization of recombinant and natural cytochrome p450<sub>scc</sub> (CYPXIAI)." *Biochemistry (Moscow)* 63(2): 224-234.

- Lewis, D.F.V. & Hlavica, P. (2000) "Interactions between redox partners in various cytochrome P450 systems: functional and structural aspects." *Biochim. Biophys. Acta* 1460(2-3): 353-374.
- Liang, C. & Newton, M.D. (1992) "Ab initio studies of electron transfer: pathway analysis of effective transfer integrals." *J. Phys. Chem.* 96(7): 2855-2866.
- Lifton, R.P., Dluhy, R.G., Powers, M., Rich, G.M., Cook, S., Ulick, S. & Lalouel, J.M. (1992) "A chimaeric 11 $\beta$ -hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension." *Nature* 355(6357): 262-265.
- Lippard, S.J. & Berg, J.M. (1995) *Bioanorganische Chemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Locuson, C.W., Hutzler, J.M. & Tracy, T.S. (2007) "Visible spectra of Type II cytochrome P450-drug complexes: evidence that "incomplete" heme coordination is common." *Drug Metab. Dispos.* 35(4): 614-622.
- Lottspeich (1998) *Bioanalytik* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Lovenberg, W. (1977) *Iron-sulfur proteins*, Academic Press, New York.
- MacConnachie, A.A., Kelly, K.F., Mcnamara, A., Loughlin, S., Gates, L.J., Inglis, G.C., Jamieson, A., Connell, J.M. & Haites, N.E. (1998) "Rapid diagnosis and identification of cross-over sites in patients with glucocorticoid remediable aldosteronism." *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83(12): 4328-4331.
- Marcus, R.A. & Siders, P. (1982) "Theory of highly exothermic electron transfer reactions." *J. Phys. Chem.* 86(5): 622-630.
- Marcus, R.A. & Sutin, N. (1985) "Electron transfers in chemistry and biology." *Biochim. Biophys. Acta* 811: 265-322.
- Mason, H.S., Fowlks, W.L. & Peterson, E. (1955) "Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex." *J. Am. Chem. Soc.* 77(10): 2914-2915.
- Mason, S., La, S., Mytych, D., Swanson, S.J. & Ferbas, J. (2003) "Validation of the BIACORE 3000 platform for detection of antibodies against erythropoietic agents in human serum samples." *Curr. Med. Res. Opin.* 19(7): 651-659.
- Matocha M.F. & Waterman M.R. (1984) "Discriminatory processing of the precursor forms of cytochrome P-450<sub>sc</sub> and adrenodoxin by adrenocortical and heart mitochondria." *J. Biol. Chem.* 259(13): 8672-8678.
- Matthews, H.R. (1993) "Polyamines, chromatin structure and transcription." *Bioessays* 15(8): 561-566.
- Miller, W.L. (2007 a) "StAR search--what we know about how the Steroidogenic Acute Regulatory Protein mediates mitochondrial cholesterol import." *Mol. Endocrinol.* 21(3): 589-601.
- Miller, W.L. (2007 b) "Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter." *Biochim. Biophys. Acta* 1771(6): 663-676.
- Mornet, E., Dupont, J., Vitek, A. & White, P.C. (1989) "Characterization of two genes encoding human steroid 11 $\beta$ -hydroxylase (P-450(11 $\beta$ ))." *J. Biol. Chem.* 264(35): 20961-20967.
- Morrison, L.D. & Kish, S.J. (1995) "Brain polyamine levels are altered in Alzheimer's disease." *Neurosci. Lett.* 197(1): 5-8.

- Mortenson, L.E., Valentine, R.C. & Carnahan, J.E. (1962) "An electron transport factor from *Clostridium pasteurianum*." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4(7): 448-452.
- Mukhtar, H. & Khan, W.A. (1989) "Cutaneous cytochrome P-450." *Drug Metab. Rev.* 20(2-4): 657-673.
- Müller, A, Müller, J.J. Müller, Y.A., Uhlmann, H., Bernhardt, R. & Heinemann, U. (1998) "New aspects of electron transfer revealed by the crystal structure of a truncated bovine adrenodoxin, Adx(4-108)." *Structure* 6(3): 269-280.
- Müller, E.C., Lapko, A., Otto, A., Müller, J.J., Ruckpaul, K. & Heinemann, U. (2001) "Covalently crosslinked complexes of bovine adrenodoxin with adrenodoxin reductase and cytochrome P450<sub>sc</sub>. Mass spectrometry and Edman degradation of complexes of the steroidogenic hydroxylase system." *Eur. J. Biochem.* 268(6): 1837-1843.
- Müller, J.J., Müller, A., Rottmann, M., Bernhardt, R. & Heinemann, U. (1999) "Vertebrate-type and plant-type ferredoxins: crystal structure comparison and electron transfer pathway modelling." *J. Mol. Biol.* 294(2): 501-513.
- Müller, J.J., Lapko, A., Bourenkov, G., Ruckpaul, K. & Heinemann, U. (2001) "Adrenodoxin reductase-adrenodoxin complex structure suggests electron transfer path in steroid biosynthesis." *J. Biol. Chem.* 276(4): 2786-2789.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K. & Schäfer-Korting, M. (2001) *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 8. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Nakahara, K., Tanimoto, T., Hatano, K., Usuda, K. & Shoun, H. (1993) "Cytochrome P-450 55A1 (P-450dNIR) acts as nitric oxide reductase employing NADH as the direct electron donor." *J. Biol. Chem.* 268(11): 8350-8355.
- Nebert, D.W., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Kemper, B., Levin, W. et al. (1987) "The P450 gene superfamily: recommended nomenclature." *DNA* 6(1): 1-11.
- Nebert, D.W., Nelson, D.R., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F. & Kemper, B. (1989) "The P450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci." *DNA* 8(1): 1-13.
- Nebert, D.W. & Nelson, D.R. (1991) "P450 nomenclature based on evolution." *Meth. Enzymol.* 206: 3-11.
- Nebert, D.W., Nelson, D.R., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Loper, J.C., Sato, R., Waterman, M.R. & Waxman, D.J. (1991) "The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature." *DNA Cell Biol.* 10(1): 1-14.
- Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O. et al. (1993) "The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature." *DNA Cell Biol.* 12(1): 1-51.
- Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C. & Nebert, D.W. (1996) "P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature." *Pharmacogenetics* 6(1): 1-42.

- Nelson, D.R., Zeldin, D.C., Hoffman, S.M., Maltais, L.J., Wain, H.M. & Nebert, D.W. (2004) "Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants." *Pharmacogenetics* 14(1) 1-18.
- Nelson, D.R. (2006) "Cytochrome P450 nomenclature, 2004." *Methods Mol. Biol.* 320: 1-10.
- Neve, E.P. & Ingelman-Sundberg, M. (2001) "Identification and characterization of a mitochondrial targeting signal in rat cytochrome P450 2E1 (CYP2E1)." *J. Biol. Chem.* 276(14): 11317-11322.
- Nordblom, G.D., White, R.E. & Coon, M.J. (1976) "Studies on hydroperoxide-dependent substrate hydroxylation by purified liver microsomal cytochrome P-450." *Arch. Biochem. Biophys.* 175(2): 524-533.
- Nordblom, G.D. & Coon, M.J. (1977) "Hydrogen peroxide formation and stoichiometry of hydroxylation reactions catalyzed by highly purified liver microsomal cytochrome P-450." *Arch Biochem Biophys.* 180(2): 343-347.
- Noshiro, M., Aoyama, Y., Kawamoto, T., Gotoh, O., Horiuchi, T. & Yoshida, Y. (1997) "Structural and evolutionary studies on sterol 14-demethylase P450 (CYP51), the most conserved P450 monooxygenase: I. Structural analyses of the gene and multiple sizes of mRNA." *J. Biochem.* 122(6): 1114-1121.
- Nguyen, H.-H., Hannemann, F., Hartmann, M.F., Wudy, S.A. & Bernhardt, R. (2008) "Aldosterone synthase deficiency caused by a homozygous L451F mutation in the CYP11B2 gene." *Mol. Genet. Metab.* 93(4): 458-467.
- Omdahl, J.L., Bobrovnikova, E.A., Choe, S., Dwivedi, P.P. & May, B.K. (2001) "Overview of regulatory cytochrome P450 enzymes of the vitamin D pathway." *Steroids* 66(3-5): 381-389.
- Omdahl, J.L., Bobrovnikova, E.A., Annalora, A., Chen, P. & Serda, R. (2003) "Expression, structure-function, and molecular modeling of vitamin D P450s." *J. Cell. Biochem.* 88(2): 356-362.
- Omura, T. & Sato, R. (1964 a) "The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature." *J. Biol. Chem.* 239(7): 2370-2378.
- Omura, T. & Sato, R. (1964 b) "The carbonmonoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties." *J. Biol. Chem.* 239(7): 2379-2385.
- Ortiz De Montellano, P.R. (1995) "Oxygen activation and reactivity." (Ortiz De Montellano, P.R., ed.) *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry* Plenum Press, New York, pp. 245-303.
- Osimitz, T.G. & Kulkarni, A.P. (1985) "Polyamine effects on cytochrome P-450- and flavin-containing monooxygenase-mediated oxidation of xenobiotics." *Drug Metab. Dispos.* 13(2): 197-203.
- Ouameur, A.A. & Tajmir-Riahi, H.-A. (2004) "Structural analysis of DNA interactions with biogenic polyamines and cobalt(III)hexamine studied by fourier transform infrared and capillary electrophoresis." *J. Biol. Chem.* 279(40): 42041-42054.
- OuYang, B., Pochapsky, S.S., Pagani, G.M. & Pochapsky, T.C. (2006) "Specific effects of potassium ion binding on wild-type and L358P cytochrome P450cam." *Biochemistry* 45(48): 14379-14388.
- Ouzounis, C.A. & Melvin, W.T. (1991) "Primary and secondary structural patterns in eukaryotic cytochrome P-450 families correspond to structures of the helix-rich domain of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450cam. Indications for a similar overall topology." *Eur. J. Biochem.* 198(2): 307-315.

- Overington, J., Donnelly, D., Johnson, M.S., Sali, A. & Blundell, T.L. (1992) "Environment-specific amino acid substitution tables: tertiary templates and prediction of protein folds." *Protein Sci.* 1(2): 216-226.
- Paine, A.J. (1981) "Hepatic cytochrome P-450." *Essays Biochem.* 17: 85-126.
- Park, S.Y., Shimizu, H., Adachi, S., Nakagawa, A., Tanaka, I., Nakahara, K., Shoun, H., Obayashi, E., Nakamura, H., Iizuka, T. & Shiro, Y. (1997) "Crystal structure of nitric oxide reductase from denitrifying fungus *Fusarium oxysporum*." *Nat. Struct. Biol.* 4(10): 827-832.
- Pasanen, M. & Pelkonen, O. (1989) "Human placental xenobiotic and steroid biotransformations catalyzed by cytochrome P450, epoxide hydrolase, and glutathione S-transferase activities and their relationships to maternal cigarette smoking." *Drug Metab. Rev.* 21(3): 427-61.
- Pearson, J.T., Hill, J.J., Swank, J., Isoherranen, N. Kunze, K.L. & Atkins, W.M. (2006) "Surface Plasmon Resonance analysis of antifungal azoles binding to CYP3A4 with kinetic resolution of multiple binding orientations." *Biochemistry* 45(20): 6341-6353.
- Pegg, A.E. (1988) "Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy." *Cancer Res.* 48(4): 759-774.
- Pegg, A.E. & McCann, P.P. (1982) "Polyamine metabolism and function." *Am. J. Physiol.* 243(5): 212-221.
- Pegg, A.E. & Williams-Ashman, H.G. (1968) "Biosynthesis of putrescine in the prostate gland of the rat." *Biochem. J.* 108(4): 533-539.
- Pigulla, I. & Röder, E. (1978) "Hochdruck-flüssig-chromatographische Bestimmung von Putrescin, Spermidin und Spermin aus Harn." *Fresenius Z. Anal. Chem.* 293(5): 404-406.
- Pikuleva, I. & Waterman, M. (1999) "Cytochromes P450 in synthesis of steroid hormones, bile acids, vitamin D3 and cholesterol." *Mol. Aspects Med.* 20(1-2): 33-42, 43-37.
- Pikuleva, I.A., Tesh, K., Waterman, M.R. & Kim, Y. (2000) "The tertiary structure of full-length bovine adrenodoxin suggests functional dimers." *Arch. Biochem. Biophys.* 373(1): 44-55.
- Pingoud, A. & Urbanke, C. (1997) *Arbeitsmethoden der Biochemie, de Gruyter*, Berlin.
- Porter, T.D. & Coon, M.J. (1991) "Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms." *J. Biol. Chem.* 266(21): 13469-13472.
- Porter, T.D. & Larson, J.R. (1991) "Expression of mammalian P450s in *Escherichia coli*." *Methods Enzymol.* 206: 108-116.
- Portrat-Doyen, S., Tourniaire, T., Richard, O., Mulatero, P., Aupetit-Faisant, B., Curnow, K.M., Pascoe, L. & Morel, Y. (1998) "Isolated aldosterone synthase deficiencies caused by simultaneous E198D and V386A mutations in the CYP11B2 gene." *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83(11): 4156-4161.
- Poulos, T.L., Finzel, B.C., Gunsalus, I.C., Wagner, G.C. & Kraut, J. (1985) "2.6 Å crystal structure of *Pseudomonas putida* P450<sub>cam</sub>." *J. Biol. Chem.* 260(30): 16122-16130.
- Poulos, T.L., Finzel, B.C. & Howard, A.J. (1986) "Crystal structure of substrate-free *Pseudomonas putida* cytochrome P-450." *Biochemistry* 25(18): 5314-5322.
- Poulos, T.L. & Raag, R. (1992) "Cytochrome P450<sub>cam</sub>: crystallography, oxygen activation and electron transfer." *FASEB J.* 6(2): 674-679.

- Pray, L. (2005) "Filling the niches in candidates for protein-protein interactions." *Genomics & Proteomics* 5(4): 22-25.
- Price, R.J., Renwick, A.B., Walters, D.G., Young, P.J. & Lake, B.G. (2004) "Metabolism of nicotine and induction of CYP1A forms in precision-cut rat liver and lung slices." *Toxicol. In Vitro* 18(2): 179-185.
- Privalov, P.L. (1979) "Stability of proteins: small globular proteins." *Adv. Protein Chem.* 33: 167-241.
- Quinn, S.J., Ye, C.-P., Diaz, R., Kifor, O., Bai, M., Vassilev, P. & Brown, E. (1997) "The Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor: a target for polyamines." *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 273(4): C1315-1323.
- Reddy, G.S. & Tserng, K.Y. (1989) "Calcitroic acid, end product of renal metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 through C-24 oxidation pathway." *Biochemistry* 28(4): 1763-1769.
- Rich, A., Nordheim, A. & Wang, A.H.J. (1984). "The chemistry and biology of left-handed Z-DNA." *Annu. Rev. Biochem.* 53(1): 791-846.
- Riedl, S., Nguyen, H.-H., Clausmeyer, S., Schulze, E., Waldhauser, F. & Bernhardt, R. (2008) "A homozygous L299P mutation in the CYP11B1 gene leads to complete virilization in 46,XX individuals with 11-beta-hydroxylase deficiency." *Horm. Res.* 70(3): 145-149.
- Robin, M.A., Anandatheerthavarada, H.K., Fang, J.K., Cudic, M., Otvos, L. & Avadhani, N.G. (2001) "Mitochondrial targeted cytochrome P450 2E1 (P450 MT5) contains an intact N terminus and requires mitochondrial specific electron transfer proteins for activity." *J. Biol. Chem.* 276(27): 24680-24689.
- Rothe, H., Willig, A. & Jaros, P.P. (1991) "Polyamine als Wachstumsmodulatoren: in-vitro Untersuchungen." (Jaros, P.P., Willig, A., eds.) *Milzpeptide, Oldenburger Universitätsreden*, Oldenburg., pp. 67-94.
- Ruckpaul, K. (1990) *Frontiers of biotransformation*, Akademie Verlag, Berlin.
- Ruckpaul, K. (1993) "Cytochrom P450 abhängige Enzyme-Targetenzyme für die Arzneistoffentwicklung?" *Pharm. Unserer Zeit* 22(5-6): 296-304.
- Rudolph, A.E., Blasi, E.R. & Delyani, J.A. (2000) "Tissue-specific corticosteroidogenesis in the rat." *Mol. Cell. Endocrinol.* 165(1-2): 221-224.
- Ruettinger, R.T., Wen, L.P. & Fulco, A.J. (1989) "Coding nucleotide, 5' regulatory, and deduced amino acid sequences of P-450BM-3, a single peptide cytochrome P-450:NADPH-P-450 reductase from *Bacillus megaterium*." *J. Biol. Chem.* 264(19): 10987-10995.
- Ruiz-Chica, J., Medina, M.A., Sanchez-Jimenez, F. & Ramirez, F.J. (2001) "Fourier Transform Raman study of the structural specificities on the interaction between DNA and biogenic polyamines." *Biophys. J.* 80(1): 443-454.
- Sagara, Y., Takata, Y., Miyata, T., Hara, T. & Horiuchi, T. (1987) "Cloning and sequence analysis of adrenodoxin reductase cDNA from bovine adrenal cortex." *J. Biochem. (Tokyo)* 102(6): 1333-1336.
- Sagara, Y., Wada, A., Takata, Y., Waterman, M.R., Sekimizu, K. & Horiuchi, T. (1993) "Direct expression of adrenodoxin reductase in *Escherichia coli* and the functional characterization." *Biol. Pharm. Bull.* 16(7): 627-630.
- Salvi, M. & Toninello, A. (2004). "Effects of polyamines on mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport." *Biochim. Biophys. Acta* 1661(2): 113-124.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Saminathan, M., Thomas, T. Shirahata A., Pillai C.K. & Thomas T.J. (2002). "Polyamine structural effects on the induction and stabilization of liquid crystalline DNA: potential applications to DNA packaging, gene therapy and polyamine therapeutics." *Nucleic Acids Res.* 30(17): 3722-3731.
- Sarhan, S. & Seiler, N. (1989) "On the subcellular localization of the polyamines." *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 370(12): 1279-1284.
- Schenkman, J.B., Cinti, D.L., Orrenius, S., Moldeus, P. & Kraschnitz, R. (1972) "The nature of the reverse type I (modified type II) spectral change in liver microsomes." *Biochemistry* 11(23): 4243-4250.
- Schiffler, B., Zöllner, A. & Bernhardt, R. (2004) "Stripping down the mitochondrial cholesterol hydroxylase system, a kinetics study." *J. Biol. Chem.* 279(33): 34269-34276.
- Schindler, A.E., Campagnoli, C., Druckmann, R., Huber, J., Pasqualini, J.R., Schweppe, K.W. & Thijssen, J.H. (2003) "Classification and pharmacology of progestins." *Maturitas* 46(Suppl. 1): 7-16.
- Schlichting, I., Berendzen, J., Chu, K., Stock, A.M., Maves, S.A., Benson, D.E., Sweet, B.M., Ringe, D., Petsko, G.A. & Sligar, S.G. (2000) "The catalytic pathway of cytochrome P450cam at atomic resolution." *Science* 287(5458): 1615-1622.
- Schoch, G.A., Yano, J.K., Wester, M.R., Griffin, K.J., Stout, C.D. & Johnson, E.F. (2004) "Structure of human microsomal cytochrome P450 2C8. Evidence for a peripheral fatty acid binding site." *J. Biol. Chem.* 279(10): 9497-9503.
- Schreiber, G. & Fersht, A.R. (1996) "Rapid, electrostatically assisted association of proteins." *Nat. Struct. Biol.* 3(5): 427-431.
- Schuber, F. (1989) "Influence of polyamines on membran functions." *Biochem. J.* 260(1): 1-10.
- Schulz, G.E. (1992) "Binding of nucleotides by proteins." *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2(1): 61-67.
- Schuster, I., Fleschurz, C. & Helm, I. (1975) "On the interaction of a lipophilic drug with different sites of rat-liver microsomes." *Eur. J. Biochem.* 51(2): 511-519.
- Schuster, I., Egger, H., Bikle, D., Herzig, G., Reddy, G.S., Stuetz, A., Stuetz, P. & Vorisek, G. (2001 a). "Selective inhibition of vitamin D hydroxylases in human keratinocytes." *Steroids* 66(3-5): 409-422.
- Schuster, I., Egger, H., Astecker, N., Herzig, G., Schüssler, M. & Vorisek G. (2001 b) "Selective inhibitors of CYP24: mechanistic tools to explore vitamin D metabolism in human keratinocytes." *Steroids* 66(3-5): 451-462.
- Scott, E.E., He, Y.A., Wester, M.R., White, M.A., Chin, C.C., Halpert, J.R., Johnson, E.F. & Stout, C.D. (2003) "An open conformation of mammalian cytochrome P450 2B4 at 1.6 Å resolution." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(23): 13196-13201.
- Seeman, T., Widimsky, J., Hampf, M. & Bernhardt R. (1999) "Abolished nocturnal blood pressure fall in a boy with glucocorticoid-remediable aldosteronism." *J. Hum. Hypertens.* 13(12): 823-828.
- Seiler, N. (1987) "Functions of polyamine acetylation." *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65(10): 2024-2035.

- Seiler, N. & Heby, O. (1988) "Regulation of cellular polyamines in mammals." *Acta Biochim. Biophys. Hung* 23(1): 1-35.
- Seiler, N. & Rauf, F. (2005) "Polyamines and apoptosis." *J. Cell. Mol. Med.* 9(3): 623-642.
- Seliskar, M. & Rozman, D. (2007) "Mammalian cytochromes P450--Importance of tissue specificity." *Biochim. Biophys. Acta* 1770(3): 458-466.
- Selzer, T. & Schreiber, G. (1999) "Predicting the rate enhancement of protein complex formation from the electrostatic energy of interaction." *J. Mol. Biol.* 287(2): 409-419.
- Selzer, T., Albeck, S. & Schreiber, G. (2000) "Rational design of faster associating and tighter binding protein complexes." *Nat. Struct. Biol.* 7(7): 537-541.
- Sheinerman, F.B., Norel, R. & Honig, B. (2000) "Electrostatic aspects of protein-protein interactions." *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10(2): 153-159.
- Skjeldal, L., Markley, J.L., Coghlan, V.M. & Vickery, L.E. (1991 a) "<sup>1</sup>H NMR spectra of vertebrate [2Fe-2S] ferredoxins. Hyperfine resonances suggest different electron delocalization patterns from plant ferredoxins." *Biochemistry* 30(37): 9078-9083.
- Skjeldal, L., Westler, W.M., Oh, B.H., Krezel, A.M., Holden, H.M., Jacobson, B.L., Rayment, I. & Markley, J.L. (1991 b) "Two-dimensional magnetization exchange spectroscopy of *Anabaena* 7120 ferredoxin. Nuclear Overhauser effect and electron self-exchange cross peaks from amino acid residues surrounding the 2Fe-2S cluster." *Biochemistry*, 30(30): 7363-7368.
- Sligar, S.G. & Gunsalus, I.C. (1976) "A thermodynamic model of regulation: modulation of redox equilibria in camphor monooxygenase." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73(4): 1078-1082.
- Slominski, A., Ermak, G. & Mihm, M. (1996) "ACTH receptor, CYP11A1, CYP17 and CYP21A2 genes are expressed in skin." *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81(7): 2746-2749.
- Slominski, A., Gomez-Sanchez, C.E., Foecking, M.F. & Wortsman, J. (2000) "Active steroidogenesis in the normal rat skin." *Biochim. Biophys. Acta* 1474(1): 1-4.
- Smith, B.R., Plummer, J.L., Wolf, C.R., Philpot, R.M. & Bend, J.R. (1982) "p-Xylene metabolism by rabbit lung and liver and its relationship to the selective destruction of pulmonary cytochrome P-450." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 223(3): 736-742.
- Song, W.C., Funk, C.D. & Brash, A.R. (1993) "Molecular cloning of an allene oxide synthase: a cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(18): 8519-8523.
- Stockwin, L. & Holmes, S. (2003) "Antibodies as therapeutic agents: vive la renaissance!" *Expert. Opin. Biol. Ther.* 3(7): 1133-1152.
- Stryer, L. (1994) *Lehrbuch der Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Sugano, S., Morishima, N., Ikeda, H. & Horie, S. (1989) "Sensitive assay of cytochrome P450<sub>scc</sub> activity by High-Performance Liquid Chromatography." *Anal. Biochem.* 182(2): 327-333.
- Sugano, S., Miura, R. & Morishima, N. (1996) "Identification of Intermediates in the conversion of cholesterol to pregnenolone with a reconstituted cytochrome P-450<sub>scc</sub> System: accumulation of the intermediate modulated by the adrenodoxin level." *J. Biochem. (Tokyo)* 120(4): 780-787.

- Tabor, C.W. & Tabor, H. (1976) "1,4-Diaminobutane (putrescine), spermidine, and spermine." *Annu. Rev. Biochem.* 45(1): 285-306.
- Tabor, C.W. & Tabor, H. (1984) "Polyamines." *Annu. Rev. Biochem.* 53(1): 749-790.
- Tabor, H., Rosenthal, S.M. & Tabor, C.W. (1958). "The biosynthesis of spermidine and spermine from putrescine and methionine." *J. Biol. Chem.* 233(4): 907-914.
- Toninello, A., Dalla Via, L., Siliprandi, D. & Garlid, K.D. (1992) "Evidence that spermine, spermidine, and putrescine are transported electrophoretically in mitochondria by a specific polyamine uniporter." *J. Biol. Chem.* 267(26): 18393-18397.
- Toogood, P.L. (2002) "Inhibition of protein-protein association by small molecules: approaches and progress." *J. Med. Chem.* 45(8): 1543-1558.
- Tuckey, R.C., McKinley, A.J. & Headlam, M.J. (2001) "Oxidized adrenodoxin acts as a competitive inhibitor of cytochrome P450<sub>scc</sub> in mitochondria from the human placenta." *Eur. J. Biochem.* 268(8): 2338-2343.
- Tuckey, R.C. & Headlam, M.J. (2002) "Placental cytochrome P450<sub>scc</sub> (CYP11A1): comparison of catalytic properties between conditions of limiting and saturating adrenodoxin reductase." *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 81(2): 153-158.
- Tuckey, R.C. (2005) "Progesterone synthesis by the human placenta." *Placenta* 26(4): 273-281.
- Tuls, J., Geren, L., Lambeth, J.D. & Millett, F. (1987) "The use of a specific fluorescence probe to study the interaction of adrenodoxin with adrenodoxin reductase and cytochrome P-450<sub>scc</sub>." *J. Biol. Chem.* 262(21): 10020-10025.
- Tuls, J., Geren, L. & Millett, F. (1989) "Fluorescein isothiocyanate specifically modifies lysine 338 of cytochrome P-450<sub>scc</sub> and inhibits adrenodoxin binding." *J. Biol. Chem.* 264(28): 16421-16425.
- Udransky, von L. & Baumann, E. (1888) "Über die Identität des Putrescins und des Tetramethyldiamins." *Ber. dtsh. chem. Ges.* 21: 19407-19411.
- Uhlmann, H., Beckert, V., Schwarz, D. & Bernhardt, R. (1992) „Expression of bovine adrenodoxin in *E. coli* and site-directed mutagenesis of [2Fe-2S] cluster ligands." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188(3): 1131-1138.
- Uhlmann, H., Kraft, R. & Bernhardt, R. (1994) "C-terminal region of adrenodoxin affects its structural integrity and determines differences in its electron transfer function to cytochrome P-450." *J. Biol. Chem.* 269(36): 22557-22564.
- Uhlmann, H. & Bernhardt, R. (1995) "The role of threonine 54 in adrenodoxin for the properties of its iron-sulfur cluster and its electron transfer function." *J. Biol. Chem.* 270(50): 29959-29966.
- Usanov, S.A., Graham, S.E., Lapesheva, G.I., Azeva, T.N., Strushkevich, N.V., Gilep, A.A., Estabrook, R.W. & Peterson, J.A. (2002) "Probing the interaction of bovine cytochrome P450<sub>scc</sub> (CYP11A1) with adrenodoxin: evaluating site-directed mutations by molecular modeling." *Biochemistry* 41(26): 8310-8320.
- van den Berg, P.A.W., Feenstra, K.A., Mark, A.E., Berendsen, H.J.C. & Visser A.J.W.G. (2002) "Dynamic conformations of flavin adenine dinucleotide: Simulated molecular dynamics of the flavin cofactor related to the time-resolved fluorescence characteristics." *J. Phys. Chem. B*, 106(34): 8858-8869.

- van Leeuwenhoek, A. (1678) "Observationes D. Anthonii Leeuwenhoek, de Natis e semine genitali Animalculis." *Philos. Trans. R. Soc. London* 12: 1040-1043.
- Vaz, A.D., Coon, M.J., Peegel, H. & Menon, K.M. (1992) "Substituted pyridines: nonsteroidal inhibitors of human placental aromatase cytochrome P-450." *Drug Metab. Dispos.* 20(1): 108-112.
- Verhagen, M.F.J.M., Voorhorst, W.G.B., Kolkman, J.A., Wolbert, R.B.G. & Hagen, W.R. (1993) "On the two iron centers of desulfoferrodoxin." *FEBS Lett.* 336(1): 13-18.
- Vickery, L.E. (1997) "Molecular recognition and electron transfer in mitochondrial steroid hydroxylase systems." *Steroids* 62(1): 124-127.
- Wada, A. & Waterman, M.R. (1992) "Identification by site-directed mutagenesis of two lysine residues in cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 that are essential for adrenodoxin binding." *J. Biol. Chem.* 267(32): 22877-22882.
- Wallace, H.M., Fraser, A.V. & Hughes, A. (2003) "A perspective of polyamine metabolism." *Biochem. J.* 376(Pt 1): 1-14.
- Wang, M., Roberts, D.L., Paschke, R., Shea, T.M., Masters, B.S. & Kim JJ. (1997) "Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(16): 8411-8416.
- Warner, M., Ahlgren, R., Zaphiropoulos, P.G., Hayashi, S. & Gustafsson, J.A. (1991) "Identification and localization of cytochromes P450 expressed in brain." *Methods Enzymol.* 206(62): 631-640.
- Waterman, M.R. (1992) "Cytochrome P450: cellular distribution and structural considerations." *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2(3): 384-387.
- Waxman, D.J., Attisano, C., Guengerich, F.P. & Lapenson, D.P. (1988) "Human liver microsomal steroid metabolism: identification of the major microsomal steroid hormone 6 beta-hydroxylase cytochrome P-450 enzyme." *Arch. Biochem. Biophys.* 263(2): 424-436.
- Wells, J.A. & McClendon, C.L. (2007) "Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces." *Nature* 450(7172): 1001-1009.
- Wester, M.R., Johnson, E.F., Marques-Soares, C., Dijols, S., Dansette, P.M., Mansuy, D. & Stout, C.D. (2003) "Structure of mammalian cytochrome P450 2C5 complexed with diclofenac at 2.1 Å resolution: evidence for an induced fit model of substrate binding." *Biochemistry* 42(31): 9335-9345.
- White, P.C., Pascoe, L., Curnow, K.M., Tannin, G. & Rosler, A. (1992) "Molecular biology of 11β-hydroxylase and 11β-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes." *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43(8): 827-835.
- Williams, K. (1997 a) "Interactions of polyamines with ion channels." *Biochem. J.* 325(Pt 2): 289-297; Erratum in: 326(Pt 3): 943.
- Williams, K. (1997 b) "Modulation and block of ion channels: A new biology of polyamines." *Cell. Signal.* 9(1): 1-13.
- Williams, P.A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E.F. & McRee, D.E. (2000) "Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity." *Mol. Cell* 5(1): 121-131.
- Williams, P.A., Cosme, J., Ward, A., Angove, H.C., Matak Vinkovic, D. & Jhoti, H. (2003) "Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin." *Nature* 424(6947): 464-468.

Williams, P.A., Cosme, J., Vinkovic, D.M., Ward, A., Angove, H.C., Day, P.J., Vonrhein, C., Tickle, I.J. & Jhoti, H. (2004) "Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone." *Science* 305(5684): 683-686.

Yamazaki, H., Nakano, M., Gillam, E.M.J., Bell, L.C., Guengerich, F.P. & Shimada, T. (1996) "Requirements for cytochrome b5 in the oxidation of 7-ethoxycoumarin, chlorzoxazone, aniline, and N-nitrosodimethylamine by recombinant cytochrome P450 2E1 and by human liver microsomes." *Biochem. Pharmacol.* 52(2): 301-309.

Yamazaki, T., McNamara, B.C. & Jefcoate, C.R. (1993) "Competition for electron transfer between cytochromes P450<sub>scc</sub> and P450<sub>11β</sub> in rat adrenal mitochondria." *Mol. Cell Endocrinol.* 95(1-2): 1-11.

Yanagibashi, K., Haniu, M., Shively, J.E., Shen, W.H. & Hall, P. (1986) "The synthesis of aldosterone by the adrenal cortex. Two zones (fasciculata and glomerulosa) possess one enzyme for 11 $\beta$ -, 18-hydroxylation, and aldehyde synthesis." *J. Biol. Chem.* 261(8): 3556-3562.

Yokoyama, C., Miyata, A., Ihara, H., Ullrich, V. & Tanabe, T. (1991) "Molecular cloning of human platelet thromboxane A synthase." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178(3): 1479-1484.

Yoshida, Y., Noshiro, M., Aoyama, Y., Kawamoto, T., Horiuchi, T. & Gotoh, O. (1997) "Structural and evolutionary studies on sterol 14-demethylase P450 (CYP51), the most conserved P450 Monooxygenase: II. Evolutionary analysis of protein and gene structures." *J. Biochem.* 122(6): 1122-1128.

Yoshimura, M., Nakamura, S., Ito, T., Nakayama, M., Harada, E., Mizuno, Y., Sakamoto, T., Yamamuro, M., Saito, Y., Nakao, K., Yasue, H. & Ogawa, H. (2002) "Expression of aldosterone synthase gene in failing human heart: quantitative analysis using modified real-time polymerase chain reaction." *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87(8): 3936-3940.

Young, L.S., Murphy, G., Kelly, S.N., Smith, T.P., Cunningham, S.K. & McKenna, T.J. (2003) "Differential production of adrenal steroids by purified cells of the human adrenal cortex is relative rather than absolute." *Eur. J. Endocrinol.* 148(1): 139-145.

Zhang, L., Takaya, N., Kitazume, T., Kondo, T. & Shoun, H. (2001) "Purification and cDNA cloning of nitric oxide reductase cytochrome P450<sub>nor</sub> (CYP55A4) from *Trichosporon cutaneum*." *Eur. J. Biochem.* 268(11): 3198-3204.

Ziegler, G.A. & Schulz, G.E. (2000) "Crystal structures of adrenodoxin reductase in complex with NADP<sup>+</sup> and NADPH suggesting a mechanism for the electron transfer of an enzyme family." *Biochemistry* 39(36): 10986-10995.

Ziegler, G.A., Vonrhein, C., Hanukoglu, I. & Schulz, G.E. (1999) "The structure of adrenodoxin reductase of mitochondrial P450 systems: electron transfer for steroid biosynthesis." *J. Mol. Biol.* 289(4): 981-990.

Zöllner, A., Hannemann, F., Lisurek, M. & Bernhardt, R. (2002) "Deletions in the loop surrounding the iron-sulfur cluster of adrenodoxin severely affect the interactions with its native redox partners adrenodoxin reductase and cytochrome P450<sub>scc</sub> (CYP11A1)." *J. Inorg. Biochem.* 91(4): 644-654.

Zöllner, A., Nogues, I., Heinz, A., Medina, M., Gomez-Moreno, C. & Bernhardt, R. (2004) "Analysis of the interaction of a hybrid system consisting of bovine adrenodoxin reductase and flavodoxin from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7119." *Bioelectrochemistry* 63(1-2): 61-65.

Zöllner, A., Pasquinelli, M.A., Bernhardt, R. & Beratan, D.N. (2007) "Protein phosphorylation and intermolecular electron transfer: A joint experimental and computational Study of a hormone biosynthesis pathway." *J. Am. Chem. Soc.* 129(14): 4206-4216.

Zutshi, R., Brickner, M. & Chmielewski, J. (1998) "Inhibiting the assembly of protein-protein interfaces." *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2(1): 62-66.

### 6. Veröffentlichungen

1. Berwanger, A., Eyrich, S., Schuster, I., Helms, V., and Bernhardt, R.  
Polyamines: Modulators of electrostatic protein-protein interactions in the CYP11A1-dependent steroid hydroxylase.  
*eingereicht*
2. Berwanger, A., Hannemann, F., and Bernhardt, R.  
New insights on the Adrenodoxin Reductase-Adrenodoxin complex structure.  
*In Vorbereitung*
3. Berwanger, A., Hannemann, F., Iametti, S., Bonomi, F., and Bernhardt, R.  
Cluster redox state modulates the structural stability of Adrenodoxin.  
*In Vorbereitung*

## 7. Anhang

### 7.1 Verwendete Geräte

Autoklav	Zirbus IMM 20
ÄKTA-Prime	Pharmacia
CD-Spektrometer	Jasco 715 Spektropolarimeter
HPLC	Jasco LC800 Serie Jasco LC2000 Serie
Inkubator	NewBrunswick Scientific
Sonikator	Emich USD 30
SpeedVac	UniEquip Univapo
SPR-Gerät	Biacore 3000
Stopped flow	Applied Photophysics SX-17MV device
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer
UV/Vis Spektrophotometer	Shimadzu UV-2101 PC
Zentrifugen	Beckmann Coulter Avanti J-20 (Rotor JLA 8.1000) Sigma 3K30 (Rotoren 19776, 12153) Sigma 2K15 (Rotor 12148) Hitachi Himac CP75 $\beta$ (Rotoren P45, P30)

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie der Universität des Saarlandes unter der Leitung von Prof. Dr. Rita Bernhardt angefertigt.

Bei Prof. Dr. Rita Bernhardt bedanke ich mich für die Überlassung der interessanten Fragestellung, die stete Diskussionsbereitschaft, das große Interesse am Fortgang der Arbeit und alle sonstigen in ihrem Arbeitskreis dargebotenen Möglichkeiten.

Dr. Inge Schuster und Prof. Dr. Volkhard Helms sei gedankt für die stete Diskussionsbereitschaft und hilfreiche Anmerkungen.

Ein besonderer Dank geht an M.Sc. Susanne Eyrisch (AK Prof. Dr. V. Helms, Institut für Bioinformatik, Universität des Saarlandes) für die im Rahmen einer Kooperation durchgeführten Dockingexperimente, sowie an Dr. Andy Zöllner für die Einführung in die Stopped-Flow und Biacore Techniken.

Dr. Frank Hannemann, Berna Mersinli und Britta Wilzewski sei gedankt für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Dr. Min-Jung Kang danke ich für die freundliche Aufnahme in ihrem Labor am Korean Institute of Science and Technology (KIST), Seoul, Korea.

Zudem bedanke ich mich bei den technischen Assistenten Katharina Bompais, Walter Klose und Wolfgang Reinle für die vielen Handgriffe und Unterstützungen im Laufe der Jahre.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für das angenehme Arbeitsklima, besonders meinen langjährigen Labor- und Büronachbarn und der Kaffeekarawane (aka 15h-„Elevating“-Gruppe).

Berna, Britta, Hoang, Martin, Thoa und Yogan danke für ungezählte Tassen Tee und vieles mehr!

Insbesondere bedanke ich mich bei meinen Eltern, meiner Familie und Michael Bauer, die mich in den letzten Jahren bei diesem Vorhaben in jeder nur erdenklichen Weise unterstützt haben.