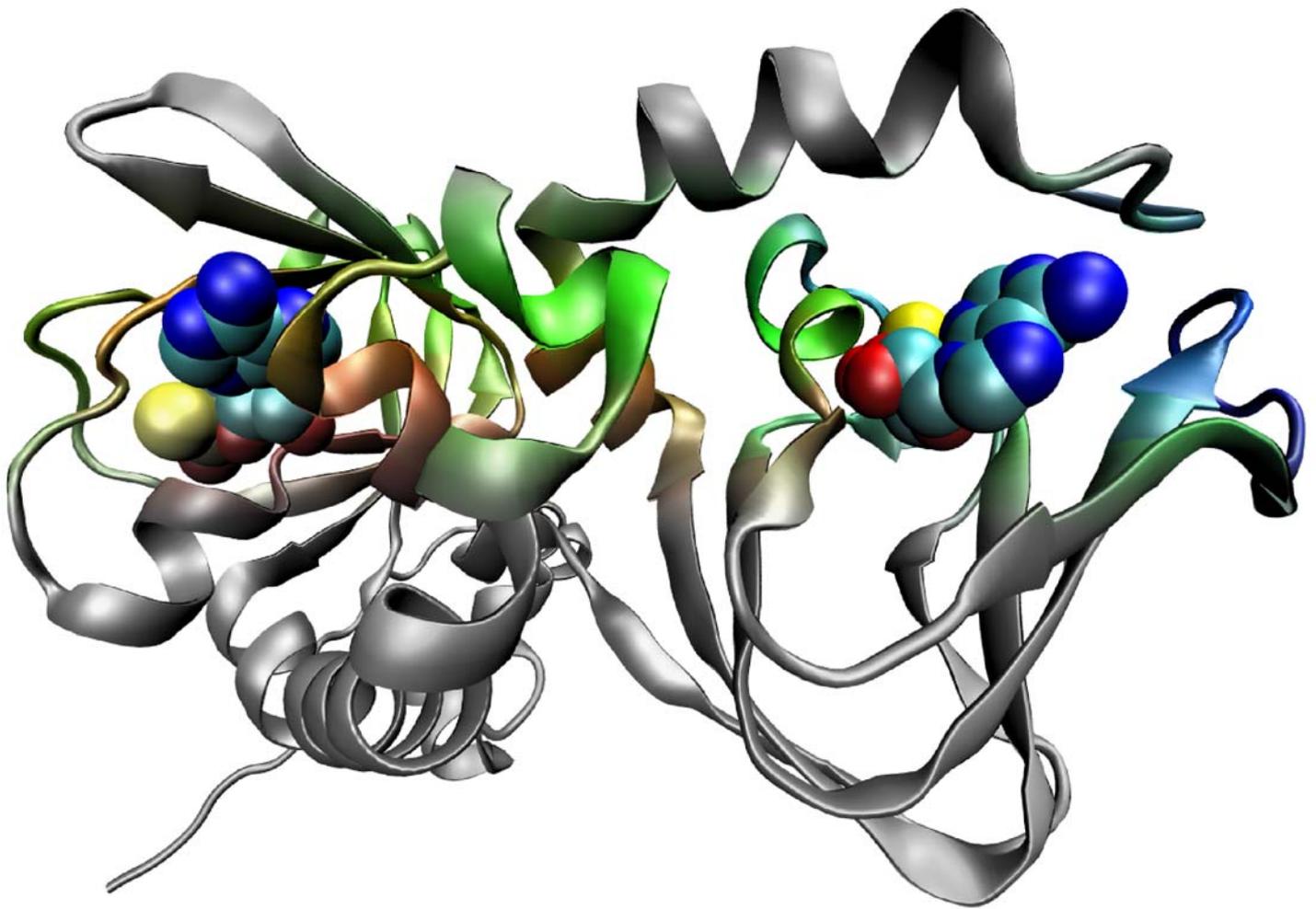


Molekulare Mechanismen der cAMP-vermittelten Signaltransduktion



Daniela Moll

Molekulare Mechanismen der cAMP-vermittelten Signaltransduktion

Kumulative Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

angefertigt im

Fachbereich 18 – Naturwissenschaften
Abteilung Biochemie
der Universität Kassel

vorgelegt von
Daniela Moll

Kassel
Mai 2007

Umschlag:

Struktur der monomeren regulatorischen Untereinheit der PKA (bRI α 109-376, PDB No 1RGS, (Su *et al.* 1995)). Das gebundene cAMP in den beiden Bindetaschen (CNB-A links, CNB-B rechts) ist farblich hervorgehoben. Die Farbgebung des cAMP (dargestellt durch seinen Van-der-Waals-Radius) entspricht dem cpk-Schema. Die Bindetaschen wurden nach dem beta-Faktor farblich markiert. Die Visualisierung erfolgte mit VMD 1.8.5 (Humphrey *et al.* 1996)

Referent: Prof. Friedrich W. Herberg

Koreferent: Dr. Christian Hammann

1. Prüfer Prof. Friedrich W. Herberg

2. Prüfer Dr. Christian Hammann

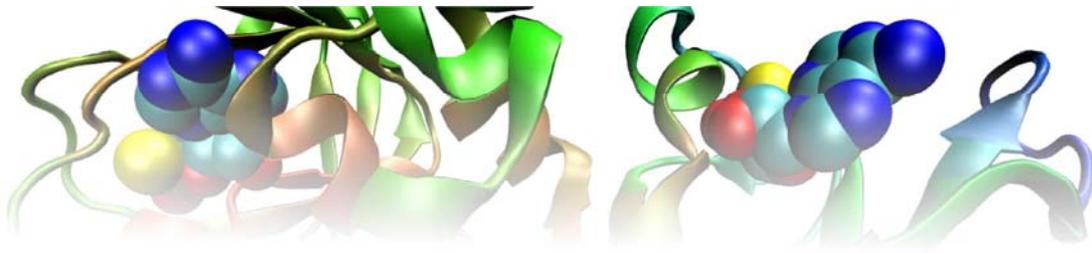
3. Prüfer Prof. Hartmut Follmann

4. Prüfer Prof. Christian Herrmann



**Fehlerfrei um jeden Preis?
Hätte sich die erste lebende
Zelle immer fehlerfrei vermehrt,
die Welt wäre heute noch ausschließlich
von Einzellern bevölkert!**

Bild und Text aus: „Direkt nach vorn...“
-©Peter Hohl-
deutscher Journalist und Verleger, Redakteur,
Moderator und Aphoristiker
*29.07.1941 (Karlsruhe)



DISSERTATION BEDEUTET...

Dissertation bedeutet wissenschaftliche Diskussion, zu einer Diskussion gehören mindestens zwei. Ich hatte das Glück, dass mein Doktorvater Prof. „Fritz“ Herberg zu jeder Zeit sowohl für forschungsrelevante als auch für persönliche Themen ein offenes Ohr hatte und meinen wissenschaftlichen Werdegang maßgeblich beeinflusst und gelenkt hat. Dafür und für das in mich gesetzte Vertrauen gilt ihm mein besonderer Dank.

Dissertation bedeutet seinen Horizont zu erweitern. Dr. Christian Hammann hat mir in vielen konstruktiven wie anregenden Gesprächen gezeigt, die Dinge auch mal aus einem anderen (besseren) Blickwinkel zu betrachten. Dafür, für die Mitnutzung der ITC, die jederzeit offene Tür und die gemeinsamen Stunden vor dem PC wie auch die Bereitschaft für meine Dissertation das Zweitgutachten zu übernehmen, ganz herzlichen Dank.

Für die überspringende Begeisterung in der Lehre und für manchen guten Ratschlag, sowie für die bereitwillige Übernahme des Dritprüfers möchte ich mich bei Prof. Dr. Follmann bedanken.

Prof. Dr. Herrmann war mir eine Hilfe in ITC-Notsituationen. Ein herzliches Dankeschön für die Bestärkung, die Thermodynamik biologischer Prozesse trotz ihrer Tücken nicht aus den Augen zu verlieren und die Übernahme des vierten Prüfers in dieser Dissertation.

Dissertation bedeutet nicht nur zusammen arbeiten. Vielen Dank allen Mitgliedern und ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe Biochemie in Kassel für die freundschaftliche Atmosphäre. Die ausnehmend gute Zusammenarbeit im Labor und bei den Publikationen, besonderer Dank gilt hierbei Sonja Schweinsberg, Anke Prinz und Frank Gesellchen, hat sehr viel Spaß gemacht. Ein herzlicher Dank gilt auch den Mädels aus dem Dipl-Doc Raum (auch liebevoll Hormonzimmer genannt), in dem ich mich die ganze Zeit sehr wohl gefühlt habe und meine Schokoladensucht auf vollstes Verständnis traf. Dem guten Geist im Sekretariat, Susanne „Sumi“ Minhöfer vielen Dank für die täglichen Sachen, ohne die die Abteilung nicht funktionieren würde und das gute Teamwork zwischen uns.

Dissertation bedeutet Wissen zu teilen und zu vermitteln. Viel Dank geht an meine zahlreichen 6-wöchigen Praktikanten, ich habe jedes Mal sehr viel von Euch gelernt und ich möchte kein einziges Praktikum missen. Besonders möchte ich mich bedanken bei Michael Krieg, meinem Fleisch gewordenen Pipettierroboter, für die Unterstützung bei der Etablierung

der FP-Bindungsstudien. Marko Knoll für die Mitarbeit mit den verschiedenen Agarosen, Katja Eildermann (die EndNote Göttin) und Katrin Guske (die KinetXBase Göttin) für Euren nie endenden wollenden Optimismus und die gemeinsamen thermodynamischen Arbeiten. Sara Müller und Benjamin Boesler für Euren Einsatz bei der Schweinegehirn-Präparation. Sara außerdem ein dickes Danke, dass unser Teamwork für einen Schülerversuch mich der Didaktik ein wenig näher gebracht hat.

Dissertation bedeutet Kooperationen aufbauen und pflegen. Ohne meine Kooperationen wäre die Zeit meiner Dissertation um einiges farbloser geworden! Danke an das Labor von Stein Ove Doskeland (Norwegen), speziell Kristin Viste und der Familie Christensen, die mir grenzübergreifende Einblicke in den Laboralltag und das Leben in Norwegen ermöglicht haben. Sowohl dem Labor und den Mitarbeitern von Fred Wittinghofer am MPI Dortmund als auch von Thomas Jovin am MPI Göttingen für die Nutzung der Geräteausstattung wenn es brenzlich wurde. Danke an Cornelia Brendel (Universität Kassel, AG Salbeck, physikalische Chemie) für die Zusammenarbeit bei der physikalischen Charakterisierung der Pharos-Fluoreszenzfarbstoffe. Ein ganz herzlicher Dank geht an die Mitarbeiter des Projektes „Erstellung-eines-Datenbanksystems-das-auch-Naturwissenschaftlern-eingängig-ist“ der Firma MicroDiscovery GmbH (Berlin) für die immense Geduld und hervorragende Zusammenarbeit. Ohne die gute Teamarbeit mit der Firma Biolog Life Science Institute (Bremen) hätten viele meiner Ideen nie verwirklicht werden können, ganz besonderen Dank an Hans-Gottfried Genieser für seine aufgeschlossene Art. Frank Schwede ein herzliches Danke für die vielen liebgewonnenen, amüsanten und immer hilfreichen Telefongespräche. Der Firma Biaffin Danke für die gute Zusammenarbeit in allen Bereichen, der Bereitstellung von Geräten und Messzeit sowie die Hilfe bei Problemen mit den Biacore Messungen und insbesondere Stephan Drewianka für die vielen CSI Folgen, die meine Wochenenden immer verschönern.

Dissertation bedeutet Freundschaften über die Arbeit hinaus zu schließen: Ein dickes Dankeschön gilt der Donnerstags-Spiele Truppe (Listra, Corwyn, Gladys, Anrod, Tarika und Melynh) für spannende und entspannende Abende, Claudia Hahnefeld für die Einblicke in die Grauen der Laborwelt, Claudia & Jörg Jäger für die Freundschaft über Kassel hinaus, Michaela Hansch für den unermüdlichen Einsatz im Labor, egal was ich mir wieder ausgedacht hatte und das sofortige Anpacken. Michaela & Joachim Hansch für die Freundschaft in Kassel über das Labor hinaus. Nicole Burghardt für meine beste (und fairerweise meine einzige) Diplomandin, die das Isolab geliebt hat, mit mir aber auch überall hingefahren ist. Danke an Susanne Roth für den Spaß, den wir bei den Diskussionen über lustige cAMP-Agarosen hatten und schon mal im voraus haben werden, Antje Badel für ihr liebes Lächeln, die hilfsbereite Art und den

unermüdlischen Einsatz im Praktikum, Alexandra Kaupisch für die gemeinsamen Praktikumstage der letzten vier Jahre, die manchmal kein Ende finden wollten, Sonja Schweinsberg für ihren Beistand, als ich ihn am dringendsten brauchte (ich sage nur CD-Spektroskopie) und die daraus stetig gewachsene Freundschaft (nicht nur die Blumen vermissen dich noch immer, Sonja).

Den „Jungs aus dem Ruhrpott“ (Heiko Löb, Toni Teckentrupp und Dirk Ruhlig) vielen herzlichen Dank, dass ihr mich nicht vergessen habt, als ich den „Pott“ so abrupt mit Sack und Pack verlassen habe.

Danke den üblichen Verdächtigen im IronFit und IronBack Team für die gemeinsamen Stunden des Schwitzens und des Muskelkaters, besonders natürlich unserer Trainerin Sylke Meyer, die mir immer wieder hilft, den inneren Schweinehund zu überwinden (*IhrMüsstDasGenießen!*). Danke (Kris)Tina Frey für die neue Erfahrung, was es heißt, „selbstständig“ zu sein und für die schicks(a)alhafte Zeit mit Euch, auf das noch viele gemeinsame Stunden folgen mögen. Den Frauen im Montags-Nähkurs ein ganz herzliches Danke für die liebevolle Aufnahme in Eure Gruppe und dafür, das wir so viel (Näh)Spaß zusammen haben.

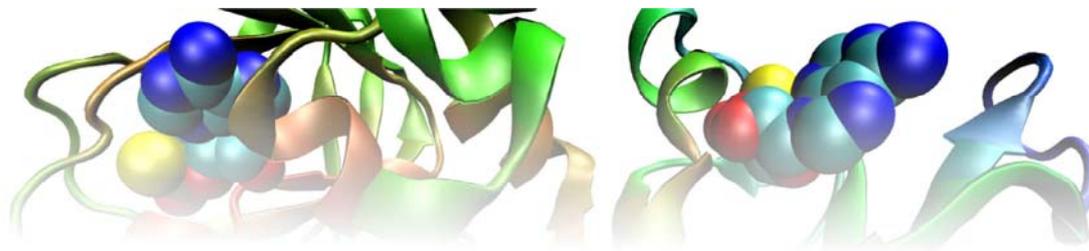
Dissertation bedeutet finanziert werden. Ohne die Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen, Danke dafür!

Dissertation bedeutet einen neuen Weg zu gehen. Dass ich diesen Weg überhaupt gehen konnte, verdanke ich maßgeblich meinen „Eltern“ Christa Moll und Detlef Martinke sowie meinen Großeltern Mémé Christel Beuken Gatzen und Opa Willi Moll. Danke, dass Ihr immer, jeder auf seine Art, an mich geglaubt habt, selbst wenn ich es selber nicht mehr getan habe.

Danke auch an meine „Schwieger“familie Uschi und Heinz Bertinetti sowie Claudia, Hendrik und Johanna Merz. Ihr habt mich vom ersten Tag an in Eure Familie aufgenommen, das bedeutet mir sehr viel und ich habe Euch alle sehr ins Herz geschlossen! Und nun gehört auch Frank Kößmeier mit seiner ureigenen Art zu dieser Familie dazu, mit allen Freuden und Pflichten.

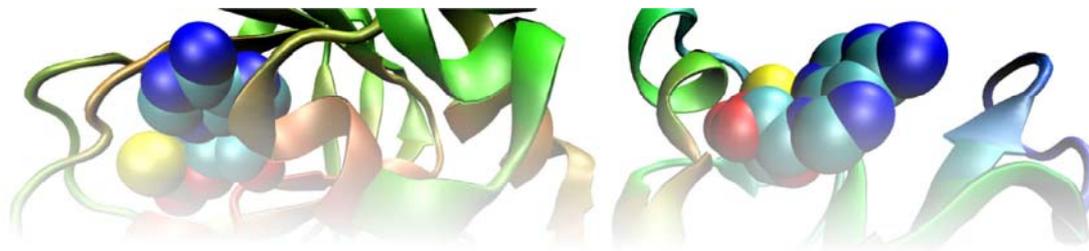
Der letzte aber auch wichtigste Dank gilt meiner besseren Hälfte Oli(ver) Bertinetti, der es immer wieder versteht, mich zum Lachen zu bringen und mein fester Fels in der Brandung ist, ich hätte es ohne Dich nie geschafft! Danke für das Leben mit Dir, ich kann mir nichts Schöneres vorstellen.

Dissertation bedeutet wissenschaftlich Arbeiten, besonders zum Erlangen der Doktorwürde (Fremdwörterlexikon, Wahrig, 1991). Für mich bedeutet Dissertation viel, sehr viel mehr!



INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	i
Liste der eigenen Publikationen.....	1
1. Einleitung	1
1.1 Die cAMP-vermittelte Signaltransduktion.....	1
1.2 Rolle der Proteinkinasen in der Signaltransduktion.....	5
1.3 Die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA)	6
1.3.1 Die katalytischen Untereinheiten der PKA	7
1.3.2 Die regulatorischen Untereinheiten der PKA.....	8
1.3.3 Bindung von zyklischen Nukleotiden an die PKA.....	13
1.4 Lokalisation und Regulation der PKA über Ankerproteine	21
2. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit und Untersuchungsstrategien	23
3. Kurzprofile der Manuskripte und Abgrenzung der Eigenanteile	24
4. Manuskripte.....	31
Publikation I	31
Publikation II.....	43
Publikation III.....	59
Publikation IV	79
Publikation V.....	91
Publikation VI	129
Artikel I.....	159
Artikel II	165
5. Diskussion.....	181
5.1 Methoden für proteomische Studien – Eine Übersicht.....	181
5.1.1 Biomolekulare Interaktionsanalysen als ein Werkzeug der funktionellen Proteomforschung	183
5.1.2 Thermodynamische Betrachtungen von Protein-Ligand-Wechselwirkungen	192
5.1.3 Neue membranpermeable Fluorophore ermöglichen die Untersuchung der cAMP-Dynamik <i>in vivo</i>	196
5.1.4 Interaktions-Datenbanken.....	198
5.2 Rationales Design von cAMP-Analoga und ihre Anwendung.....	199
5.2.1 Neue cAMP-Analoga zur Reinigung aller Isoformen der regulatorischen Untereinheit.....	199
5.2.2 Interactomics: Die systematische Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen	201
5.2.3 Anreicherung von cAMP-bindenden Proteinen mit ihren natürlichen Interaktionspartnern	203
5.2.4 Anreicherung des intakten Holoenzymkomplexes der PKA mit seinen natürlichen Interaktionspartnern.....	206
5.3 Untersuchungen zum Mechanismus der Aktivierung von PKA	209
6. Zusammenfassung.....	214
7. Summary	215
8. Literaturverzeichnis.....	216
9. Anhang.....	237
9.1 Abkürzungsverzeichnis.....	237
9.2 Zyklonukleotid-Strukturen	239
9.3 Detaillierte Daten zu den Interactomics-Studien	245
Erklärung	249



LISTE DER EIGENEN PUBLIKATIONEN

PUBLIKATION I

Hahnefeld, C., Moll, D., Götte, M. and Herberg, F.W. (2005)

„Rearrangements in a hydrophobic core region mediate cAMP action in the regulatory subunit of PKA.“

Biological Chemistry **386** (7): 623-631

PUBLIKATION II

Moll, D., Zimmermann, B., Gesellchen, F. and Herberg, F.W. (2006)

„Current developments for the *in vitro* characterization of protein interactions.“

Proteomics in drug research Wiley-VCH Verlag: 159-172

PUBLIKATION III

Moll, D., Prinz, A., Gesellchen, F., Drewianka, S., Zimmermann, B. and Herberg, F.W. (2006)

„Biomolecular interaction analysis in functional proteomics.“

Journal of Neural Transmission **113** (8) 1015-1032

PUBLIKATION IV

Moll, D., Schweinsberg, S., Hammann, C. and Herberg, F.W. (2007)

“Comparative thermodynamic analysis of cyclic nucleotide binding to Protein Kinase A.”

Biological Chemistry **388** 163-172

PUBLIKATION V

Moll, D., Schweinsberg, S., Schwede, F., Bertinetti, O., Drewianka, S., Genieser, H.-G., Herberg, F.W.

„Chemical Tools for the selective Purification of Components of cAMP Signalling Pathways.“

Manuskript

PUBLIKATION VI

Moll, D., Prinz, A., Brendel, C.M., Berrera, M., Zaccolo, M., Genieser, H.-G., and Herberg, F.W.

“Biochemical and cellular visualization of a novel membrane permeable fluorescent cAMP analog.”

Manuskript

ARTIKEL I

Moll, D., Schweinsberg, S., and Herberg, F.W. (2006)

“Biomolekulare Interaktionsanalyse - Ein Werkzeug der funktionellen Proteomforschung?”

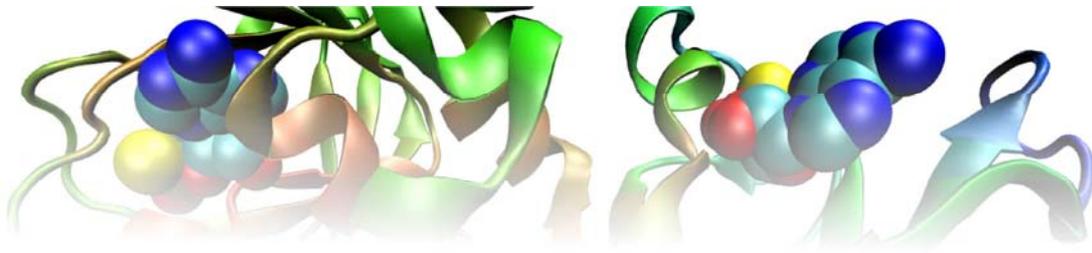
Bioforum **3** (29): 28-30

ARTIKEL II

Müller, S., Kromke, M., Vogt, H. and Moll, D. (in press)

“Enzymkinetik in der Schule – Michaelis-Menten-Kinetik von Urease.”

Biologie in unserer Zeit



1. EINLEITUNG

Jede zelluläre Funktion eines komplexen Organismus, wie z.B. Metabolismus- und Genregulation, Proliferations-Status, Zytoskelettorganisation, Zellzyklus und Apoptose, wird durch externe Signale reguliert (Pawson *et al.* 2000). Die Prinzipien der Signaltransduktion werden seit über 50 Jahren intensiv untersucht und stellen das zelluläre Konzept der Kommunikation und Regulation dar. In der Signaltransduktion werden extra- und interzelluläre Signale von Rezeptoren der Zelle registriert, intrazellulär amplifiziert und durch Reaktionskaskaden in der Zelle umgesetzt. Als extrazelluläre Signale sind z.B. niedermolekulare primäre Botenstoffe wie Hormone, Zytokine, Ionen und Neurotransmitter, aber auch sensorische Signale wie Wärme, Licht, elektrische und mechanische Reize bekannt. Intrazellulär werden Signale durch Protein-Protein Interaktionen aber auch durch sekundäre Botenstoffe, wie z.B. cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat), cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat) und Ca^{2+} -Ionen weitergeleitet.

1.1 DIE cAMP-VERMITTELTE SIGNALTRANSDUKTION

Der sekundäre Botenstoff cAMP reguliert bei Säugern mindestens ein Enzym in jedem metabolischen Signalweg (Antoni 2000; Newton *et al.* 2004) und gilt als Prototyp eines sekundären Botenstoffes (Chin *et al.* 2002; Newton *et al.* 2004). Für die Entdeckung und Erforschung der cAMP-vermittelten Signaltransduktionswege wurden mittlerweile drei Nobelpreise verliehen:

Der erste Nobelpreis ging 1971 an Earl W. Sutherland für die Entdeckung des Prinzips von sekundären Botenstoffen und der Rolle von cAMP im Glykogen-Stoffwechsel (Sutherland 1971). Dann 1992 an Edmond Fischer und Edwin Krebs für die Entdeckung des Prinzips der reversiblen Proteinphosphorylierung durch die cAMP-abhängige Proteinkinase und die daraus resultierende Regulation von biologischen Prozessen (Fischer 1992; Krebs 1992), und schließlich 1994 an Alfred Gilman und Martin Rodbell für die Entdeckung von G-Proteinen und ihrer Rolle in der cAMP-vermittelten eukaryotischen Signaltransduktion (Gilman 1994; Rodbell 1994).

Die Signalübertragung über das cAMP-System ist ein brillant einfaches aber effizientes Prinzip um ein extrazelluläres Signal intrazellulär zu amplifizieren und weiter zu leiten (Abbildung 1.1). Der klassische cAMP-Signalweg beginnt bei der Bindung eines extrazellulären primären Botenstoffes (z.B. des Hormons Adrenalin) an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (*G protein coupled receptor*, GPCR, z.B. β -adrenerger Rezeptor), der mit sieben α -Helix Domänen (7-Transmembran-Rezeptor) die Membran durchspannt ((Lefkowitz 2004; Robidoux *et al.* 2004; Jacoby *et al.* 2006), Abbildung 1.1) Der aktivierte β -adrenerge Rezeptor bindet an ein membranassoziiertes, heterotrimeres G_s -Protein (stimulierendes Guaninnukleotid-bindendes Protein), bestehend aus jeweils einer α - und $\beta\gamma$ -Untereinheit (Luttrell *et al.* 2003). Die inaktive (GDP gebundene) $G\alpha$ -Untereinheit tauscht auf dieses Signal hin das GDP gegen GTP aus und initiiert damit seine Dissoziation von der $G\beta\gamma$ -Untereinheit und dem GPCR (Vetter *et al.* 2001). Die $G\alpha$ -Untereinheit aktiviert dann transmembranassoziierte Adenylylzyklasen (tmAC), die an der zytosolischen Seite der Membran cAMP aus Adenosintriphosphat (ATP) synthetisieren (Lipkin *et al.* 1959; Taussig *et al.* 1995). Die freigesetzte $G\beta\gamma$ -Untereinheit besitzt, wie die $G\alpha$ -Untereinheit, regulatorische Funktionen, zu denen unter anderem die Inhibierung von tmAC gehören (Katada *et al.* 1984a; Katada *et al.* 1984b; Clapham *et al.* 1993; Birnbaumer 2007). Die Termination des Synthesesignals erfolgt durch die GTPase Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit und die Reassoziierung zum heterotrimeren G-Protein. Eine Amplifikation des extrazellulären Signals wird einmal über den GPCR erreicht, der mehrere G-Proteine aktivieren kann sowie über die Synthese von cAMP durch die tmAC.

Ein zweiter, noch nicht so lange bekannter, Signalweg zur cAMP-Synthese in Säugetieren läuft über die Aktivierung von ubiquitär vorkommenden zytosolischen Adenylylzyklasen (zyAC) (Buck *et al.* 1999; Chen *et al.* 2000; Sinclair *et al.* 2000; Kamenetsky *et al.* 2006). Diese zyAC werden (anscheinend) durch Bicarbonat (Chen *et al.* 2000) und Ca^{2+} -Ionen (Jaiswal *et al.* 2003; Litvin *et al.* 2003) aktiviert und sind insensitive gegenüber der Regulation durch G-Proteine sowie einer Stimulation durch Foscilin, worauf nur die tmAC reagieren (Buck *et al.* 1999). Die zyAC sind an diskreten sub-zellulären Kompartimenten im Zytosol, wie z.B. Mitochondrien und Mikrotubuli lokalisiert (Zippin *et al.* 2003). Die Phosphodiesterasen (PDE) terminieren das cAMP-Signal durch die Hydrolyse und damit Inaktivierung des sekundären Botenstoffes. Es gibt 11 verschiedene PDE-Familien mit einer Vielzahl von verschiedenen Isoformen (insgesamt bis zu 100 (Conti *et al.* 2007)), die signifikant unterschiedliche zelluläre Verteilung, Nukleotidspezifität (cAMP, cGMP) und kinetische Eigenschaften (K_m von 0,02-120 μ M, (Omori *et al.* 2007)) aufweisen. (Für eine Übersicht der PDE Familien siehe (Omori *et al.*

2007)). Die cAMP-Synthese und Degradation in der Zelle kann aufgrund der Vielzahl von Enzym-Isoformen der beteiligten Interaktionskaskaden auf bis zu mehreren hundert verschiedenen Wegen ablaufen (Antoni 2000). Dies gewährleistet eine sehr feine zeitliche und räumliche Modulation des cAMP-Signals (Beavo *et al.* 2002).

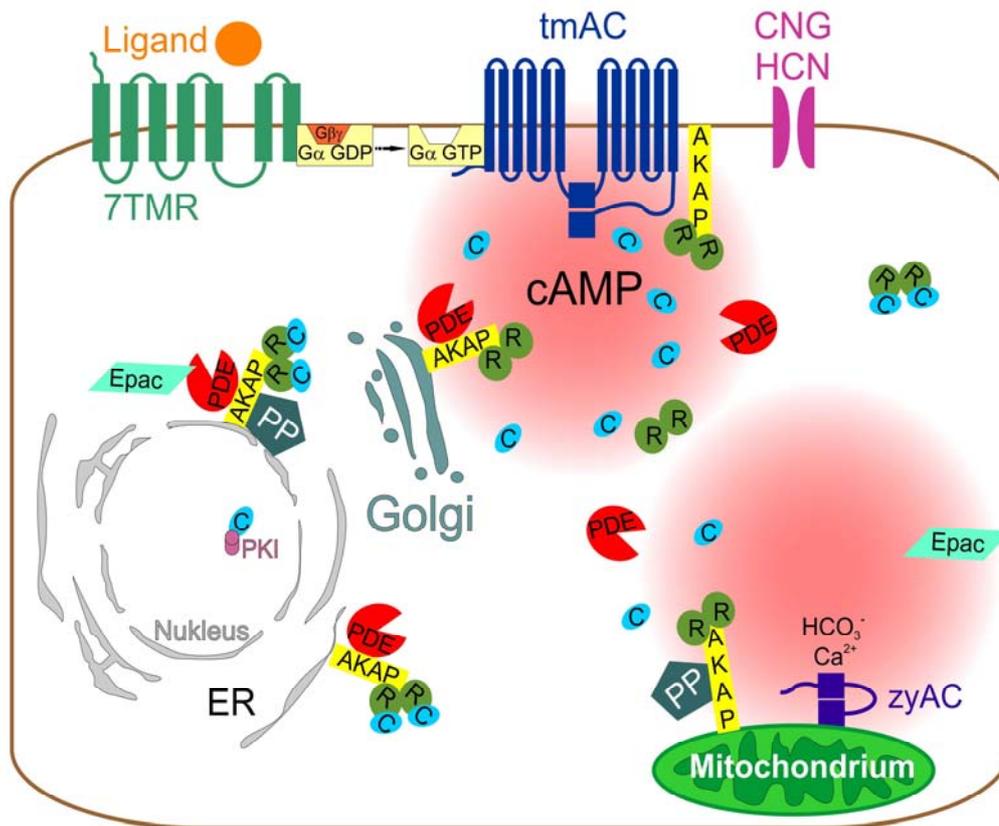


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der cAMP-vermittelten Signaltransduktion in der eukaryotischen Zelle.

Die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne eines 7-Transmembran-Rezeptors (7TMR) induziert in der zytoplasmatischen Domäne eine Konformationsänderung. Hier bindet nun das stimulierende Guaninnukleotid-bindende Protein (Gα- und Gβγ-Untereinheit) und tauscht gebundenes GDP gegen GTP aus. Durch die Bindung der Gα•GTP-Untereinheit an eine transmembranassoziierte Adenylylzyklase (tmAC) wird diese aktiviert und synthetisiert den sekundären Botenstoff cAMP. cAMP kann auch durch zytosolische Adenylylcyclasen (zyAC) synthetisiert werden, die an sub-zellulären Kompartimenten wie z.B. dem Mitochondrium verankert sein können. Aktiviert werden die zyAC durch Bicarbonat (HCO₃⁻) und Ca²⁺-Ionen. Mittels A-Kinase-Ankerproteinen (AKAP) werden viele Komponenten der cAMP-Signaltransduktion als auch der Signaltermination an Zellkompartimente wie das endoplasmatische Reticulum (ER), Golgi-Apparat (Golgi) und Nucleus lokalisiert. Die Signaltransduktion wird durch (1) die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), bestehend aus jeweils zwei katalytischen (C)- und regulatorischen (R)-Untereinheiten, (2) den zyklonukleotidregulierten Guaninnukleotid-Austauschfaktor (Epac), (3) die zyklonukleotidregulierten Ionenkanäle (CNG: *cyclic nucleotide gated ion channel* und HCN: *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated channel*) vermittelt. Die PKA wird durch die Bindung von cAMP an die R-Untereinheit aktiviert, indem die C-Untereinheit abdissoziiert. Die C-Untereinheit kann daraufhin Substrate im Zytoplasma und im Nucleus phosphorylieren. Durch den hitzestabile Proteinkinaseinhibitor (PKI) wird die C-Untereinheit aus dem Nucleus transportiert. Die Signaltermination erfolgt durch die cAMP-abbauenden Phosphodiesterasen (PDE) und die Protein-Phosphatasen (PP).

Prinzipiell kann cAMP als weitreichender sekundärer Botenstoff frei durch die Zelle diffundieren, aber durch die Expression und Aktivität der AC und PDE sowie physikalische Diffusionsbarrieren wie Membranen und Organellen ist die zelluläre cAMP-Verteilung auf sogenannte cAMP-Mikrodomänen begrenzt (Abbildung 1.1, (Kasai *et al.* 1994; Rich *et al.* 2001b; Tasken *et al.* 2004; Cooper 2005)). Auf der Grundlage von *in vivo* Experimenten (Barsony *et al.* 1990; Bacskai *et al.* 1993; Zaccolo *et al.* 2002) und einem theoretischen Modell (Iancu *et al.* 2007) wurde in Zellen die cAMP-Lokalisation in Form eines cAMP-Gradienten beschrieben, der lokal hohe cAMP-Konzentrationen aufweisen kann (bis zu 1 μ M, (Iancu *et al.* 2007)).

Die cAMP-Bindung von Proteinen erfolgt vom Bakterium bis zum Menschen über ein hochkonserviertes cAMP-Bindemotiv (*cyclic nucleotide-binding domain*, CNB, (Berman *et al.* 2005; Das *et al.* 2007a)). In dem Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) reguliert der cAMP-abhängige Transkriptionsfaktor CAP (*catabolite activator protein*, auch bekannt als *cAMP receptor protein*, CRP) über 150 Promotoren (Lawson *et al.* 2004).

In Säugetieren sind bisher vier durch cAMP-regulierte Proteine bekannt. Der zyklonukleotid-regulierte Guaninnukleotid-Austauschfaktor Epac (*exchange protein directly activated by cAMP*, *cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor*, cAMP-GEF) wird durch cAMP aktiviert und katalysiert dann den Austausch von GDP zu GTP an Rap-1 und Rap-2, zwei kleinen Ras-homologen GTP-bindenden Proteinen (de Rooij *et al.* 2000).

Die beiden zyklonukleotidabhängigen Ionenkanäle CNG und HCN (*cyclic nucleotide gated ion channel* und *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated channel*) werden durch Zyklonukleotide unterschiedlich reguliert. Der CNG wird in Photorezeptoren durch cGMP bzw. in olfaktorischen Neuronen durch cAMP aktiviert und öffnet daraufhin seine Kationenkanaldomäne, die nun das primäre elektrische Signal generieren (Craven *et al.* 2006). Im Gegensatz dazu werden die HCN (auch „Schrittmacherkanäle“ genannt) durch die Bindung von Zyklonukleotiden lediglich moduliert, d.h. die Aktivierung erfolgt hier durch Hyperpolarisation aufgrund von Aktionspotentialen (Craven *et al.* 2006).

In Säugerzellen ist der unbestrittene Hauptwirkort für cAMP jedoch die regulatorische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA, Proteinkinase A, siehe 1.2).

In Pflanzen übernehmen zyklische Nukleotide (und speziell cAMP) vergleichbare zelluläre Funktionen wie in Säugetieren (Newton *et al.* 2004). Allerdings konnte bisher keine pflanzliche cAMP-abhängige Proteinkinase isoliert werden (Newton *et al.* 2004), obwohl 4% des pflanzlichen Genoms für Proteinkinasen kodieren (Niedner *et al.* 2006).

1.2 ROLLE DER PROTEINKINASEN IN DER SIGNALTRANSDUKTION

Nach Schätzungen, die auf Analysen humaner cDNA-Sequenzen und EST-(*expressed sequence tag*) Analysen basieren, beträgt die Anzahl putativer humaner Proteinkinasen 518, was in etwa 1,2 % des menschlichen Genoms entspricht (Manning *et al.* 2002b; Manning *et al.* 2002a). Proteinkinasen katalysieren den reversiblen Transfer des γ -Phosphats von ATP auf Substratproteine. Diese posttranslationale Modifikation (PTM) kann an ca. 30% eines Proteoms angebracht werden (Cohen 2000; Ficarro *et al.* 2002; Manning *et al.* 2002a; Johnson *et al.* 2005). Durch die Phosphorylierung erhöht sich die Oberflächenladung des Substrats, was zu einer Konformationsänderung führen kann, wodurch z.B. bei Enzymen oft deren Aktivität an- bzw. abgeschaltet wird (Johnson *et al.* 2001b; Newton *et al.* 2004). Somit können Proteinkinasen durch Phosphorylierung bis zu mehrere 10.000 Proteine in einer eukaryotischen Zelle modulieren (Taylor *et al.* 2004). Hierzu gehört die Regulation zellulärer Prozesse wie z.B. des Stoffwechsels, der Zellzyklus-Phasen und der Transkription. Phosphorylierungsereignisse sind integraler Bestandteil der Stressantwort und sind essentiell für die Gedächtnisbildung sowie die Immunantwort und sind direkt involviert in den Apoptosesignalweg (Hunter 2000). Globale Analysen von Proteinphosphorylierungen geben erste Einblicke in die Komplexität der Kinase-regulierten Signalwege (Johnson *et al.* 2005; Ptacek *et al.* 2005). Der Gegenspieler der Proteinkinasen sind die Proteinphosphatasen, welche die Phosphatgruppe von Substraten wieder abspalten und somit das Phosphorylierungssignal terminieren (Hunter 1995; Gold *et al.* 2006a). Die Proteinphosphatasen werden klassifiziert nach ihrer Aminosäuresequenz, Struktur und dem verwendeten katalytischen Mechanismus (Moorhead *et al.* 2007). Es gibt die Familie der Protein-Serin-Threonin-Phosphatasen, Protein-Tyrosin-Phosphatasen und die Phosphatasen, deren katalytischer Mechanismus auf Aspartat beruht (Moorhead *et al.* 2007).

Die meisten, wenn nicht alle, malignen Tumorerkrankungen sind auf Fehlfunktionen von Kinasen oder Phosphatasen zurückzuführen (Cho-Chung *et al.* 1995; Blume-Jensen *et al.* 2001; Sachsenmaier 2001; Arena *et al.* 2005; Moorhead *et al.* 2007). Bisher sind 10-20% aller Proteinkinasen als *drug targets* (Ansatzpunkte für Medikamente) identifiziert worden (Cohen 2002; Burke *et al.* 2003; Sebolt-Leopold *et al.* 2004; Naula *et al.* 2005). Mittlerweile gibt es fünf zugelassene Medikamente gegen die katalytische Domäne von 18 verschiedenen Proteinkinasen (Overington *et al.* 2006).

1.3 DIE CAMP-ABHÄNGIGE PROTEINKINASE (PKA)

Die meisten biologischen Effekte des sekundären Botenstoffs cAMP werden in Säugetieren durch die Proteinkinase A (PKA) vermittelt (Johnson *et al.* 2001a). Die PKA gehört nach der Nomenklatur von Hanks zur Familie der Serin/Threoninkinasen und zählt innerhalb dieser Gruppe zu den AGC-Kinasen (Hanks *et al.* 1988; Parker *et al.* 2001; Manning *et al.* 2002b; Traincard *et al.* 2004). Das Kürzel „AGC“ leitet sich von den drei Hauptvertretern dieser Gruppe ab: cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) und Proteinkinase C (PKC).

Das inaktive PKA Heterotetramer (Holoenzymkomplex) besteht aus zwei katalytischen (C) und zwei dimerisierten regulatorischen (R) Untereinheiten. Die Bindung von jeweils zwei Molekülen cAMP an jede R-Untereinheit führt zu einer Konformationsänderung, die zur Aktivierung der C-Untereinheiten führt. Die aktive C-Untereinheit phosphoryliert Substrate sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus, wohin die R-Untereinheit aufgrund ihrer Größe nicht gelangen kann. Die R-Untereinheiten dienen nicht nur zur Regulation der Aktivität durch cAMP, sondern vermitteln über die Bindung an sogenannte A-Kinase-Ankerproteine (AKAP, siehe 1.4) die Lokalisation des Holoenzymkomplexes an Zellorganellen (Smith *et al.* 2006) sowie an die zelluläre Matrix (Carlson *et al.* 2001).

Eine weitere bekannte physiologische Regulation der PKA-Aktivität erfolgt durch die hochaffine Bindung des aktiven Zentrums der C-Untereinheit an den hitzestabilen Proteinkinaseinhibitor PKI (Posner *et al.* 1964; Walsh *et al.* 1971; Demaille *et al.* 1978). Durch das Kernexportsignal des PKI wird die C-Untereinheit aktiv aus dem Zellkern transportiert und damit die Initiation der cAMP-abhängigen Genexpression verhindert (Fantozzi *et al.* 1994; Wen *et al.* 1995a). Die Expression sowie die intrazelluläre Verteilung von PKI sind zellzyklus-abhängig (Wen *et al.* 1995b).

Die PKA gilt als die am besten charakterisierte Kinase (und damit als Modellsystem für Kinasen). Sie ist aus relativ kleinen (jeweils um die 40 kDa) und gut zu exprimierenden Untereinheiten aufgebaut, die konservierte katalytische Kernregion macht fast die gesamte C-Untereinheit aus, es gibt Kristallstrukturen in verschiedenen Konformationen sowohl mit Substraten als auch mit Inhibitoren und es wurde an der PKA die bilobiale Struktur entdeckt, die den Kinasen gemeinsam ist (Shoji *et al.* 1983; Knighton *et al.* 1991b; Knighton *et al.* 1991a; Zheng *et al.* 1991; Bossemeyer *et al.* 1993; Narayana *et al.* 1999; Johnson *et al.* 2001a; Taylor *et al.* 2005).

1.3.1 DIE KATALYTISCHEN UNTEREINHEITEN DER PKA

Bisher sind beim Menschen elf Isoformen (inklusive Spleißvarianten) der C-Untereinheit bekannt: C α 1 (human, entspricht der murinen C α (Shoji *et al.* 1981; Uhler *et al.* 1986b; Maldonado *et al.* 1988)), C α 2 (entspricht C α s (Thomis *et al.* 1992; Desseyn *et al.* 2000; Reinton *et al.* 2000a; Reinton *et al.* 2000b; Nolan *et al.* 2004)), die Klasse der C β -Isoformen, die alle durch alternatives Spleißen der mRNA entstehen, C β 1, C β 2, C β 3, C β 4, C β 4ab, C β 4abc (Showers *et al.* 1986; Uhler *et al.* 1986a; Wiemann *et al.* 1991; Guthrie *et al.* 1997; Orstavik *et al.* 2001), sowie C γ (Beebe *et al.* 1990; Beebe *et al.* 1992; Reinton *et al.* 1998; Zhang *et al.* 2004), PrKX (Klink *et al.* 1995; Chiorini *et al.* 1998; Zimmermann *et al.* 1999) und PrKY (Schiebel *et al.* 1997a; Schiebel *et al.* 1997b). Diese Isoformen (ausgenommen PrKY) der C-Untereinheit weisen eine sehr konservierte katalytische Kernregion auf, die auch innerhalb der Kinasen hochkonserviert vorliegt (Hanks *et al.* 1991; Taylor *et al.* 2006). Dagegen sind die strukturellen Unterschiede hauptsächlich im Amino- und Carboxy-Terminus zu finden. C α 1 und C β 1 sind in allen untersuchten Geweben ubiquitär exprimiert, während das Vorkommen von C β 2 weitestgehend auf Herz, Gehirn und lymphoide Gewebe wie Milz und Thymus beschränkt ist (Uhler *et al.* 1986a; Thullner *et al.* 2000; Orstavik *et al.* 2001; Orstavik *et al.* 2005). Die Isoformen C α 2 und C γ konnten bisher nur in Hodengewebe nachgewiesen werden (Beebe *et al.* 1990; Nolan *et al.* 2004). Über die mögliche Expression und Funktion von PrKX wird bis heute kontrovers diskutiert, wobei die Rolle von PrKX in der embryonalen Entwicklung besonders im Mittelpunkt steht (Klink *et al.* 1995; Semizarov *et al.* 1998; Li *et al.* 2002; Junttila *et al.* 2003; Li *et al.* 2005). Ein Sequenzabbruch innerhalb der konservierten Kinasedomäne von PrKY, sowie ein nicht vorhandener Phänotyp bei Chromosomendeletion des Genlocus für PrKY, lässt auf ein Pseudogen schließen (Lattanzi *et al.* 2005; Jobling *et al.* 2007). Die verschiedenen C-Untereinheiten der PKA sind z.T. durch Deamidierung, (Auto)Phosphorylierung und aminoterminaler Myristoylierung posttranslational modifiziert (Clegg *et al.* 1989; Zheng *et al.* 1993; Kinzel *et al.* 2000; Johnson *et al.* 2001a; Tholey *et al.* 2001).

Prinzipiell besteht die katalytische Kernregion der C-Untereinheit (Aminosäuren 40-300 der C α (Taylor *et al.* 2005)) aus einem kleinen (vorzugsweise β -Faltblatt-Strukturen) und einem großen (vorzugsweise α -Helix Strukturen) Lobus. Zwischen beiden Loben befindet sich in einer hydrophoben Tasche die ATP/Mg²⁺- und die Substratbindestelle (Hanks *et al.* 1988; Hanks *et al.* 1991; Hanks *et al.* 1995). Die Flexibilität dieser beiden Loben zueinander vermittelt die

„offene“ bzw. „geschlossene“ Konformation der C-Untereinheit (Zheng *et al.* 1993). Mittlerweile zeichnet sich durch Sequenzvergleiche von Kinasen aus Eukaryoten und Prokaryoten ab, dass ein Set von 10 Aminosäuren in der katalytischen Domäne speziessübergreifend konserviert ist (Kannan *et al.* 2007). Für eine ausführliche Übersicht der PKA-Struktur siehe (Johnson *et al.* 2001a; Taylor *et al.* 2004; Taylor *et al.* 2005; Das *et al.* 2007b).

Die PKA phosphoryliert ein weites Spektrum an Substraten, mit dem generellen Phosphorylierungsmotiv Arg-(Arg/Lys)-X-(Ser/Thr), wobei X für eine beliebige Aminosäure steht und die Phosphorylierung des Serinrestes stark bevorzugt ist (Zetterqvist *et al.* 1976; Kemp *et al.* 1977; Kemp *et al.* 1990; Kennelly *et al.* 1991; Shabb 2001; Tasken *et al.* 2003; Vandecasteele *et al.* 2006). Zum Beispiel kann die C-Untereinheit der PKA einen Transkriptionsvorgang durch die Phosphorylierung des aktivierenden Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP response element binding protein*) am Ser133 initiieren (Gonzalez *et al.* 1989). Diese zielgerichtete Phosphorylierung bewirkt die Dimerisierung von CREB-P, welches dann die DNA am CRE (*cAMP response element*, Sequenz: TGACGTCA) binden kann. Die Interaktion von CREB-P mit CBP (*CREB binding protein*) startet dann die Transkription von zumeist Glukoneogenese assoziierten Proteinen (Montminy *et al.* 1990; De Cesare *et al.* 1999; Johannessen *et al.* 2004). Die Substratspezifität der PKA wird anscheinend weniger durch die C-Isoform selbst bestimmt als durch die Regulation ihrer Aktivität durch Expression, Bindung an die R-Untereinheit (siehe 1.3.2) und PKI, sowie durch ihre subzelluläre Lokalisation über AKAP und AKIP (siehe 1.4, (Scott *et al.* 1990)).

1.3.2 DIE REGULATORISCHEN UNTEREINHEITEN DER PKA

Die vier bekannten Isoformen der R-Untereinheit der PKA unterteilen sich klassischerweise in Typ I- und Typ II-Isoformen. Der Grund hierfür liegt in ihrem Elutionsverhalten bei der Reinigung über DEAE (Diethylaminoethyl-)Zellulose-Chromatographie (Reimann *et al.* 1971; Corbin *et al.* 1975). Neben den physikalischen Charakteristika wie Molekulargewicht, isoelektrischem Punkt unterscheiden sich die beiden Typen der R-Untereinheit in ihren Aminosäuresequenzen und in ihrer Gewebeverteilung (Canaves *et al.* 2002). Die beiden isoformen Typen werden jeweils noch in α - und β -Formen unterteilt. Jede dieser Isoformen wird durch ein eigenes Gen kodiert (nach (Rebhan *et al.* 1997)): RI α (17q23-24, (Lee *et al.* 1983; Titani *et al.* 1984; Sandberg *et al.* 1987)), RI β (7p22, (Clegg *et al.* 1988; Solberg *et al.* 1991; Solberg *et al.* 1992; Solberg *et al.* 1994)), RII α (3p21.3-21.2, (Takio *et al.* 1984; Scott *et*

al. 1987; Oyen *et al.* 1989)) und RII β (7q22, (Jahnsen *et al.* 1986; Levy *et al.* 1988; Solberg *et al.* 1992)). Die RI Untereinheiten weisen in der Aminosäuresequenz ca. 80% Homologie auf, während die RII Untereinheiten zu knapp 70% übereinstimmen (Clegg *et al.* 1988; Skalhegg *et al.* 2000). In höheren Eukaryoten erreicht die Identität der R-Untereinheiten zwischen den Spezies bis zu 98% (Tasken *et al.* 1997). Die RI(α)-Untereinheiten werden in Wachstumsstimulierten Zellen bevorzugt überexprimiert, während die RII-Isoformen meist in nicht proliferierendem Gewebe und in nicht wachsenden Zellen exprimiert werden (Cho-Chung *et al.* 1995; Tortora *et al.* 2002).

Generell werden die α -Isoformen ubiquitär exprimiert (Hofmann *et al.* 1975), während die β -Isoformen hauptsächlich im zentralen Nervensystem und in den Reproduktionszellen vorkommen (Uno *et al.* 1977; Jahnsen *et al.* 1985; Jahnsen *et al.* 1986; Clegg *et al.* 1988; Cadd *et al.* 1989). Die RI β -Isoform kommt primär im Gehirn und Rückenmark, aber auch im Hoden vor (Clegg *et al.* 1988; Cadd *et al.* 1989). Die RII β -Isoform ist hoch abundant in braunem und weißem Fettgewebe, in Gehirn und Rückenmark sowie in der Leber zu finden (Cadd *et al.* 1989; Cummings *et al.* 1996). Das Verhältnis der Isoformen zueinander ist jedoch nicht nur von der Lokalisation abhängig, sondern variiert zusätzlich noch stark innerhalb der Feinstruktur dieser Gewebe und wird zudem noch durch Spezies und Entwicklungsstatus beeinflusst (Hofmann *et al.* 1975; Corbin *et al.* 1977; Zoller *et al.* 1979; Cadd *et al.* 1989; Cho-Chung 2004; Neary *et al.* 2004; Cho-Chung *et al.* 2005).

An transgenen Mäusen, deren R-Isoformen durch zielgerichtete Mutagenese ausgeschaltet wurden (*knockout*- oder KO-Mäuse), konnten physiologische Funktionen der R-Isoformen untersucht werden. Die Deletion des RI α -Gens führt zu einer deutlichen Wachstumsverzögerung und ist im frühen embryonalen Stadium letal, da das Herzrohr nicht ausgebildet wird (Cummings *et al.* 1996; Chin *et al.* 2002; Stratakis *et al.* 2002). Die Expression einer RI α , die durch Mutationen in beiden cAMP-Bindetaschen insensitiver gegenüber cAMP ist, führte in Mäusen zu einer Reduktion der basalen sowie der cAMP-stimulierten PKA-Aktivität. Außerdem konnten Defizite im Langzeit- jedoch nicht im Kurzzeitgedächtnis nachgewiesen werden (Abel *et al.* 1997; Woo *et al.* 2000, 2003). Die Deletion des Gens für RI β führt über fehlerhafte Mechanismen in der Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD) im Gehirn zu Defekten im Lernverhalten und der Gedächtnisbildung (Brandon *et al.* 1995; Huang *et al.* 1995). Diese Mäuse zeigen des Weiteren reduzierten nozizeptiven Schmerz (vermittelt durch die Nozizeptoren, hervorgerufen durch Verletzungen) und eine herabgesetzte Entzündungsreaktion (Malmberg *et al.* 1997). Interessanterweise wird hier weder die basale

noch die cAMP-stimulierte PKA-Aktivität durch die Deletion von RI β beeinflusst, da die weiterhin exprimierte RI α dies kompensiert (Brandon *et al.* 1995). Die RI α KO-Maus weist keinen charakteristischen Phänotyp auf. Es konnte lediglich eine herabgesetzte Expression der C-Untereinheit und eine Reduktion der PKA-Aktivität beobachtet werden (Burton *et al.* 1997; Burton *et al.* 1999). Das Fehlen der RI β hingegen führt zu einem schlanken Phänotyp, dessen weißes Fettgewebe deutlich reduziert ist. Mäuse ohne RI β sind resistent gegen induzierte Fettleibigkeit und zeigen eine erhöhte Lipolyse-Aktivität, einhergehend mit einer drastischen Reduktion von (V)LDL (*very low density lipoprotein*) Cholesterin und Insulin im Plasma (Cummings *et al.* 1996; Adams *et al.* 1997; Amieux *et al.* 1997; Brandon *et al.* 1997; McKnight *et al.* 1998; Planas *et al.* 1999; Schreyer *et al.* 2001). Des Weiteren sind diese Mäuse, trotz einer Steigerung des Ethanolkonsums um bis zu 50% gegenüber Wildtyp Mäusen, nahezu resistent gegen die sedativen Effekte des Alkohols (Thiele *et al.* 2000). Mäuse ohne RI β weisen außerdem kognitive Defizite auf: Ausfall der LTD, Einschränkungen beim motorischen Lernen sowie Reduktion der Expression von neuronalen Genen (Brandon *et al.* 1998; Inan *et al.* 2006).

In tumorösem Gewebe wird vermehrt eine Überexpression der RI α -Isoform dokumentiert (Cho-Chung *et al.* 1995; Tortora *et al.* 2000, 2002). Mit *antisense*-Oligonukleotiden gegen die RI α -Untereinheit konnte im Tumor-Maus-Modell ein kompletter Wachstumsstopp des Tumors, bei gleichzeitiger Konzentrationserhöhung der RI β -Isoformen, nachgewiesen werden (Cho-Chung 2004).

Die zentrale Rolle der RI α -Isoform wird in diesen Untersuchungen deutlich. Es ist die einzige Deletion einer R-Isoform, die sich letal auswirkt und zudem können Deletionen in den anderen R-Isoformen (teilweise) durch die RI α kompensiert werden (Brandon *et al.* 1995; Amieux *et al.* 1997; Brandon *et al.* 1997; Burton *et al.* 1997; Burton *et al.* 1999). Die untersuchten Phänotypen sind also nicht nur auf die deletierte R-Isoform zurückzuführen, sondern sind auch ein Effekt der Isoform-Kompensation. Der schlanke Phänotyp, der durch das Ausschalten der RI β -Isoform induziert wird, kommt vermutlich durch die Aktivierung der RI α bei geringeren cAMP-Konzentrationen zustande, was die Stoffwechselrate vermehrt antreibt (Cummings *et al.* 1996).

Auffällig sind die Abundanz der R-Untereinheiten im Gehirn und die Tatsache, dass sämtliche Phänotypen der Deletionsmutanten Defizite in ihren kognitiven Fähigkeiten aufweisen. Dies deutet auf die zentrale Bedeutung der cAMP-vermittelten Signaltransduktion in Gehirnfunktionen hin (siehe auch (Skalhegg *et al.* 2000)).

Alle R-Monomere bestehen aus distinkten Domänen, denen domänen-spezifische inter- oder intramolekulare Funktionen zugeordnet werden können (Abbildung 1.2, (Canaves *et al.* 2002)):

- 1) eine aminoterminal gelegene Dimerisierungsdomäne, über welche die R-Monomere antiparallel verbunden sind und im Dimer mit AKAP interagieren können
- 2) eine inhibitorische Sequenz, die im aktiven Zentrum der C-Untereinheit bindet
- 3) zwei carboxyterminale cAMP-Bindedomänen (A und B).

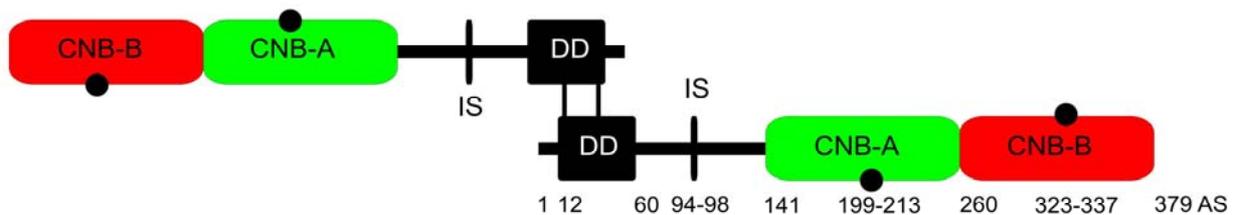


Abbildung 1.2 **Domänenstruktur der dimeren R-Untereinheit.** Die R-Monomere bestehen jeweils aus einer aminoterminal gelegenen Dimerisierungsdomäne (DD), über die die R-Monomere antiparallel miteinander verbunden sind, einer inhibitorischen Sequenz (IS), an der die Interaktion mit der C-Untereinheit stattfindet und den zwei cAMP-Bindedomänen A (CNB-A) und B (CNB-B). Die schwarzen Kreise symbolisieren cAMP-Moleküle. Die Nummerierung bezieht sich auf die Aminosäuresequenz der bRI α . (Hahnefeld, Moll, *et al.* Manuskript in Vorbereitung)

Die N-Termini der Typ I und Typ II R-Isoformen differieren sehr stark, so dass man zumeist von der Bildung Homodimeren in der Zelle ausgeht. Allerdings konnten auch Heterodimere zwischen RI α und RI β *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden (Tasken *et al.* 1993). Die RI-Monomere dimerisieren kovalent über zwei Disulfidbrücken (Cys16 und Cys37 in bRI α) (Zick *et al.* 1982; Bubis *et al.* 1987; Leon *et al.* 1997), während die RII-Monomere über hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen interagieren (Newlon *et al.* 1999; Morikis *et al.* 2002). Die hydrophobe Interaktion mit den AKAP erfolgt über die Dimerisierungsdomäne, die deswegen auch im Englischen *dimerisation and docking domain* (DD) genannt wird.

Die inhibitorische Sequenz der RII-Untereinheiten besteht aus einer Substrat-Sequenz (Arg-Arg-X-Ser, (Rosen *et al.* 1975)), die unter Anwesenheit von ATP/Mg²⁺ und cAMP von der C-Untereinheit am Serinrest autophosphoryliert wird (Geahlen *et al.* 1982; Veron *et al.* 1993). In Anwesenheit von ATP/Mg²⁺ ist die Holoenzymformierung des Typ II um den Faktor 5-15 verringert (Erlichman *et al.* 1974; Rangel-Aldao *et al.* 1976, 1977; Granot *et al.* 1980; Herberg *et al.* 1993). Im Gegensatz dazu besitzen die RI-Untereinheiten ein Pseudosubstrat-Motiv, das anstelle des phosphorylierbaren Serin ein Alanin enthält (Arg-Arg-X-Ala) (Takio *et*

al. 1984; Titani *et al.* 1984; Durgerian *et al.* 1989). Die Typ I-Holoenzymformierung ist strikt ATP/Mg²⁺ abhängig (Hofmann *et al.* 1975; Neitzel *et al.* 1991; Herberg *et al.* 1993).

Die beiden cAMP-Bindedomänen machen strukturell den größten Anteil der R-Untereinheiten aus und sind vermutlich durch Genduplikation entstanden (Shabb *et al.* 1992; Canaves *et al.* 2002). Die weiter aminoterminal gelegene cAMP-Bindedomäne (*cyclo nucleotide-binding domain*, CNB, *cAMP binding domain*, CBD) wird als CNB-A bezeichnet, während die carboxyterminale Bindedomäne CNB-B genannt wird (Døskeland *et al.* 1981). In der älteren Literatur findet man für die CNB-A anstatt des A auch die Bezeichnungen 2 (Rannels *et al.* 1980), *labile* oder *rapid site* (de Wit *et al.* 1981; de Wit *et al.* 1982) oder I (Mackenzie 1982; Steinberg *et al.* 1987a), während die CNB-B auch als 1 (Rannels *et al.* 1980), *stable site* (de Wit *et al.* 1981; de Wit *et al.* 1982) oder II (Mackenzie 1982; Steinberg *et al.* 1987a) bezeichnet wird.

Für die Aktivierung der PKA durch cAMP ist ein synergistischer und zugleich kooperativer Aktivierungsmechanismus postuliert worden (Ogreid *et al.* 1981b, a; Rannels *et al.* 1981; Robinson-Steiner *et al.* 1983; Herberg *et al.* 1996). Dabei bindet cAMP zuerst an die im Holoenzymkomplex leichter zugänglichen CNB-B, da die CNB-A durch die C-Untereinheit verdeckt wird (Ogreid *et al.* 1981b; Ogreid *et al.* 1983; Herberg *et al.* 1996). Durch kooperative Effekte wird eine Konformationsänderung in der R-Untereinheit induziert, die die CNB-A für cAMP leichter zugänglich macht. Die Bindung von cAMP an die CNB-A ist dann verantwortlich für die Dissoziation der C-Untereinheit und damit der Holoenzymaktivierung (Herberg *et al.* 1996). Die cAMP-Bindung an das PKA-Holoenzym zeigt positive Kooperativität, die primär zwischen der CNB-A und CNB-B im gleichen Monomer besteht (Takio *et al.* 1984; Ogreid *et al.* 1985; Rannels *et al.* 1985; Woodford *et al.* 1989; Ringheim *et al.* 1990).

Die Aktivierung des Holoenzymkomplexes durch die Dissoziation der C-Untereinheit von der R-Untereinheit wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Ogez *et al.* 1976). *In vitro*-Untersuchungen mittels Ultrazentrifugation (Corbin *et al.* 1975), Gelfiltration (Beavo *et al.* 1974), Ionenaustauschchromatographie (Tao *et al.* 1970; Reimann *et al.* 1971), Affinitätschromatographie (Ramseyer *et al.* 1976) und Dichtegradientenzentrifugation (Hofmann *et al.* 1975) konnten zeigen, dass der Holoenzymkomplex durch die Zugabe von cAMP dissoziiert wird. Untersuchungen *in vivo* mittels genetisch kodierter cAMP-Sensoren zeigen eindeutig eine durch cAMP induzierte räumliche Trennung der beiden Untereinheiten (Zaccolo *et al.* 2000; Prinz *et al.* 2004). Allerdings gibt es auch Hinweise darauf, dass unter

Gleichgewichtsbedingungen die Konformationsänderung zur Holoenzymaktivierung den Holoenzymkomplex in einen intermediären Zustand überführt, in welchem die C-Untereinheit aktiv, aber gebunden an die cAMP gesättigte R-Untereinheit vorliegt (Johnson *et al.* 1993; Yang *et al.* 1995). Weitergehende Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Dissoziation des intermediären Zustandes durch die Anwesenheit von Substraten der C-Untereinheit induziert wird (Kopperud *et al.* 2002; Vigil *et al.* 2004).

1.3.3 BINDUNG VON ZYKLISCHEN NUKLEOTIDEN AN DIE PKA

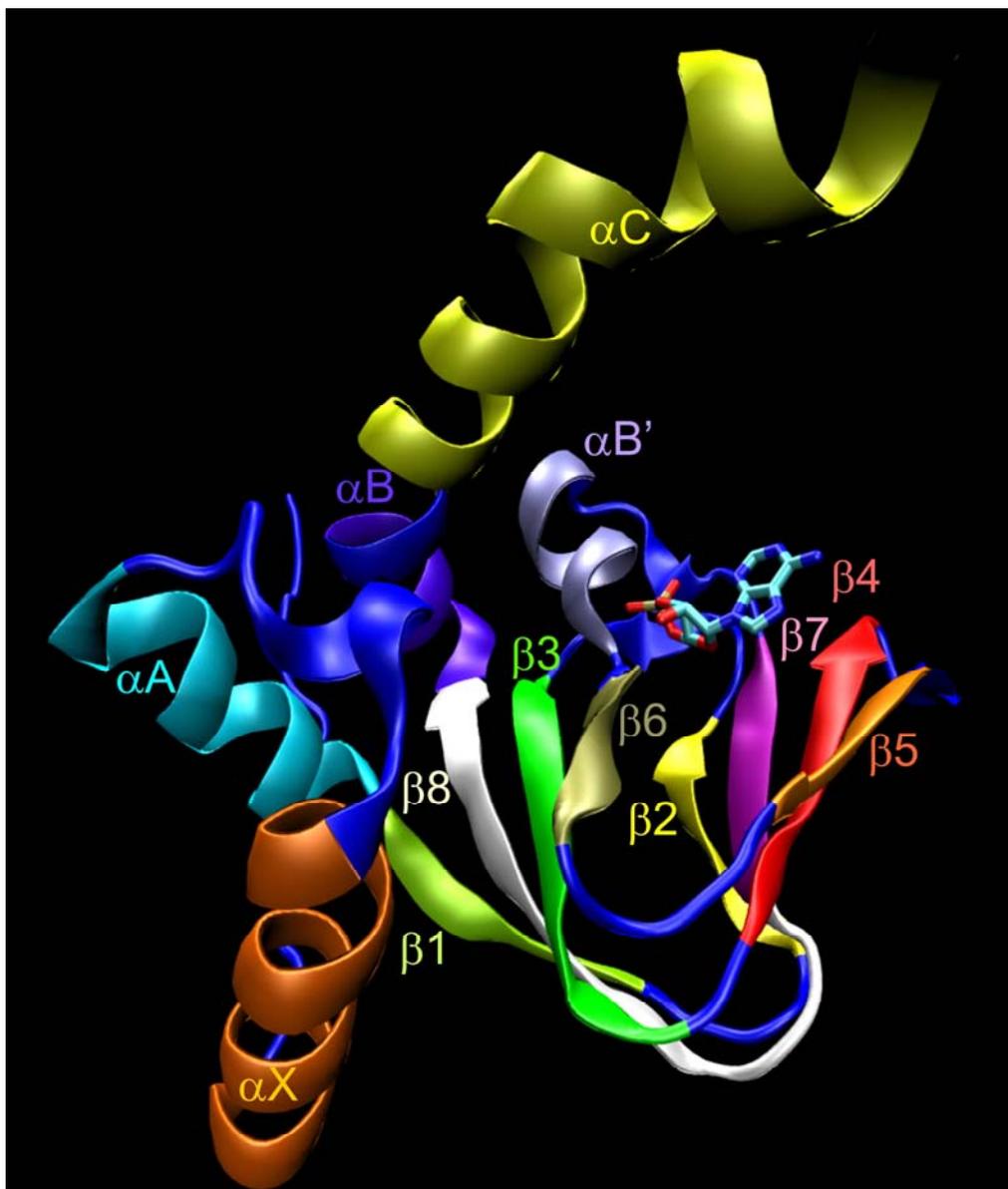


Abbildung 1.3 Darstellung der CNB-A Kristallstruktur (bRI α , AS 109-250, nach PDB 1NE4) mit gebundenem cAMP. Die β -Faltblatt-Strukturen β 1- β 8 und die α -Helix Strukturen α X- α C sind farbig hervorgehoben. Visualisierung erfolgte mit VMD 1.8.5 (Humphrey *et al.* 1996)

Das cAMP-Bindemotiv (*cyclo nucleotide-binding domain*, CNB, *cAMP binding domain*, CBD) weist eine evolutionär konservierte Architektur aus 8 β -Faltblatt-Strukturen (β -Subdomäne) und einer nicht durchgängigen α -Subdomäne auf (Abbildung 1.3). Die β -Subdomäne formt eine Art Fass aus zwei antiparallelen β -Faltblattstrukturen, bestehend aus jeweils vier Faltblättern (β 1,8,3,6 und β 2,7,4,5, (Su *et al.* 1995)). In der β -Subdomäne liegt die Phosphatbindungskassette (*phosphate binding cassette*, PBC), die das zyklische Nukleotid über verschiedene Aminosäuren (AS) positioniert und bindet. Dadurch wird das zyklische Nukleotid vor dem Lösungsmittel abgeschirmt und vor Hydrolyse durch die zellulären Phosphodiesterasen geschützt (Diller *et al.* 2001; Kim *et al.* 2006). Die PBC ist die am höchsten konservierte Signatur der CNB und besteht aus den AS Gly199-Ala211 und reicht damit von der α B'-Helix bis vor das β 7-Faltblatt (Abbildung 1.3, (Su *et al.* 1995; Diller *et al.* 2001; Kim *et al.* 2006)). (Zur Vereinfachung beziehen sich die Nummerierungen der AS und Sequenzen immer auf die bovine RI α .) Die PBC beinhaltet zwei essentielle, geladene AS (Arg209 und Glu200) in einer strukturell konservierten hydrophoben Umgebung, in der eine kleine α -Helix liegt (α B', Abbildung 1.3, (Weber *et al.* 1987a; Weber *et al.* 1987b)). Die PBC der R-Untereinheit hat damit folgende AS Sequenz:

Gly-**Glu**-Leu/Ile-Ala-Leu-X-X-Asn/Gly-X-Pro-**Arg**-Ala-Ala, wobei die beiden geladenen AS (markiert) das cAMP (Abbildung 1.4) in der PBC verankern (Su *et al.* 1995; Kim *et al.* 2005). Die 100fach höhere Spezifität der PKA für cAMP (Abbildung 9.1) gegenüber cGMP (Abbildung 9.2) kommt vermutlich durch das Ala210 (CNB-A) bzw. Ala334 (CNB-B) zustande. In der PKG befindet sich an dieser Position ein Threonin (Su *et al.* 1995). Durch den AS-Austausch dieses Ala zu Thr in den CNB der RI-Untereinheit oder einem zyklonukleotidabhängigen Ionenkanal wird die Affinität zu cGMP erheblich gesteigert (Weber *et al.* 1989; Shabb *et al.* 1990; Altenhofen *et al.* 1991; Shabb *et al.* 1991). Obwohl die CNB über die Artgrenzen strukturell hoch konserviert ist (Takio *et al.* 1984; Titani *et al.* 1984), scheint diese Konservierung nicht für die Konformation des gebundenen zyklischen Nukleotids in der CNB zu gelten. In Lösung sind Zyklonukleotide an der glykosidischen Bindung zwischen dem Nukleotid und dem bityklischen Zucker-Phosphat-System frei drehbar (Abbildung 1.4, (Miles *et al.* 1971)). Dabei nehmen die vom Purin abstammenden Zyklonukleotide bevorzugt die syn-Konformation ein, während die auf der Molekülstruktur des Pyrimidin basierenden Zyklonukleotide die anti-Konformation stark favorisieren (Yathindra *et al.* 1974; Pullman *et al.* 1976; Fazakerley *et al.* 1977; Hayashi *et al.* 1979).

In der Kristallstruktur der CNB der R-Untereinheit liegt cAMP allerdings in der syn-Konformation vor (Døskeland *et al.* 1983; de Wit *et al.* 1984; Ogreid *et al.* 1989; Su *et al.* 1995). Kristallstrukturdaten der CNB des bakteriellen CAP-Proteins zeigen cAMP in der anti-Konformation (McKay *et al.* 1982; Weber *et al.* 1987a; Passner *et al.* 1997), wohingegen NMR-Untersuchungen auf die syn-Konformation hindeuten (Gronenborn *et al.* 1982; Lee *et al.* 1991). Die cAMP-hydrolysierenden PDE (PDE I, II, III, IV) können cAMP in der syn-Konformation (PDE I, II) oder in der anti-Konformation (PDE III, IV) binden (Butt *et al.* 1995). Die cAMP-spezifische PDE IV bindet cAMP bevorzugt in der anti- und 8-Br-cAMP (Abbildung 9.15) in der syn-Konformation (Xu *et al.* 2004). Es ist bekannt, dass große Substituenten in der 8 Position des Nukleotidringes die freie Rotation um die glykosidische Bindung im cAMP/cGMP verhindern und damit die syn-Konformation (in Lösung) präferiert wird (Miles *et al.* 1971; Ikehara *et al.* 1972). Interessanterweise konnte bei „Docking“-Experimenten mit 8-Fluo-cAMP (Abbildung 9.17) an die CNB-B der RI α eine sinnvolle Bindung nur in der anti-Konformation erhalten werden (Abbildung 5.5). Der zyklonukleotidabhängige Ionenkanal HCN2 bindet cAMP in der anti-Konformation und cGMP in der syn-Konformation (Zagotta *et al.* 2003). Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass die Erkennung der zyklischen Nukleotide vielleicht nicht nur über den Basenanteil verläuft, sondern auch über die Konformation (Newton *et al.* 2004).

Die CNB der R-Untereinheiten unterscheiden sich auch funktionell deutlich in der Nukleotidbindung (Rannels *et al.* 1981). Erste Bindungsstudien mit cGMP zeigten, dass cGMP affiner an die RI-Isoformen als an die RII-Isoformen bindet (Haddock *et al.* 1973). Aber nicht nur die Isoformen I und II der R-Untereinheit unterscheiden sich, sondern auch die beiden CNB der R-Untereinheit eines Typs zeigen eindeutige Selektivität. Die CNB-A verfügen über eine schnellere cAMP-Austauschrate (für RI α 3 Minuten bei 25°C) als die CNB-B (für RI α 45 Minuten bei 25°C) (Døskeland 1978; Rannels *et al.*

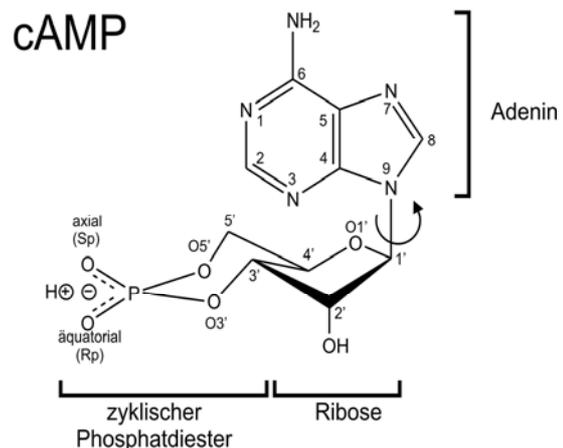


Abbildung 1.4 **Chemische Struktur von cAMP.** Dargestellt ist die Bezeichnung der einzelnen Komponenten des cAMP, sowie die Nummerierung der Atome, auf die die Positionsangaben bei den cAMP-Analoga beziehen. Der kreisförmige Pfeil zeigt die freie Rotationsmöglichkeit der n-glykosidischen Bindung an. Der Adeninring ist in der syn-Konformation dargestellt.

1980). Dies hängt vermutlich mit der offeneren Struktur der CNB-A im Gegensatz zur CNB-B zusammen (Abbildung 1.5, (Su et al. 1993)).

Um die Selektivität und das Bindungsverhalten der CNB näher zu untersuchen, wurden cAMP-Analoga entwickelt, die an allen drei cAMP-Komponenten (Adenin-Ring, Ribose, zyklischer Phosphatdiester) modifiziert wurden (de Wit *et al.* 1984). Die Modifikationen am Adenin-Ring wurden dabei besonders intensiv untersucht (Die Strukturen der im Folgenden erwähnten cAMP-Analoga befinden sich im Anhang unter 9.2). Bindungsstudien mit diesen cAMP-Analoga an allen vier Isoformen der R-Untereinheiten generierten eine Vielzahl von Interaktionsdaten, die Einblicke in die chemische Natur der Bindung und die dabei involvierten Kräfte geben sollen (de Wit *et al.* 1982; OGREID *et al.* 1989). Generell bindet die CNB-A bevorzugt cAMP-Analoga, die an der N6-Position des Adeninringes hydrophobe Substituenten haben (Rannels *et al.* 1980; Corbin *et al.* 1982; Døskeland *et al.* 1983). Die CNB-B bindet diese cAMP-Analoga um den Faktor 3-30 schlechter als cAMP (OGREID *et al.* 1989). Die CNB-B bevorzugt eher elektronenreiche Substituenten (Elektronendonoren) an der C8-Position (z.B. zeigt 8-N₃-cAMP (Abbildung 9.18) eine klare CNB-B Präferenz) oder elektronenziehende Substituenten (Elektronenakzeptoren) an der C2-Position (Rannels *et al.* 1980; Corbin *et al.* 1982; Døskeland *et al.* 1983). Die an der Position C2-modifizierten cAMP-Analoga zeigen zusätzlich noch eine deutlich reduzierte Affinität zur CNB-A (OGREID *et al.* 1989). Die Affinitätsunterschiede für cAMP-Analoga können zwischen den CNBs mehr als zwei Größenordnungen umspannen, wobei kein absolut CNB-A oder CNB-B spezifisches Analog gefunden werden konnte (Rannels *et al.* 1983; OGREID *et al.* 1989). Modifikationen an zwei Positionen der cAMP-Analoga zur Steigerung der Affinität und auch Selektivität, sogenannte disubstituierte cAMP-Analoga, zeigen oft keine additiven Effekte gegenüber den einfach substituierten Analoga (Uno *et al.* 1976; Døskeland *et al.* 1983).

Für die Entwicklung isoformspezifischer cAMP-Analoga wurden weitere Bindungsstudien durchgeführt. Eine ausführliche Studie mit C8-modifizierten cAMP-Analoga zeigte, dass die Affinität der CNB-A der RI-Untereinheit für Analoga mit großen Substituenten identisch zu cAMP ist (Schwede *et al.* 2000b). Dies ist sehr erstaunlich, da die RI α Kristallstruktur (Abbildung 1.5) mit gebundenem cAMP zeigt, dass die C8-Position des cAMP in der CNB-A stark vom umgebenden Protein abgeschirmt wird und dadurch nicht frei zugänglich ist. Im Gegensatz dazu ist die C8-Position des cAMP in der CNB-B deutlich stärker exponiert, was gut mit den Daten der cAMP-Analoga Daten übereinstimmt. Die CNB-B der RI-Untereinheit zeigt eine Präferenz für Substituenten an der C8-Position, die als Wasserstoff-Donoren fungieren

können, während die CNB-B der RII-Untereinheit Modifikationen mit Wasserstoff-Akzeptor-Potential affiner bindet (Schwede *et al.* 2000b). Daraus wird deutlich, dass die Selektivität für cAMP-Analoga nicht nur von der Zyklonukleotidbindedomäne, sondern auch vom Typ der R-Untereinheit abhängt. Interessanterweise wurden bisher keine vergleichenden Untersuchungen der α - und β -Isoformen durchgeführt.

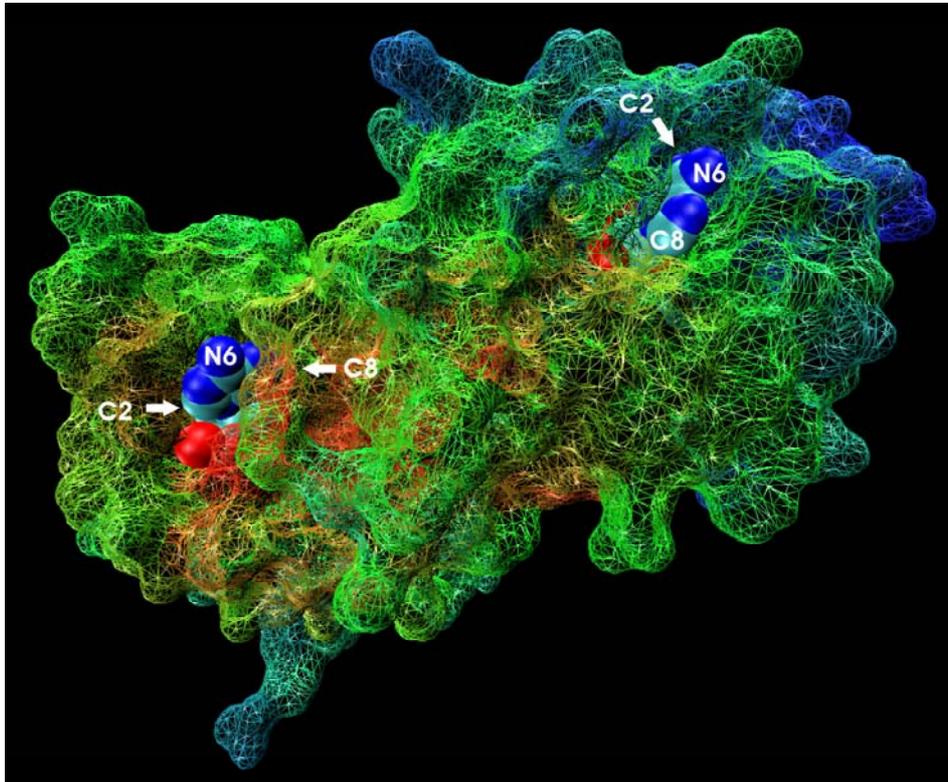


Abbildung 1.5 **Oberflächendarstellung des RI Monomer mit cAMP in den Bindetaschen CNB-A (links unten) und CNB-B (rechts oben)** (bRI α 109-376, PDB No 1NE4, (Wu *et al.* 2004a). Die Farbgebung des Proteins spiegelt den beta-Faktor der Kristallstruktur wieder, der Hinweise auf die Flexibilität der Struktur gibt: rot entspricht einer hohen Flexibilität während grün eher auf eine starre Struktur hindeutet. Die Markierungen entsprechen den am häufigsten modifizierten Positionen des cAMP Moleküls in cAMP-Analoga Studien. Visualisierung erfolgte mit VMD 1.8.5 (Humphrey *et al.* 1996)

Die Aktivierung der PKA-Holoenzymkomplexe aus den vier R-Isoformen zeigen deutliche Unterschiede in der cAMP-Aktiverungskonstante (K_{akt}). Während die PKA-Holoenzymkomplexe Typ I α und Typ II α , im Vergleich zu den anderen Typen des Holoenzymkomplexes durch eine mittlere cAMP-Konzentration aktiviert werden (K_{akt} : 90-120 nM, (Herberg *et al.* 1994; Herberg *et al.* 1996; Gibson *et al.* 1997; Herberg *et al.* 1999)), wird der Typ I β schon durch eine deutlich geringere cAMP-Konzentration aktiviert (K_{akt} : 5-20 nM, F.W. Herberg, persönliche Mitteilung). Der Typ II β wird erst bei deutlich höheren cAMP-Konzentrationen aktiviert (K_{akt} : 610 nM, (Zawadzki *et al.* 2004)).

Interessanterweise liegt die K_{akt} für Epac zwischen 40-50 μ M (Bos *et al.* 2001; Rehmann *et al.* 2003b; Rehmann *et al.* 2003a) deutlich über der K_{akt} der R-Untereinheit, damit wird Epac in der Zelle erst aktiv, wenn die PKA schon vollständig aktiviert vorliegt (Bos 2006). Allerdings kann die Aktivierungskonstante von Epac durch die Interaktion mit der leichten Kette von MAP1 (*light-chain 2 of microtubule-associated protein 1A*) bis auf eine mit PKA vergleichbare K_{akt} verringert werden (Magiera *et al.* 2004; Gupta *et al.* 2005; Yarwood 2005). Aktivierungsstudien am PKA-Holoenzymkomplex (Typ I und II) mit cAMP-Analoga zeigten, dass zur Aktivierung die Hydroxylgruppe an der 2'-Position der Ribose, der O3'-Sauerstoff sowie die Ladung des zyklischen Phosphodiesters essentiell sind (Yagura *et al.* 1981).

C2-modifizierte cAMP-Analoga zeigen mit einem deutlich höherem K_{akt} eine deutlich schlechtere Aktivierung des Holoenzymkomplexes im Vergleich zu cAMP (Meyer *et al.* 1975). Eine Ausnahme bilden Elektronenakzeptoren als Substituenten in der C2-Position (z.B. 2-Cl-cAMP, Abbildung 9.5). Diese entziehen dem Purinring Elektronen und dadurch wird PKA Typ I im Vergleich zu cAMP vierfach besser aktiviert (Yagura *et al.* 1980). Das Typ II-Holoenzym dagegen wird durch 2-Cl-cAMP um eine Zehnerpotenz schlechter aktiviert (Yagura *et al.* 1980). An der Position C8-modifizierte cAMP-Analoga sind bis zu zehnfach potentere Aktivatoren für Typ I-Holoenzym als Typ II-Holoenzym (Ogreid *et al.* 1985). Der einzige bekannte „selektive“ PKA Typ II Aktivator ist das 2-phenyl-1,N6- ϵ -cAMP (Abbildung 9.6), welcher das RII-Holoenzym um den Faktor 6 besser aktiviert als RI-Holoenzym (Ogreid *et al.* 1985). Aktivierung mit einer geschickten Kombinationen aus CNB-A- und CNB-B-spezifischen Analoga kann zu einer selektiven Aktivierung nur eines Holoenzymtyps führen (Ogreid *et al.* 1985; Øgreid *et al.* 1994). Ein disubstituiertes cAMP-Analog mit einem Austausch des cAMP-Adeninringes zu Nitrobenzamidazol (Abbildung 9.7) führte zu einer 20fach besseren Aktivierung des RII-Holoenzym (K_{akt} : 45 nM), im Vergleich zum RI-Holoenzym (K_{akt} : 870 nM) und einer fast um den Faktor 2 besseren Aktivierung im Vergleich zu cAMP (K_{akt} : 70 nM) (Szucs *et al.* 1992). Ein weiteres disubstituiertes cAMP-Analog mit einer Modifikation an der Ribose (8-CPT-2'-O-Me-cAMP, Abbildung 9.20) erhöht die Spezifität und Aktivierbarkeit für das cAMP regulierte Protein Epac gegenüber der PKA erheblich und ermöglicht damit selektive *in vivo* Untersuchungen des cAMP-Epac-Signalweges (Enserink *et al.* 2002). In weiteren Untersuchungen stellten sich die an der Position 6 modifizierten cAMP-Analoga (besonders 6-Bnz-cAMP Abbildung 9.11) als stark PKA spezifische Aktivatoren gegenüber Epac heraus (Christensen *et al.* 2003). Die Spezifität für die Epac Aktivierung im Vergleich zur PKA konnte mit dem optimierten cAMP-Analog

8-pMeOPT-2'-O-Me-cAMP (Abbildung 9.22) um drei Größenordnungen erhöht werden (Christensen *et al.* 2003).

Modifikationen am zyklischen Phosphodiester führten zu besonders interessanten cAMP-Analoga (Baraniak *et al.* 1979; Genieser *et al.* 1988). Der Austausch des axialen exozyklischen Sauerstoffs der Phosphatgruppe gegen einen Schwefel führt zu einem sogenannten Sp-cAMPS-Analog (Abbildung 9.23) (Baraniak *et al.* 1979). Die Gruppe der Sp-cAMPS-Analoga zeichnet sich im Vergleich zu cAMP durch eine etwa 10fach geringere Affinität zu den R-Untereinheiten und zum Holoenzymkomplex aus (de Wit *et al.* 1982; de Wit *et al.* 1984; Rothermel *et al.* 1988), vermag dennoch das PKA-Holoenzym wie cAMP zu aktivieren (Agonist). In dieser Arbeit wurden neue Sp-cAMPS-Analoga entwickelt (Sp-8-AEA-cAMPS, Abbildung 9.28; Sp-8-AHA-cAMPS, Abbildung 9.30; Sp-2-AEA-cAMPS, Abbildung 9.26), die sowohl zur Affinitätsreinigung der R-Untereinheiten der PKA aus *E. coli* als auch für Interactomics-Studien der R-Untereinheit mit ihren natürlichen Interaktionspartnern erfolgreich angewendet werden konnten (siehe 5.2.3).

Im Gegensatz dazu führt der Austausch des äquatorialen exozyklischen Sauerstoffs der Phosphatgruppe gegen einen Schwefel (Rp-cAMPS, Abbildung 9.24, (Baraniak *et al.* 1979)) zu dem einzig bekannten Antagonisten für PKA (O'Brian *et al.* 1982; Rothermel *et al.* 1983; Rothermel *et al.* 1984; Van Haastert *et al.* 1984; Dostmann *et al.* 1990; Dostmann *et al.* 1991; Dostmann 1995). Die Bindung von Rp-cAMPS an die R-Untereinheit im Holoenzymkomplex führt nicht zur Dissoziation und damit auch nicht zur Aktivierung der PKA (de Wit *et al.* 1984; Rothermel *et al.* 1988). Interessanterweise ist Rp-cAMPS auch für Epac sowie Rp-cGMPS (Abbildung 9.25) für die cGMP-abhängige Proteinkinase ein Antagonist (Butt *et al.* 1990; Rehmann *et al.* 2003b). Allerdings ist die Affinität von Rp-cAMPS an die PKA um den Faktor 90 geringer als für cAMP (de Wit *et al.* 1982). Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Rp-cAMPS-Analoga entwickelt (Rp-8-AEA-cAMPS, Abbildung 9.29; Rp-8-AHA-cAMPS, Abbildung 9.31), mit denen eine Reinigung des PKA-Holoenzymkomplexes mit seinen natürlichen Interaktionspartnern aus Gewebe möglich ist (siehe 5.2.4).

Interessanterweise ist für die antagonistische Wirkung von Rp-cAMPS auf das Typ I-Holoenzym die Anwesenheit von ATP/Mg²⁺ unerlässlich, ohne ATP/Mg²⁺ verhält sich Rp-cAMPS (mit einem K_{act} von 8 µM) wie ein schlechter Agonist (Dostmann *et al.* 1991). Untersuchungen an einer Mutante der RI-Untereinheit mit einer stark verminderten cAMP-Affinität der CNB-A, aber nicht der CNB-B, gaben Einblicke in den antagonistischen Mechanismus von Rp-cAMPS (Bubis *et al.* 1988a; Bubis *et al.* 1988b). Diese R-Mutante

formiert hochaffin Holoenzym und lässt sich auch in der Abwesenheit von ATP/Mg^{2+} aktivieren (Dostmann *et al.* 1991; Herberg *et al.* 1996). Rp-cAMPS ist für diese Mutante mit und ohne ATP/Mg^{2+} ein Agonist, daraus lässt sich schließen, dass die antagonistische Wirkung von Rp-cAMPS über die CNB-A vermittelt wird (Dostmann *et al.* 1991). Bei dem Holoenzym des Typs II wirkt Rp-cAMPS unabhängig von ATP/Mg^{2+} als Antagonist (Dostmann *et al.* 1991). Strukturelle Untersuchungen lassen vermuten, dass die Größe des Schwefels (ca. 10% größerer Van-der-Waals-Radius als der Sauerstoff (Parker Botelho *et al.* 1988)) sowie die längere Bindung vom Phosphat zum Schwefel im Gegensatz zur Phosphat-Sauerstoff-Bindung (P-S Bindung 1,95 Å versus 1,5 Å bei P-O) der Grund für die verringerte Affinität beider Stereoisomere ist (Su *et al.* 1993). Gebundenes Rp-cAMPS in der CNB-A könnte die positive Ladung des essentiellen Arg209, das in der PBC eine Interaktion mit dem äquatorialen Sauerstoff von cAMP ausbildet und vermutlich damit zur Dissoziation über intramolekulare Wechselwirkungen beiträgt, fast vollständig durch die negative Ladung am Schwefel neutralisieren (Wu *et al.* 2004a). Damit kann Arg209 keine ionischen und hydrophoben Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Asp170, Gly169 und/oder Ile163 eingehen, was die antagonistische Wirkung erklären könnte (Su *et al.* 1993; Das *et al.* 2007a), da gerade eine Änderung in der Flexibilität des Asp170 die Aktivierung des Holoenzymkomplexes stark beeinträchtigt (Frey *et al.* 1985; Das *et al.* 2007a). Ein Vergleich der Kristallstrukturen der R-Untereinheiten mit gebundenem Rp- oder Sp-cAMPS zeigt, dass kaum ein Unterschied in der Konformation der R-Untereinheiten zu erkennen ist (Wu *et al.* 2004a). NMR-Untersuchungen und Auffaltungsexperimente der R-Untereinheit mit Sp- und Rp-cAMPS weisen darauf hin, dass Rp-cAMPS die Flexibilität in der CNB erhöht und damit den Komplex aus Rp-cAMPS:R-Untereinheit:C-Untereinheit stabilisiert (Dostmann 1995; Das *et al.* 2007a).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bindung von Agonisten und Antagonisten an die RI-Untereinheit der PKA thermodynamisch charakterisiert, um die Unterschiede in den Bindungsmechanismen zu untersuchen (siehe 5.1.2). Trotz all dieser Erkenntnisse ist die Wirkungsweise des Antagonisten Rp-cAMPS sowie der intramolekulare Aktivierungsmechanismus des Holoenzymkomplexes weiterhin Gegenstand intensiver Untersuchungen. Als ein Beitrag zu diesen Untersuchungen wurde im Zusammenhang mit dieser Arbeit der cAMP-induzierte Aktivierungsmechanismus der PKA analysiert.

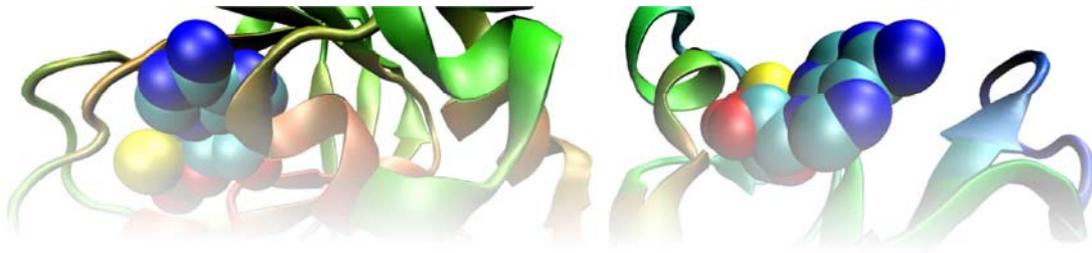
1.4 LOKALISATION UND REGULATION DER PKA ÜBER ANKERPROTEINE

Die Regulation der katalytischen Aktivität der PKA hängt entscheidend von der Anwesenheit bzw. lokalen Konzentration des sekundären Botenstoffes cAMP ab. Die zeitliche und lokale Regulation des cAMP-Signalweges wird jedoch durch Multienzymkomplexe (PKA, PDE, PP) vermittelt (Wong *et al.* 2004). Proteine, welche die PKA über die R-Untereinheit mit solchen Enzymkomplexen verbinden, werden A-Kinase-Ankerproteine (AKAP) genannt. Weiterhin ist ein derzeitiger Gegenstand der Forschung eine Gruppe von Proteinen, die die C-Untereinheit lokalisieren. Diese werden als A-Kinase-Interaktionsproteine (AKIP) bezeichnet. Die Proteinfamilie der A-Kinase-Ankerproteine (AKAP) besteht aus mehr als 50 strukturell sehr unterschiedlichen aber funktionell konservierten Proteinen (Wong *et al.* 2004). AKAP wurden bisher in der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*), dem Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*), der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), der Maus und dem Menschen gefunden (Wong *et al.* 2004). Die Benennung der AKAP ist sehr unübersichtlich, da für ein AKAP bis zu 12 verschiedene Synonyme publiziert wurden. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit jedes erwähnte AKAP seinen bisher bekannten Synonymen im Abkürzungsverzeichnis zugeordnet (siehe 9.1). Strukturell besitzen die AKAP eine PKA-Anker-Domäne aus einer amphipatischen Helix von 14-18 AS, die mit hoher Affinität an den dimerisierten Aminoterminus der R-Untereinheit bindet (Scott *et al.* 1990; Carr *et al.* 1991; Newlon *et al.* 1999; Newlon *et al.* 2001). Die meisten AKAP binden an Typ II R-Untereinheiten (Carnegie *et al.* 2003), aber auch ein Typ I spezifisches AKAP konnte inzwischen in *C. elegans* identifiziert werden (Angelo *et al.* 1998). Im Menschen wurden auch einige dualspezifische AKAP gefunden (Huang *et al.* 1997; Wang *et al.* 2001). Mittlerweile wurden sogar hochaffine Peptidinhibitoren entwickelt, die spezifisch mit der RI- oder RII-AKAP Bindung kompetieren (Burns-Hamuro *et al.* 2003; Gold *et al.* 2006b). Ein weiteres wichtiges Strukturmerkmal der AKAP ist das Lokalisationssignal, mit dem sie an distinkte Zellkompartimente binden können. Zum Beispiel besitzt das erste identifizierte AKAP (MAP2, (Vallee *et al.* 1981; Theurkauf *et al.* 1982)) ein Lokalisationssignal für Mikrotubuli (Herzog *et al.* 1978), während AKAP 5 über eine spezifische Sequenz an der Plasmamembran lokalisiert wird (Dell'Acqua *et al.* 1998). Die vielleicht bedeutendste biologische Signifikanz von AKAP ist aber ihre Eigenschaft, Komplexe mit mehreren Signalkomponenten einzugehen (Abbildung 1.1). Diese Komplexe verknüpfen mehrere Signalwege und lokalisieren damit die Signaltransduktion wie auch die Signalterminierung in verschiedenen cAMP-vermittelten Signalkaskaden. Kinaselokalisation

über AKAP wird zunehmend als ein Konzept zur Synchronisierung räumlicher und temporaler Aspekte von zellulären Signalwegen akzeptiert (Smith *et al.* 2006). Einige, wenn nicht sogar alle AKAP lokalisieren PKA mit anderen Proteinkinasen, Proteinphosphatasen und Phosphodiesterasen in die Umgebung von selektierten Substraten (Smith *et al.* 2006). So verankert z.B. AKAP 5 neben PKA auch noch die Calcium-abhängige-Phosphatase Calcineurin (Proteinphosphatase PP2B) (Coghlan *et al.* 1995) und die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Protein-kinase (Klauck *et al.* 1996) und verknüpft damit Phosphorylierung und Dephosphorylierung eines Substrates eng miteinander. Über AKAP 6 werden die cAMP-Signalweg-Komponenten PKA, Epac, PDE4D3 und zwei Proteinphosphatasen lokal zusammengebracht (PP2A und PP2B) (Dodge-Kafka *et al.* 2006). Durch diese gezielte Lokalisation von PDE wird eine zelluläre cAMP-Verteilung in Mikrodomänen erzielt, die temporal reguliert werden kann (Zaccolo *et al.* 2002; Martin *et al.* 2006). Die durch AKAP lokalisierten Multiproteinkomplexe sind hochdynamisch, da sowohl die Lokalisation, die Aktivität der gebundenen Enzyme als auch die Komposition der Komplexe sich auf einen physiologischen Stimulus hin ändern können (Wong *et al.* 2004).

Das erst kürzlich entdeckte A-Kinase-Interaktionsprotein (AKIP1, BCA3, *breast cancer associated protein*) zeigt, dass die zelluläre Lokalisation der PKA nicht nur über die R-Untereinheit reguliert wird (Sastri *et al.* 2005). AKIP1 besitzt ein Kernlokalisierungssignal und verankert die C-Untereinheit im Nukleus. Durch einen Hefedihibridsystemansatz konnten schon einige Proteine als potentielle AKIP identifiziert werden, deren genaue Funktion noch intensiv untersucht wird (M. Sastri, persönliche Mitteilung).

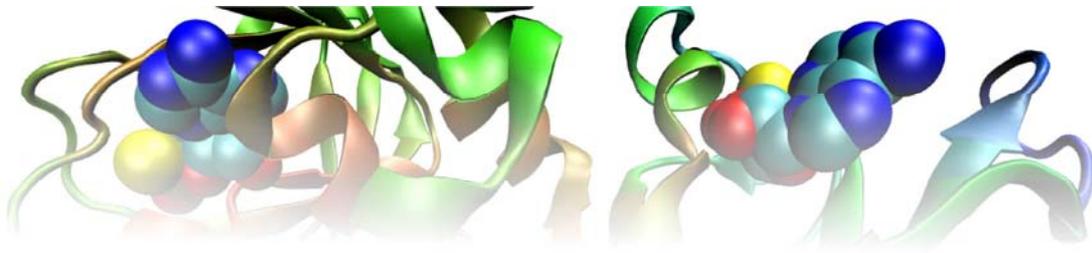
Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, mit der einerseits die R-Untereinheiten als auch der intakte PKA-Holoenzymkomplex zusammen mit den natürlich vorkommenden Interaktionspartnern aus komplexen Proben isoliert werden konnten (siehe 5.2.3, 5.2.4).



2. ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT UND UNTERSUCHUNGSSTRATEGIEN

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung spezifischer Aufgaben des sekundären Botenstoffes zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), um das Verständnis für die molekularen Mechanismen der cAMP-vermittelten Signaltransduktion zu erweitern. cAMP wurde als erster sekundärer Botenstoff in den fünfziger Jahren entdeckt, dennoch sind die durch ihn vermittelten Effekte auf fundamentale Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung, Energiemetabolismus und Genexpression immer noch Gegenstand intensiver Forschung. Zentraler Rezeptor für cAMP in der eukaryotischen Zelle ist die Proteinkinase A. Daher sollen die Wechselwirkungen von cAMP und cAMP-Analoga mit den zyklonukleotidbindenden, regulatorischen (R) Untereinheiten der PKA charakterisiert werden. Dazu ist es notwendig, schnelle und robuste Methoden für solche Bindungsanalysen zu entwickeln und etablieren, mit deren Hilfe cAMP-Analoga (Agonisten und Antagonisten) ihrer Affinität nach quantifiziert werden können. Darüber hinaus sollen mit Hilfe thermodynamischer Untersuchungen Unterschiede im Bindungsverhalten zwischen PKA-Agonisten und -Antagonisten analysiert werden, da bisherige Untersuchungen an statischen Kristallstrukturen Unterschiede im Aktivierungsverhalten nicht ausreichend beschreiben konnten. Studien an mutagenisierten R-Untereinheiten zur cAMP-Bindung, Holoenzymkomplex-Formierung und -Aktivierung sollen die molekularen Mechanismen der cAMP-Bindung näher charakterisieren.

Im selben Zusammenhang sollen neue cAMP-Analoga für Affinitätschromatographie entwickelt werden, die selektiv die Isoformen der R-Untereinheit sowie den intakten PKA-Holoenzymkomplex aus komplexen Gemischen (Zelllysate) anreichern können. Dies soll die Möglichkeit eröffnen, cAMP-bindende Proteine in ihren funktionellen Komplexe nativ zu eluieren. In einem solchen proteomischen Ansatz sollen neue Interaktionspartner der PKA identifiziert werden mit dem Ziel das cAMP-Signalnetzwerk um weitere Komponenten zu ergänzen.



3. KURZPROFILE DER MANUSKRIPTE UND ABGRENZUNG DER EIGENANTEILE

(Die Manuskripte befinden sich im Kapitel 4.)

PUBLIKATION I

Hahnefeld, C., Moll, D., Götte, M. and Herberg, F.W. (2005)

„Rearrangements in a hydrophobic core region mediate cAMP action in the regulatory subunit of PKA.“

Biological Chemistry **386** (7): 623-631

Bindung von cAMP an die regulatorische Untereinheit (R-UE) des Proteinkinase A (PKA) Holoenzymkomplex führt zur Dissoziation und damit zur Aktivierung der katalytischen Untereinheit (C-UE). Basierend auf Sequenzvergleichen und Kristallstrukturen von cAMP-Bindungsdomänen wurden vier konservierte Aminosäuren in der R-UE identifiziert, die möglicherweise die Dissoziation der C-UE über eine Konformationsänderung vermitteln. Mutationen dieser Aminosäuren zeigten deutliche Unterschiede in cAMP-Bindungs- und Aktivierungsstudien, die die Bedeutung dieser AS im Aktivierungsmechanismus aufzeigten. Aufgrund der erhaltenen Daten wurde ein Aktivierungsmechanismus basierend auf hydrophoben Wechselwirkungen, ähnlich dem schon bekannten Aktivierungsmodell des Guaninnukleotid-Austauschfaktor Epac (*exchange protein directly activated by cAMP*), postuliert.

Diese Publikation wurde bereits in die kumulative Dissertation von Claudia Hahnefeld eingebunden. Die Reinigungen der regulatorischen Untereinheiten und die spektrophotometrischen Aktivitätsmessungen wurden von Claudia Hahnefeld, Daniela Moll und Sonja Schweinsberg durchgeführt, während Claudia Hahnefeld sich für die SPR Experimente verantwortlich zeichnete. Oliver Bertinetti und Daniela Moll führten die Expressionsoptimierung durch. Die Kristallstruktur-Abbildungen von PKA und Epac wurden (basierend auf bereits publizierten Strukturen) von Maik Götte und Frank Gesellchen gestaltet; die strukturelle Ausarbeitung des Aktivierungsmechanismus wurde von Maik Götte und Claudia Hahnefeld durchgeführt. Die CD Experimente wurden von Daniela Moll und Sonja Schweinsberg durchgeführt und beschrieben.

PUBLIKATION II

Moll, D., Zimmermann, B., Gesellchen, F. and Herberg, F.W. (2006)
„Current developments for the *in vitro* characterization of protein interactions“
Proteomics in drug research Wiley-VCH Verlag: 159-172

In diesem Übersichtsartikel werden verschiedene Biomolekulare Interaktionsanalysen zur quantitativen Charakterisierung von Protein Interaktionen vorgestellt und die methodenbedingten Vor- und Nachteile diskutiert. Die physikalischen Meßprinzipien der Oberflächenplasmonresonanz (SPR), der Fluoreszenzpolarisation (FP), der Isothermalen Titrations Kalorimetrie (ITC) und des AlphaScreens (Amplified Luminescence Proximity Homogenous Assays) werden ausführlich erklärt und die erhaltenen Ergebnisse anhand verschiedener Beispielinteraktionen dargestellt: Protein-physiologischer Ligand (ITC), Abhängigkeit einer Protein – Protein Bindung von einem Kofaktor (SPR) und Unterschied einer Protein – Protein Dissoziation durch den physiologischen Liganden und eines Agonisten (AlphaScreen).

Die ITC Messung sowie die Beschreibung der FP und ITC Experimente wurden von Daniela Moll durchgeführt. Die in dieser Publikation dargestellten SPR Experimente wurden von Bastian Zimmermann, die AlphaScreen Experimente von Frank Gesellchen durchgeführt und beschrieben. Die textliche Ausarbeitung wurde von Daniela Moll durchgeführt.

PUBLIKATION III

Moll, D., Prinz, A., Gesellchen, F., Drewianka, S., Zimmermann, B. and Herberg, F.W. (2006)
„Biomolecular interaction analysis in functional proteomics.“
Journal of Neural Transmission **113** (8) 1015-1032

In der funktionellen Proteomforschung werden bekannte Interaktionen eines zellulären Netzwerkes qualitativ untersucht. Diese Veröffentlichung beschreibt verschiedene biomolekulare Interaktionsanalysen, anhand des Modellsystems PKA, die zur detaillierten Charakterisierung von Bindungen herangezogen werden können. Neben den Gleichgewichtsbindungsdaten (generiert aus AlphaScreen, FP, SPR und ITC Messungen) wurden aus ITC Messungen die thermodynamischen Parameter ΔG , ΔH und ΔS ermittelt. Durch Anwendung der BRET² (Bioluminescence resonance energy transfer) Methode konnten in lebenden Zellen Aussagen über Bindungsereignisse und deren Lokalisation getroffen werden.

Die in dieser Publikation dargestellten ITC und FP Experimente wurden von Daniela Moll, die Biacore Experimente von Bastian Zimmermann und Stephan Drewianka durchgeführt und beschrieben. Die AlphaScreen Experimente wurden von Frank Gesellchen, die BRET² Experimente von Anke Prinz durchgeführt und beschrieben. Die schematischen-Darstellungen zu den einzelnen Methoden wurden von Daniela Moll entworfen. Ebenso wurde die textliche Ausarbeitung von Daniela Moll durchgeführt.

PUBLIKATION IV

Moll, D., Schweinsberg, S., Hammann, C. and Herberg, F.W. (2007)

“Comparative thermodynamic analysis of cyclic nucleotide binding to Protein Kinase A.”

Biological Chemistry **388** 163-172

In dieser vergleichenden Studie wurden die thermodynamischen Parameter ΔG , ΔH und ΔS für die Interaktionen zwischen einer regulatorischen Untereinheit der PKA und drei zyklischen Nukleotiden (cAMP, 8-AHA-cAMP, 6-AH-cAMP) mittels zweier unabhängiger Methoden bestimmt. Die Bindung an die regulatorische Untereinheit aller drei zyklischen Nukleotide zeigt ähnliche ΔG Werte und die Interaktion ist immer enthalpisch angetrieben. Allerdings zeigte eines der zyklischen Nukleotide (6-AH-cAMP) methodenabhängig unterschiedliche Parameter ΔH und $-T\Delta S$.

Die Biacore Experimente wurden von Daniela Moll durchgeführt, Sonja Schweinsberg, Katja Eildermann und Katrin Guske haben dabei assistiert. Das für die Biacore Experimente verwendete Protein wurde von Sonja Schweinsberg zur Verfügung gestellt. Die ITC Experimente wurden von Daniela Moll durchgeführt, Katja Eildermann und Katrin Guske haben assistiert. Die Datenauswertung, die Gestaltung der Abbildungen und das Manuskript wurden von Daniela Moll und Christian Hammann in enger Zusammenarbeit mit Sonja Schweinsberg erstellt.

PUBLIKATION V

Moll, D., Schweinsberg, S., Schwede, F., Bertinetti, O., Drewianka, S., Genieser, H.-G., Herberg, F.W.
„Chemical Tools for the selective Purification of Components of cAMP Signalling Pathways.“
Manuskript

Durch rationales Design wurden zwei verschiedene Sets an cAMP-Analog Agarosen entwickelt und getestet. Auf der einen Seite agonistisch wirkende cAMP-Analoga, die für eine gekoppelte Affinitätschromatographie aller vier Isoformen der R-Untereinheit optimiert wurden. Auf der anderen Seite wurden auch antagonistisch wirkende cAMP-Analoga weiterentwickelt, mit denen es möglich ist, den PKA-Holoenzymkomplex zusammen mit Interaktionspartnern aus komplexen Proteingemischen fischen zu können.

Daniela Moll, Hans-Gottfried Genieser und Frank Schwede waren maßgeblich am rationalem Design der cAMP-Analoga beteiligt. Die Analoga wurden von Hans-Gottfried Genieser und Frank Schwede synthetisiert. Stephan Drewianka hat die SPR Experimente für die Sp-cAMPS Analoga durchgeführt. Die Reinigungen der RII α wurden von Sonja Schweinsberg durchgeführt, optimiert und beschrieben, ebenso wie die SPR Experimente für die Rp-cAMPS Analoga. Die MS Analysen wurden von Oliver Bertinetti durchgeführt. Daniela Moll hat die Reinigung der anderen R Isoformen durchgeführt, optimiert, beschrieben, ebenso wie die Rp-Agarose Experimente. Das Manuskript wurde von Daniela Moll und Sonja Schweinsberg gemeinsam erstellt.

PUBLIKATION VI

Moll, D., Prinz, A., Brendel, C.M., Berrera, M., Zaccolo, M., Genieser, H.-G., and Herberg, F.W.
“Biochemical and cellular visualization of a novel membrane permeable fluorescent cAMP analog.”
Manuskript

Zur Untersuchung der zellulären cAMP-Verteilung wurde der neue Pharos-Fluoreszenzfarbstoff entwickelt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff wurde zunächst physikalisch und anschließend, nach der Kopplung an cAMP (8-[ϕ -575]-cAMP), sowohl *in vitro* als auch *in vivo* biochemisch charakterisiert. Dabei zeigte der Pharos-Fluoreszenzfarbstoff gute spektrale Eigenschaften. *In vitro* ist die Affinität von 8-[ϕ -575]-cAMP an die R-Untereinheiten abhängig von der R-Isoform, jedoch aktivierte 8-[ϕ -575]-cAMP die PKA-Holoenzymkomplexe vergleichbar zu cAMP. *In vivo* Untersuchungen zeigten eine hervorragende Membrangängigkeit des 8-[ϕ -575]-cAMP und eine Koloaliation mit den R-Untereinheiten. Allerdings konnte in Zellen eine Akkumulation von 8-[ϕ -575]-cAMP nicht ausgeschlossen werden.

Die Synthese des Pharos-Farbstoffes und die Untersuchungen zur Stabilität und Lipophilie wurden von Hans-Gottfried Genieser durchgeführt. Cornelia Brendel und Daniela Moll führten die physikalische Charakterisierung des Pharos-Farbstoff gemeinsam durch. Sonja Schweinsberg stellte für die Messungen RII α zur Verfügung, während die anderen R-Isoformen von Daniela Moll gereinigt wurden. Daniela Moll und Michaela Hansch führten die FP Experimente durch und arbeiteten diese in das Manuskript ein. Anke Prinz führte die BRET Experimente und spektrophotometrischen Assays durch. Marco Berrera zeichnete sich für die FRET Experimente verantwortlich. Die Evaluierung der zellulären Verteilung beruhten auf den Arbeiten von Anke Prinz und Marco Berrera. Anke Prinz und Hans-Gottfried Genieser verfassten das Manuskript.

ARTIKEL I

Moll, D., Schweinsberg, S., and Herberg, F.W. (2006)

“Biomolekulare Interaktionsanalyse - Ein Werkzeug der funktionellen Proteomforschung?”

Bioforum 3 (29): 28-30

Dieser populärwissenschaftliche Übersichtsartikel beschreibt eine Auswahl von Biomolekularen Interaktionsanalysen und ihre Anwendung in der funktionellen Proteomforschung. Die verschiedenen Meßprinzipien sowie die generierten Daten und deren Aussagekraft werden kurz und prägnant vorgestellt.

Die Kristallstruktur Abbildung der PKA wurde (basierend auf der bereits veröffentlichten Struktur 1CDK) von Daniela Moll und Sonja Schweinsberg in Zusammenarbeit mit Frank Gesellchen gestaltet. Die in dieser Publikation dargestellten Biacore Experimente wurden von Bastian Zimmermann und Stephan Drewianka durchgeführt. Das Manuskript wurde von Daniela Moll und Sonja Schweinsberg gemeinsam erstellt.

ARTIKEL II

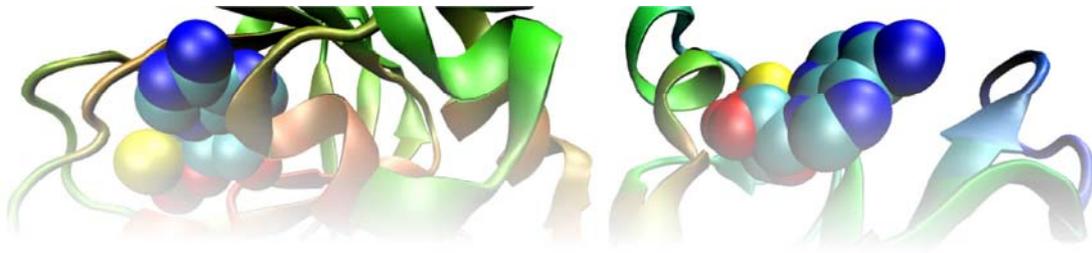
Müller, S., Kromke, M., Vogt, H. and Moll, D. (in press)

“Enzymkinetik in der Schule – Michaelis-Menten-Kinetik von Urease”

Biologie in unserer Zeit

In diesem didaktisch ausgelegten Artikel wird ein Schulversuch zum Thema Enzymkinetik aufgebaut und leicht verständlich aufgearbeitet. Dieser Versuch kann in der Schule von einer rein qualitativen Betrachtung bis hin zu einer eingehenden Untersuchung der Kenngrößen eines Enzyms ausgeweitet werden. Dieser Artikel beinhaltet die auf Schulen abgestimmte experimentelle Durchführung, Materialien und Geräte sowie eine ausführliche Beschreibung der Auswertung und Lehrmaterial (Hintergrund, Film-Material und Abbildungen) für den theoretischen Unterricht.

Die Experimente wurden von Sara Müller und Marianne Kromke im Rahmen des Wahlpflichtfaches Didaktik für Lehrämter unter der Betreuung von Helmut Vogt durchgeführt. Die wissenschaftliche Ausarbeitung erfolgte durch Daniela Moll und Sara Müller.



4. MANUSKRIPTE

PUBLIKATION I

Hahnefeld, C., Moll, D., Götte, M. and Herberg, F.W. (2005)

„Rearrangements in a hydrophobic core region mediate cAMP action in the regulatory subunit of PKA.“

Biological Chemistry **386** (7): 623-631

PUBLIKATION II

Moll, D., Zimmermann, B., Gesellchen, F. and Herberg, F.W. (2006)
„Current developments for the in vitro characterization of protein interactions.“
Proteomics in drug research Wiley-VCH Verlag: 159-172

PUBLIKATION III

Moll, D., Prinz, A., Gesellchen, F., Drewianka, S., Zimmermann, B. and Herberg, F.W. (2006)
„Biomolecular interaction analysis in functional proteomics.“
Journal of Neural Transmission **113** (8) 1015-1032

PUBLIKATION IV

Moll, D., Schweinsberg, S., Hammann, C. and Herberg, F.W. (2007)
“Comparative thermodynamic analysis of cyclic nucleotide binding to Protein Kinase A.”
Biological Chemistry **388** 163-172

PUBLIKATION V

Moll, D., Schweinsberg, S., Schwede, F., Bertinetti, O., Drewianka, S., Genieser, H.-G., Herberg, F.W.
„Chemical Tools for the selective Purification of Components of cAMP Signalling Pathways.“
Manuskript

PUBLIKATION VI

Moll, D., Prinz, A., Brendel, C.M., Berrera, M., Zaccolo, M., Genieser, H.-G. , and Herberg, F.W.
“Biochemical and cellular visualization of a novel membrane permeable fluorescent cAMP analog.”
Manuskript

ARTIKEL I

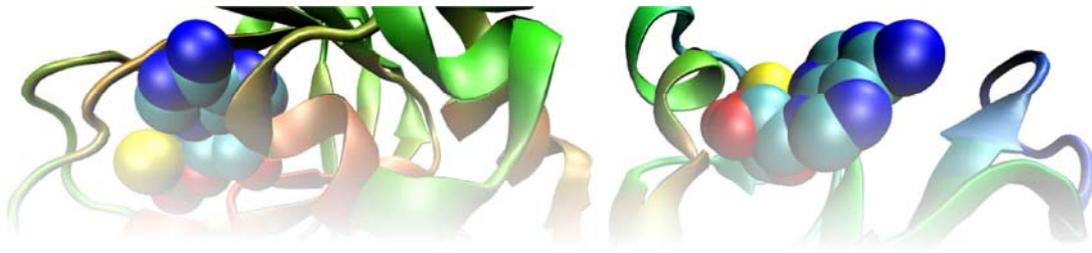
Moll, D., Schweinsberg, S., and Herberg, F.W. (2006)
“Biomolekulare Interaktionsanalyse - Ein Werkzeug der funktionellen Proteomforschung?”
Bioforum **3** (29): 28-30

ARTIKEL II

Müller, S., Kromke, M., Vogt, H. and Moll, D. (in press)

“Enzymkinetik in der Schule – Michaelis-Menten-Kinetik von Urease.”

Biologie in unserer Zeit



5. DISKUSSION

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung der Interaktionen des sekundären Botenstoffes zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) als zentraler Mediator der zellulären Signaltransduktion. Dazu wurde die Bindung einer Vielzahl cAMP-Analoga an die regulatorischen Untereinheiten der Proteinkinase A (PKA) mittels verschiedener Methoden eingehend charakterisiert und quantifiziert (**PUBLIKATION II**, **PUBLIKATION III**, **PUBLIKATION IV**, **ARTIKEL I**). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden neue cAMP-Analoga mit speziellen Eigenschaften entwickelt. Zum einen wurden Analoga entworfen, mit denen nun eine hocheffiziente Reinigung der rekombinant exprimierten regulatorischen (R) Untereinheiten der PKA möglich ist (**PUBLIKATION V**). Des Weiteren wurden spezielle cAMP-Analoga entwickelt, die zur Isolation und Identifikation des cAMP-Interactoms aus verschiedensten Geweben genutzt werden können (**PUBLIKATION V**, **UNVERÖFFENTLICHTE DATEN D. Moll**). Zusätzlich wurde für *in vivo* Analysen ein neuer Fluorophor charakterisiert, der, gekoppelt an cAMP, die Membranpermeabilität des zyklischen Nukleotids im Vergleich zu ungekoppeltem cAMP deutlich steigert und die Beobachtung der cAMP-Verteilung in Zellen ermöglicht (**PUBLIKATION VI**). Intramolekulare Konformationsänderungen, die durch cAMP-Bindung an den PKA-Holoenzymkomplex hervorgerufen werden, wurden mittels funktioneller Untersuchungen an mutagenisierten R-Untereinheiten analysiert und führten zu einem neuen Modell des Aktivierungsmechanismus der PKA (**PUBLIKATION I**).

Grundlegend für alle diese Arbeiten war die Entwicklung und Anwendung von Interaktionsstudien, welche die Bindung von cAMP und cAMP-Analoga an die R-Untereinheiten auf funktioneller Ebene charakterisieren. Im Folgenden werden nun die dazu angewandten Methoden im proteomischen Kontext eingehend betrachtet.

5.1 METHODEN FÜR PROTEOMISCHE STUDIEN – EINE ÜBERSICHT

Die genetische Information eines jeden Organismus wird in Form von Proteinen und Proteinkomplexen in eine zelluläre Funktion übersetzt. Im Kontrast zum eher statischen Genom stellt das Proteom die dynamische Gesamtheit aller exprimierten Proteine zu einem bestimmten

Zeitpunkt in einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organismus dar (Wasinger *et al.* 1995; Anderson *et al.* 1996; Wilkins *et al.* 1996). Die Komplexität des Proteoms wird zwar grundlegend vom Genom bestimmt, jedoch wird die Anzahl der translatierten Proteine durch alternatives Splicing und andere Prozessierungen um ein Vielfaches vergrößert (Aebersold *et al.* 2001; Nishimura *et al.* 2005). Nach Schätzungen können innerhalb einer Zelle bis zu einer Million unterschiedlicher Proteinspezies erreicht werden (Bauer *et al.* 2003).

Die Proteinzusammensetzung einer Zelle ist stark vom Zelltyp, dem Stadium im Zellzyklus und von äußeren Signalen auf einer Zelle abhängig. Die klassische Proteomanalyse (im Folgenden **Proteomics**, Abbildung 5.1) beschäftigt sich mit der (quantitativen) Betrachtung von Proteinmustern bzw. dem differenziellen Vergleich von Expressionsmustern unter verschiedenen zellulären Bedingungen. Proteomics gibt Aufschluß über die Proteinzusammensetzung einer Zelle und ermöglicht damit den Einblick in die Komplexität und Dynamik von grundlegenden Lebensvorgängen. Des Weiteren können durch den proteomischen Vergleich von gesundem und entartetem Gewebe z.B. Biomarker identifiziert werden, die eine Frühdiagnostik verschiedener Krankheiten ermöglichen könnten, wie beispielsweise bei bösartigen tumorösen Erkrankungen (Petricoin *et al.* 2002).

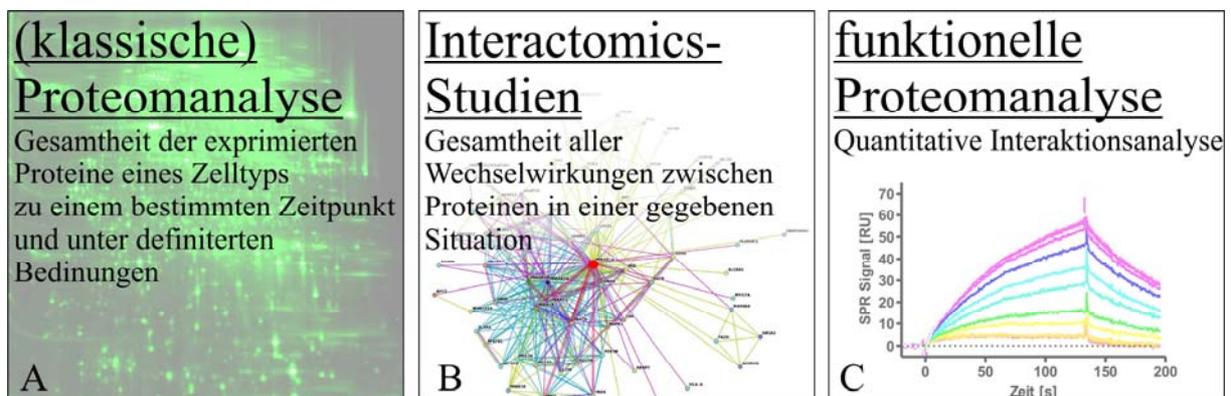


Abbildung 5.1 **Darstellung von drei aufeinander aufbauenden Ansatzpunkten zur Aufklärung eines dynamischen Proteoms.**

A In der (klassischen) Proteomanalyse wird die Gesamtheit der exprimierten Proteine mit ihren posttranslationalen Modifikationen identifiziert. Als Beispiel einer Proteomanalyse ist eine Proteinauftrennung mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2D-DIGE) dargestellt, auf der die exprimierten Proteine mittels Cy3 angefärbt wurden (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Katrin Marcus).

B Um ein Interaktionsnetzwerk, aufbauend auf der Proteomanalyse, zu erstellen, werden die Wechselwirkungen der identifizierten Proteine durch Interactomics-Studien untersucht. Als ein Beispiel ist das Proteininteraktionsnetzwerk der regulatorischen Untereinheit Typ α der PKA (roter Punkt in der Mitte) mit den derzeit bekanntesten direkten Interaktionspartnern dargestellt (Abbildung erstellt mit der Interaktionsdatenbank STRING (<http://string.embl.de>, (Snel *et al.* 2000; von Mering *et al.* 2003; von Mering *et al.* 2005; von Mering *et al.* 2007)).

C In der funktionellen Proteomanalyse werden bekannte Interaktionen quantitativ charakterisiert. Als Beispiel ist eine Interaktionsanalyse mit einem Oberflächenplasmonresonanz-Biosensor gezeigt.

Mittlerweile gibt es für proteomische Ansätze eine Vielzahl von Methoden, die in der Regel (1) untereinander und (2) mit hochauflösender Massenspektrometrie (MS) kombiniert werden: zweidimensionale Gelelektrophorese, metabolische (SILAC, *stable isotope labelling by amino acids in cell culture* (Martinovic *et al.* 2002; Ong *et al.* 2004)) und chemische Markierung mit stabilen Isotopen (ICAT, *Isotope coded affinity tag* (Gygi *et al.* 1999; Han *et al.* 2001)) oder isobare Markierung (iTRAQ, *isobaric Tagging for Relative and Absolute Protein Quantification*, Applied Biosystems, (Wu *et al.* 2006; Zieske 2006)), wodurch auch eine absolute Proteinquantifizierung möglich ist, sowie die Kombination aus Flüssigkeitschromatographie (*liquid chromatography*, LC) und online gekoppelter MS (Aebersold *et al.* 2001). Die klassische Proteomanalyse liefert jedoch keine Aussagen über die vorhandenen Proteinkomplexe und –netzwerke. Aber gerade Multiproteinkomplexe werden in zentralen zellulären Prozessen wie Stoffwechsel, Wachstum und Differenzierung entscheidende Funktionen zugeordnet (Alberts 1998; Jordan *et al.* 2000; Gavin *et al.* 2002; Gavin *et al.* 2003). Basierend auf diesen Proteomics-Studien können Protein-Protein-Wechselwirkungen systematisch identifiziert werden, die unter dem Begriff **Interactomics** zusammengefasst werden. Hierunter fällt sowohl die Identifizierung von permanenten Multiproteinkomplexe als auch von Interaktionspaaren, die durch Assoziation und Dissoziation an bzw. von einem Proteinkomplex regulatorische Funktionen ausüben (Abbildung 5.1). Die Modulation dieser intrazellulären Interaktionen erfolgt z.T. durch posttranslationale Modifikationen an den beteiligten Proteinen (Shaywitz *et al.* 2002). Das grundlegende Verständnis für diese Proteinnetzwerke kann jedoch nur durch die detaillierte Analyse der Protein-Wechselwirkungen (Protein-Protein, Protein-Ligand, Protein-Peptid, Protein-Nukleinsäure) erlangt werden (Stelzl *et al.* 2006). Diese Charakterisierung und Quantifizierung von Interaktionen fasst man unter dem Begriff **funktionelle Proteomforschung** zusammen (Abbildung 5.1, (Graves *et al.* 2002)). Durch die funktionelle Proteomforschung können Regulationsmechanismen von Signalwegen aufgeklärt werden. Darüber hinaus können auch neue Ansatzpunkte für Medikamente identifiziert werden, sowie ein besseres Verständnis von Wirkmechanismen und Nebeneffekten von therapeutischen Substanzen erzielt werden (Kellner 2000; Bauer *et al.* 2003; Graves *et al.* 2003; Pierce *et al.* 2007).

5.1.1 BIOMOLEKULARE INTERAKTIONSANALYSEN ALS EIN WERKZEUG DER FUNKTIONELLEN PROTEOMFORSCHUNG

Durch eine quantitative Analyse kann das Bindungsverhalten von Interaktionspartnern in ihrer Gesamtheit erfasst und in die Architektur eines intrazellulären Netzwerkes korrekt eingeordnet

werden. Dazu steht eine Vielzahl von (bio-)physikalischen, biochemischen wie auch molekularbiologischen Techniken zur Verfügung, die unter dem Oberbegriff Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA) zusammengefasst werden können (**ARTIKEL I**). Im Folgenden werden gängige BIA Methoden vorgestellt, von denen einige innerhalb dieser Arbeit zur Untersuchung von Wechselwirkungen im PKA-System angewandt wurde.

Jede BIA hat methodenbedingte Vor- und Nachteile sowie eine limitierte Auswahl an ermittelbaren Bindungsparametern (Gleichgewichtsbindungskonstanten, Geschwindigkeitskonstanten, thermodynamische Parameter, Bindungsstöchiometrien, IC_{50} , EC_{50} , **PUBLIKATION II**). Die individuelle Fragestellung und die zu bestimmenden Parameter sowie die Verfügbarkeit der Interaktionspartner gibt zumeist die Wahl der anzuwendenden BIA vor.

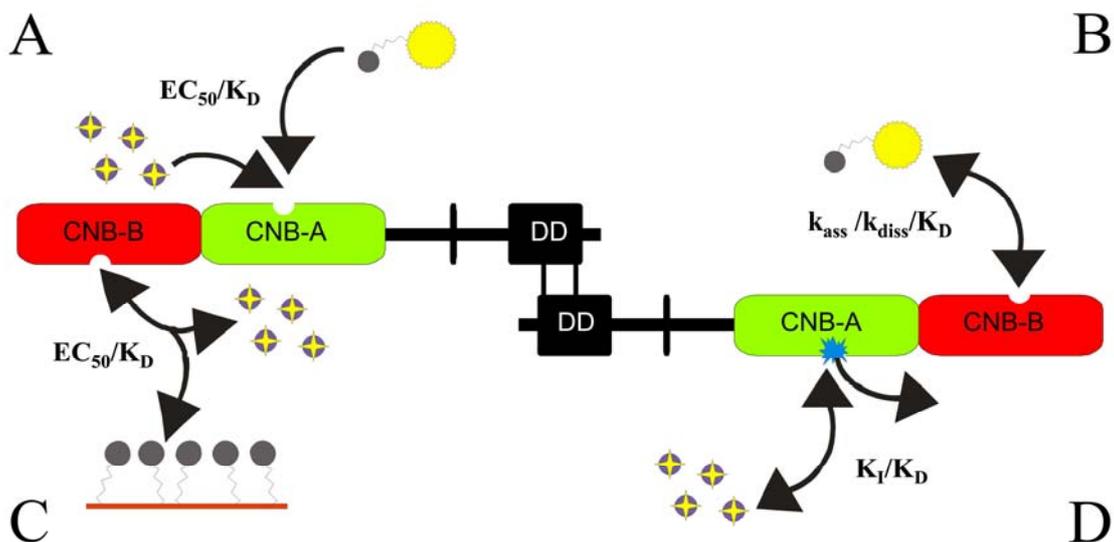


Abbildung 5.2 Schematische Darstellung von verschiedenen BIA Techniken zur Analyse von Nukleotid-Bindungen dargestellt an einer dimeren regulatorischen (R) Untereinheit der PKA

Dimere R-Untereinheit mit der Dimerisierungs und Docking (DD) Domäne und den beiden cAMP-Bindestellen CNB-A und CNB-B. Zyklische Nukleotide sind als grauer Kreis mit gelbem Stern gezeigt.

A: Kompetitiver Fluoreszenzpolarisations-Ansatz mittels fluoreszenzmarkiertem cAMP-Analog (grauer Kreis gekoppelt an gelb dargestellten Fluorophor)

B: Direkte Stopped-Flow Bindungsmessung mit Fluoreszenz-markiertem zyklischen Nukleotid-Analog

C: Oberflächenplasmonenresonanz-Kompetitionsansatz mittels immobilisiertem cAMP-Analog (graue Kreise mit Linker)

D: Kompetitiver Bindungsansatz mittels radioaktiv markiertem cAMP (blauer Stern).

Die ermittelbaren physikalischen und kinetischen Konstanten sind bei jeder Technik aufgeführt: EC_{50} (Effektive Konzentration 50%), K_D (Gleichgewichtsdissoziationskonstante), k_{ass} / k_{diss} (Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante), K_I (Gleichgewichtsdissoziationskonstante bestimmt über kompetitive Inhibition).

Zur Bestimmung der Gleichgewichtsbindungskonstante K_A oder K_D eignen sich sehr sensitive radioaktive Bindungsstudien (Abbildung 5.2D). Die Markierung eines Interaktionspartners erfolgt über den Einbau eines radioaktiven Isotops (z.B. 3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P , ^{133}I) innerhalb der

Struktur, so dass die Bindungseigenschaften nicht beeinflusst werden. Klassischerweise wurden cAMP-Analoga Bindungsstudien an die regulatorische (R) Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) durch einen Kompetitionsansatz mittels Tritium-markiertem-cAMP ($2,8 \text{ }^3\text{HcAMP}$) durchgeführt (Døskeland *et al.* 1983; Døskeland *et al.* 1988; Burghardt 2005). Da sich die Geschwindigkeitskonstanten (k_{ass} , k_{diss}) der cAMP-Bindung an die beiden Zyklonukleotidbindedomänen der R-Untereinheit (CNB-A und CNB-B) stark unterscheiden, ist es möglich sowohl die Bindung an das Dimer und als auch an die B Domäne separat zu betrachten. Dies wird durch eine geschickte Wahl der Puffer- und Temperaturbedingungen in verschiedenen Versuchsansätzen erreicht und vermittelt Einblicke in die Selektivität der verschiedenen cAMP-Analoga für die A und B Domäne (Døskeland *et al.* 1983; Døskeland *et al.* 1988; Ogreid *et al.* 1989; Schwede *et al.* 2000b; Burghardt 2005).

Mittels antikörpervermittelter-Technologien wie z.B. RIA (*radioimmunoassay* (Berson *et al.* 1959b, a)) oder ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay* (Engvall *et al.* 1971)) können K_A bzw. K_D zwischen Antikörper und Antigen bestimmt werden. Die Detektion erfolgt bei dem RIA über die radioaktive Markierung des Antigens oder des Antikörpers. Der ELISA ist eine nicht-radioaktive Alternative des RIA, der allerdings die Immobilisierung des Antikörpers erfordert. Hierbei erfolgt die Detektion über die Bildung eines Farbstoffes durch ein, an das Antigen oder den Antikörper kovalent gekoppeltes Enzym. Die ermittelten Gleichgewichtsbindungskonstanten sind vergleichbar mit anderen Methoden (Kim *et al.* 1990; Liliom *et al.* 1991; Orosz *et al.* 2002). Zusätzlich ermöglichen verschiedene Rechenmodelle auch die Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten durch ELISA-Analysen (Engvall *et al.* 1971; Zhuang *et al.* 2001). Der RIA wurde klassischerweise zur sensitiven Bestimmung von cAMP-Konzentrationen in Zellen genutzt (Harper *et al.* 1975; Brooker *et al.* 1979).

Eine universelle Technik zur Bestimmung von K_A bzw. K_D unter echten Gleichgewichtsbedingungen ohne Immobilisierung und im homogenen Format (ohne Separationsschritte wie z.B. Filtrieren) stellt die Fluoreszenzpolarisation (FP) dar ((Checovich *et al.* 1995; Jameson *et al.* 2005); **PUBLIKATION II, ARTIKEL I**, Abbildung 5.2A). Dazu muss der kleinere der beiden Interaktionspartner mit einem von mittlerweile tausenden Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden (Jameson *et al.* 2005). Der Fluorophor befindet sich nach Anregung mit polarisiertem Licht für 10^{-15} bis 10^{-9} Sekunden im angeregten Zustand. Bewegt sich nun der ungebundene, mit dem Fluorophor markierte Ligand im angeregten Zustand frei in Lösung, ist das emittierte Licht depolarisiert. Wird der markierte Ligand allerdings in dieser Zeit durch die Bindung an einen großen Interaktionspartner in seiner Bewegung behindert und

dadurch in der Anregungsebene gehalten, so ist das emittierte Licht in der gleichen Ebene polarisiert, was letztlich als Messsignal ausgelesen wird. FP-Messungen können die hohe Sensitivität (nanomolare bis picomolare Affinitäten) von radioaktiven Bindungsstudien erreichen (Burke *et al.* 2003; Jameson *et al.* 2005) und werden miniaturisiert im Hochdurchsatzverfahren (*high-throughput screening*, HTS) von fast allen Pharmaunternehmen während der Medikamentenentwicklung genutzt (Sportsman *et al.* 2003). Mittlerweile gibt es für die gängigen *drug targets* (Ansatzpunkte/Wirkmoleküle für Medikamente) FP-Ansätze, so z.B. für G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Kinasen, Proteasen, Phosphatasen und ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren (Burke *et al.* 2003). Allerdings müssen Ergebnisse aus direkten FP-Bindungsstudien in einem zweiten Verfahren mit einem nicht-markiertem Liganden validiert werden (Huang 2003).

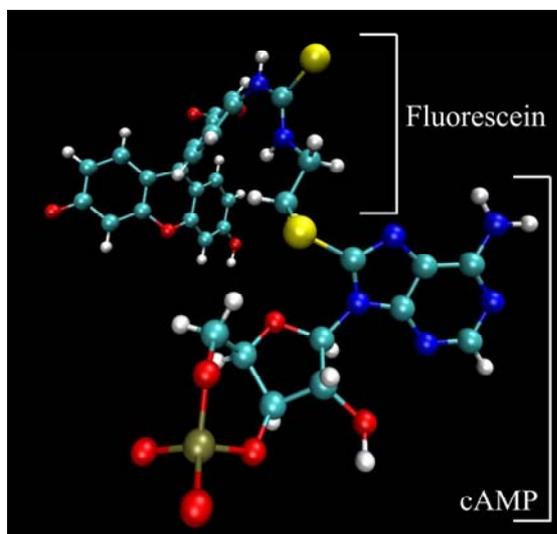


Abbildung 5.3 **Struktur von 8-Fluo-cAMP**

Im Vordergrund erkennt man die Struktur von cAMP, die über den Linker an der Position 8 des Adeninrings an den Fluorophoren Fluorescein gekoppelt ist. Die Farbkennzeichnung erfolgte nach dem cpk-Schema (C: hellblau; O: rot; N: dunkelblau; H: weiß; S: gelb; P: goldbraun). Visualisierung erfolgte mit VMD 1.8.5; (Humphrey *et al.* 1996)

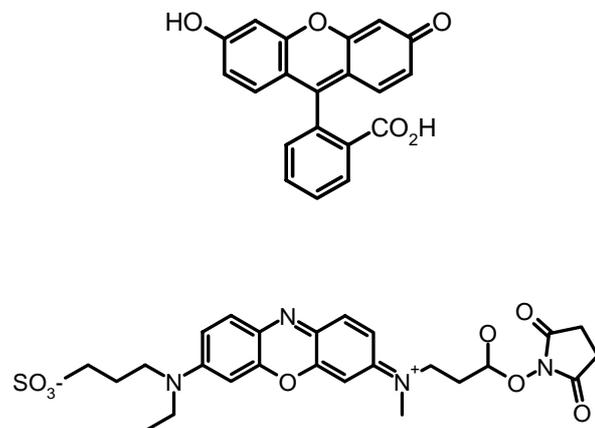


Abbildung 5.4 **Strukturvergleich der Fluorophore** Fluorescein (oben) und EVOblue (unten)

Der Fluorophore Fluorescein absorbiert im blauen Bereich (Ex: 490 nm) und hat einen Stokes Shift von 30 nm. Der Fluorophor EVOblue absorbiert im energieärmeren roten Bereich (Ex: 650 nm) und hat einen Stokes Shift von 20 nm.

Für die Bindung von zyklischen Nukleotiden an die regulatorische Untereinheit konnte im Rahmen dieser Arbeit ein kompetitiver FP-Ansatz mit 8-Fluo-cAMP (Abbildung 5.2A, Abbildung 5.3, chemische Bezeichnungen der cAMP-Analoga siehe Abkürzungsverzeichnis und Abbildung 9.17, (Caretta *et al.* 1989)) entwickelt werden (**PUBLIKATION III**). Die direkte FP-Bindungsanalyse zeigte im Einklang mit kompetitiven SPR- und ^3H -cAMP-Analysen identische Affinität von cAMP und 8-Fluo-cAMP an das RI Monomer sowie an die dimeren

RI- und RII-Untereinheiten ((Mucignat-Caretta *et al.* 1997; Schwede *et al.* 2000b; Burghardt 2005), **PUBLIKATION III**). Durch diese hohe Affinität von 8-Fluo-cAMP sind FP-Kompetitionsanalysen mit geringen Konzentrationen an R-Untereinheit (500 pM bis 2,5 nM) gut geeignet, um andere cAMP-Analoga schnell und einfach aufgrund ihrer Affinität zu charakterisieren (**PUBLIKATION III**, **PUBLIKATION VI**). Der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein eignet sich besonders gut, da der Fluorophor eine hohe Quantenausbeute von 90% besitzt (Magde *et al.* 2002) und wegen der weiten Verbreitung dieses Farbstoffes die Wellenlängenfilter (Ex 490 nm/ Polarisation Em 520 nm) kommerziell leicht erhältlich sind. Der Fluorophor scheint trotz seiner hohen Masse im Vergleich zu cAMP (487 Da Fluorescein zu 329 Da cAMP) nicht mit der Interaktion an die R-Untereinheiten zu interferieren.

Eine Modelldarstellung der Bindung von 8-Fluo-cAMP an die zyklischen Nukleotidbindungsdomäne (CNB, *cyclo nucleotide-binding domain*) B der RI α (Abbildung 5.5) zeigt, dass der Fluorophor sich außerhalb der CNB regelrecht an die R-Untereinheit anschmiegt und möglicherweise stabilisierend auf die cAMP-Bindung wirkt. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass 8-Fluo-cAMP eine relative Selektivität für die CNB-B aufweist (Mucignat-Caretta *et al.* 1997; Schwede *et al.* 2000b). Änderungen in Anregungs- und Emissionsspektren von 8-Fluo-cAMP in An- und Abwesenheit von sättigenden Konzentrationen RII-Untereinheit deuten auf unterschiedliches Bindungsverhalten an die beiden CNB hin (Mucignat-Caretta *et al.* 1997).

Für Fluoreszenzstudien mit niedrigerer Anregungsenergie als für 8-Fluo-cAMP notwendig, wurde cAMP an den Fluorophor EVOblue (Ex650 nm/Em670 nm) gekoppelt (Abbildung 5.4). Studien mit diesem 8-AEA-EVOblue-cAMP

(Abbildung 9.13) zeigten im Gegensatz zu 8-Fluo-cAMP, begründet in der deutlich geringeren Quantenausbeute des

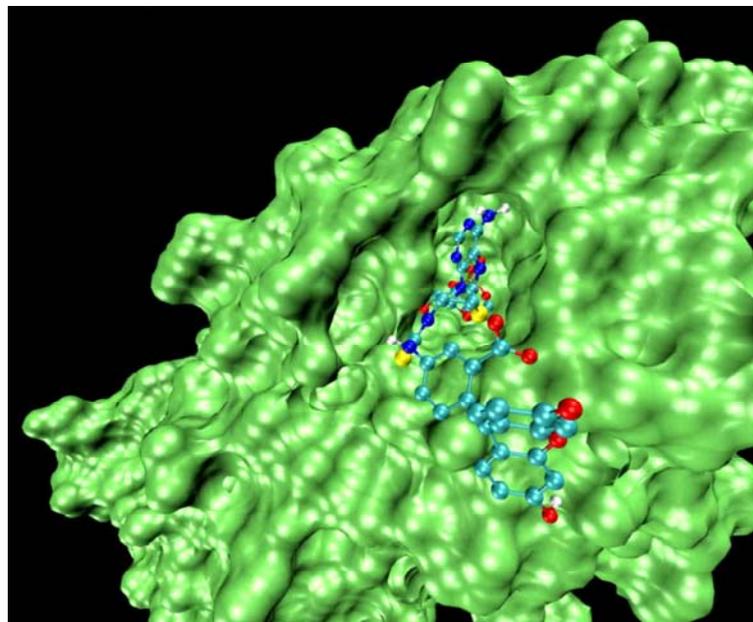


Abbildung 5.5 Modelldarstellung von 8-Fluo-cAMP gebunden in der CNB-B der RI α -Untereinheit

Darstellung der Oberflächenstruktur (grün) der RI α CNB-B (PDB 1NE4), in die 8-Fluo-cAMP mittels Autodock gemodelt wurde. Mit freundlicher Genehmigung von M. Götte, Visualisierung erfolgte mit VMD 1.8.5 (Humphrey *et al.* 1996).

Fluorophors (30%), ein erheblich höheres Signal/Rauschverhältnis. Weiterhin lieferten FP-Bindungsstudien erst ab einer Konzentration von 250 nM 8-AEA-EVOblue-cAMP (100x mehr als bei 8-Fluo-cAMP) ein detektierbares Polarisationsignal.

Unabhängige Untersuchungen von 8-AEA-EVOblue-cAMP mittels Einzelmolekülmessungen und SPR-Experimenten deuten darauf hin, dass die Affinität zur R-Untereinheit deutlich von der Linkerlänge zwischen cAMP-Molekül und EVOblue abhängt, wobei der kurze AEA (Aminoethylamino)- im Vergleich zum längeren AHA (Aminohexylamino)-Linker deutlich geringere Affinitäten aufweist ((Hahnefeld 2004), Hahnefeld, Moll, *et al.* Manuskript in Vorbereitung).

Ein weiteres HTS-fähiges Verfahren zur Untersuchung von Interaktionen *in vitro* ist der AlphaScreen (*Amplified luminescence proximity homogeneous assay*, **PUBLIKATION II**, **PUBLIKATION III**, **ARTIKEL I**). Dazu werden die beiden Interaktionspartner jeweils an Donor- bzw. Akzeptorkügelchen gekoppelt. Durch die Interaktion werden diese Latexkügelchen in räumliche Nähe gebracht. Durch Anregung des Donorkügelchens mit Licht entsprechender Wellenlänge wird Singulett-Sauerstoff freigesetzt, der das Akzeptorkügelchen zur Lumineszenz anregt (Ullman *et al.* 1994). Diese Methode zeichnet sich durch eine sehr hohe Sensitivität, einen geringen Hintergrund, ein daraus resultierendes gutes Signal/Rauschverhältnis und eine vielseitige Einsetzbarkeit aus. Anhand von AlphaScreen- und BRET-Studien konnte die Wirkung von cAMP-Agonisten und Antagonisten auf den intakten PKA-Holoenzymkomplex genauer untersucht werden (Gesellchen *et al.* 2006). Jedoch können mittels AlphaScreen keine direkten, sondern nur relative Bindungsdaten ermittelt werden, welche dann jedoch mit anderen Methoden korreliert werden können (**PUBLIKATION III**).

Für die Charakterisierung schneller Bindungskinetiken ist die Stopped-Flow Spektrometrie geeignet (Hargrove 2005). Dabei können k_{ass} und k_{diss} von zwei Interaktionspartnern in Echtzeit ermittelt werden (Abbildung 5.2B). Die beiden Interaktionspartner werden innerhalb von Millisekunden in einer Spritze vermischt und die Kinetik kann anhand von optischen Methoden, z.B. der Änderung der Fluoreszenzintensität (intrinsische Fluoreszenz oder Markierung einer der beiden Interaktionspartner mit einem Fluorophor) gemessen werden.

Zur direkten Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k_{ass} und k_{diss} eignet sich die Technik basierend auf dem physikalischen Prinzip der Oberflächenplasmonresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR). Die steigende Anzahl der Publikationen, die SPR Daten enthalten (2005 mehr als 1100 Publikationen) gibt eine Vorstellung von der Bedeutung der SPR-Technologie in der modernen BIA (Rich *et al.* 2000, 2001a, 2002, 2003, 2005a, b, 2006). Der heute am weitesten

verbreitetste SPR-Biosensor (Firma Biacore) besteht aus einem Sensor Chip, auf dem einer der Interaktionspartner (Ligand) immobilisiert wird, einer SPR Detektionseinheit zur Bestimmung der Massenänderung an der Sensoroberfläche und einem integrierten Mikroflusssystem, durch das der zweite Interaktionspartner (Analyt) über bis zu vier Sensoroberflächen geleitet wird (Karlsson 2004; Rich *et al.* 2007). (Für die Erklärung des genauen Detektionsprinzips sowie einer Übersicht über die verschiedenen Kopplungs- und Mess-Strategien siehe (Zimmermann *et al.* 2002; Cooper 2003; Hahnefeld *et al.* 2004; Gesellchen *et al.* 2005).) Die SPR-Technologie ist eine hochsensitive sowie markierungsfreie Festphasenmethode. So können prinzipiell Komplexbildungen von Molekülen aller Art (z.B. Proteine, Lipide, Nukleinsäuren) charakterisiert werden oder der Einfluss von kleinen Kofaktoren auf eine Bindung untersucht werden ((Torreri *et al.* 2005), **PUBLIKATION II**, **PUBLIKATION IV**, **ARTIKEL I**). Gerade für schwache oder transiente Bindungen ist die SPR-Technologie besonders geeignet, da diese Bindungen in anderen BIA oft nicht erfasst werden können ((Rich *et al.* 2007), **PUBLIKATION II**).

Die Kombination aus SPR-Technologie und MS-Analyse eröffnet die Möglichkeit, sogar geringste Mengen an selektiv gebundenen Analyten von der Sensoroberfläche zu eluieren und anschließend zu identifizieren ((Catimel *et al.* 2002; Catimel *et al.* 2005; Larsericsdotter *et al.* 2006), **PUBLIKATION V**). Neueste SPR-Sensoren verbinden bei gleichzeitiger Analyse von bis zu 400 immobilisierten Interaktionspartnern die Vorteile der Array-Technologie mit der SPR-Technologie und verknüpfen damit die Identifizierung von Interaktionspartnern bei gleichzeitiger Charakterisierung der kinetischen Bindung (Unfricht *et al.* 2005; Usui-Aoki *et al.* 2005; Wassaf *et al.* 2006).

In dieser Arbeit wurde die SPR-Technologie zur Charakterisierung der Interaktion zwischen den R-Untereinheiten und cAMP-Analoga in kompetitiven und kinetischen Bindungsstudien genutzt ((Hahnefeld 2004); **PUBLIKATION III**, **PUBLIKATION V**). In den kompetitiven Bindungsstudien konnte in enger Zusammenarbeit mit der Firma Biaffin GmbH & CO KG (Kassel) eine Vielzahl von cAMP-Analoga ihrer Affinität nach quantifiziert werden (Abbildung 5.2C, **PUBLIKATION III**)

Die Daten aus den kompetitiven SPR-, FP- und radioaktiven Bindungsstudien (Burghardt 2005) sowie Literaturdaten wurden in eine Datenbank (KinetXBase, siehe 5.1.4) eingepflegt, die im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit der Firma MicroDiscovery GmbH (Berlin) eigens dafür entwickelt wurde. Diese Datenbank ist in der Lage, die Vielzahl an gemessenen Interaktionen standardisiert zu erfassen und unter Zuhilfenahme der Datenbankfunktionen unter

verschiedenen Kriterien auszuwerten (**PUBLIKATION** in Vorbereitung). Dabei konnte der Fokus sowohl auf den unterschiedlichen Techniken und Messprinzipien als auch auf die Selektivität einzelner cAMP-Analoga an die beiden zyklonukleotid Bindungsdomäne (*cyclo nucleotide-binding domain*, CNB) der RI α -Untereinheit erfasst werden (**PUBLIKATION** in Vorbereitung).

Die durchgeführten kinetischen SPR-Bindungsstudien mit der R-Untereinheit und cAMP-Analoga ermöglichten durch van't Hoff- und Eyring-Analysen Einblicke in den Bindungsmechanismus und Übergangszustand der Interaktion unter thermodynamischen Gesichtspunkten (**PUBLIKATION IV**, siehe 5.1.2).

Die klassische thermodynamische Analyse von Interaktionen erfolgt allerdings über die universell einsetzbare Methode Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) (Wiseman *et al.* 1989; Doyle 1997; Cliff *et al.* 2003). Diese Methode zur Interaktionsanalyse von unmodifizierten Interaktionspartnern liefert neben den Gleichgewichtsbindungskonstanten auch die thermodynamischen Parameter (Änderung der Gibbs-Energie (ΔG , auch als freie Enthalpie, Gibbs-freie Energie oder Gibbs-Potenzial bezeichnet)), Änderung der Enthalpie (ΔH), Änderung der Entropie (ΔS) und die Änderung der Wärmekapazität (ΔC_p) sowie die Stöchiometrie(n) einer Bindung (Ladbury *et al.* 1996).

In einer isolierten Reaktionszelle wird ein Interaktionspartner vorgelegt und der Bindepartner durch eine rotierende Präzisionspritze hinzu titriert (Pierce *et al.* 1999). Die aufgenommene oder abgegebene Reaktionswärme (endothermen oder exothermen Reaktion) dient als Messsignal, aus der sich direkt ΔH ablesen lässt (Zeder-Lutz *et al.* 1997). Daraus folgt, dass athermale Reaktionen nicht mittels ITC untersucht werden können (Blandamer 1998). Durch die Entwicklung kompetitiver ITC Analysen (Sigurskjold *et al.* 1994; Zhang *et al.* 1998; Sigurskjold 2000; Leavitt *et al.* 2001) ist das Spektrum der messbaren Bindungsaffinitäten ($K_D = 100$ fM bis 10 M) deutlich erweitert worden (Velazquez Campoy *et al.* 2005). Die Kenntnis der thermodynamischen Parameter einer Bindung vermittelt Einblicke in den Bindungsprozess, die über die Affinität ($K_D \propto \Delta G$) hinausgehen. Identischen ΔG -Werten können, basierend auf der Gleichung $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, unterschiedliche thermodynamische Signaturen aus ΔH und ΔS zu Grunde liegen, die wiederum auf unterschiedliche Bindungsmechanismen hindeuten ((Luque *et al.* 2000, 2002), Abbildung 5.6). Damit ist die thermodynamische Charakterisierung einer Bindung hilfreich für das Verständnis des biomolekularen Erkennungsprozesses sowie essentiell bei der rationalen Medikamentenentwicklung (Doyle 1997; Luque *et al.* 2002; Weber *et al.* 2003; Holdgate *et al.* 2005).

Die Entwicklung von Medikamenten gegen Infektionskrankheiten gestaltet sich als schwierig, da häufig nach kurzer Zeit Resistenzen auftreten. Die Ursache für die Resistenzen bei Medikamenten, die auf Inhibition einer Enzymaktivität beruhen, sind häufig Punktmutationen in dem aktiven Zentrum des Erregerenzym. Dadurch wird die Affinität zum Medikament bzw. Inhibitor, aber nicht die zum physiologischen Substrat stark beeinflusst. Durch die thermodynamische Untersuchung von Proteaseinhibitoren, die bisher wirksamsten Medikamente gegen die HIV-Amplifikation, konnte gezeigt werden, dass eine Kombination aus enthalpisch und entropisch getriebenen Wechselwirkungen zwischen Medikament und Virusenzym die beste Kombination gegen Resistenzbildung ist (Ohtaka *et al.* 2002; Ohtaka *et al.* 2003).

Die thermodynamische Optimierung von Leitstrukturen in der Medikamentenentwicklung hat somit den Vorteil, dass die Selektion nicht nur aufgrund der Bindungsaffinität, sondern auch im Hinblick auf Resistenzen (weiter-) entwickelt werden kann ((Luque *et al.* 1998b; Luque *et al.* 2002; Ohtaka *et al.* 2002; Whitesides *et al.* 2006), **PUBLIKATION II**). Allerdings ist die Interpretation der erhaltenen Daten nicht trivial. Zum einen müssen die Änderungen der thermodynamischen Parameter für das äußerst komplexe Gesamt-System (z.B. Lösungsmittel-effekte, sowie entropische und enthalpische Konformationsänderungen der Interaktionspartner während der Bindung) bestimmt werden (Tame *et al.* 1998; Holdgate 2001; Ababou *et al.* 2006). Zum anderen ist gegenwärtig eine eindeutige Korrelation von thermodynamischen Signaturen biologischer Interaktionen zu strukturell aussagekräftigen Bindungsmechanismen ohne weitere Daten wie Kristallstrukturen nicht möglich (Tame *et al.* 1998; Cooper 1999; Cooper *et al.* 2001; Holdgate 2001).

Die Bindung von zyklischen Nukleotiden an die R-Untereinheit wurde im Rahmen dieser Arbeit thermodynamisch untersucht, um ein besseres Verständnis für die molekulare Erkennung

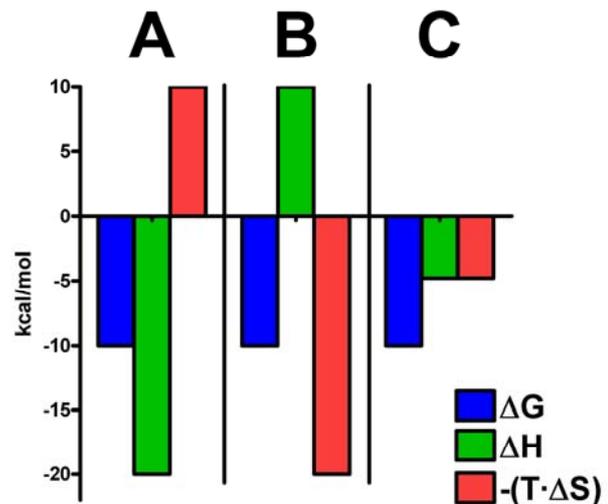


Abbildung 5.6 **Thermodynamische Signatur einer Bindung**

Die Affinität ($\Delta G \propto K_D$) der drei Beispielreaktionen A, B und C ist identisch, setzen sich aber jeweils aus unterschiedlichen Kombinationen von ΔH und $-T\Delta S$ zusammen. Reaktion A ist stark enthalpisch (negatives ΔH) favorisiert, während der entropische Term diesem entgegengesetzt ist (positives $-T\Delta S$). Reaktion B ist entropisch favorisiert und Reaktion C setzt sich aus gleichen Anteilen aus ΔH und $-T\Delta S$ zusammen.

von cAMP-Analoga im Vergleich zu cAMP zu erlangen (**PUBLIKATION II**, **PUBLIKATION III**, **PUBLIKATION IV**, siehe 5.1.2).

5.1.2 THERMODYNAMISCHE BETRACHTUNGEN VON PROTEIN-LIGAND-WECHSELWIRKUNGEN

Die molekulare Erkennung von Interaktionspartnern ist ein entscheidender Prozess in der zellulären Signaltransduktion (Whitesides *et al.* 2006). Einblicke in diesen Prozess könnten den Weg für rationales Design von Interaktionspartnern öffnen. Ein entscheidender Schritt für dieses Verständnis ist die Strukturaufklärung von sequenzierten Proteinen mit verschiedensten Interaktionspartnern mittels Röntgenstrukturanalyse und NMR-Technologie (nuclear magnetic resonance, Kernmagnetische Resonanz). Solche Strukturen sind allerdings statische Momentaufnahmen von nativ hochflexiblen Proteinen, deren Plastizität von kleinen Positionsverschiebungen einzelner Aminosäuren bis zu konformationellen Änderungen, die das ganze Protein betreffen, reichen (Carlson 2002). Aufbauend auf 3D-Strukturen können mittels Deuterium-Austausch-Experimenten Interaktionsflächen und sogar einzelne, an einer Bindung beteiligte Aminosäuren gezielt identifiziert werden. Dieses Vorgehen liefert dann oft entscheidende Hinweise auf den tatsächliche Bindungsprozess (Maier *et al.* 2005; Wales *et al.* 2006). Entscheidende Faktoren des Bindungsmechanismus sind die thermodynamischen Parameter der Reaktion (ΔH und $-T\Delta S$), deren Summe die Affinität ΔG definiert ($\Delta G = RT \ln K_D$).

Obwohl der Einfluss dieser thermodynamischen Parameter auf die einzelnen Ereignisse einer Bindung bisher nur in Ansätzen verstanden ist (Tame *et al.* 1998; Cooper 1999; Cooper *et al.* 2001; Holdgate 2001), können durch die Bestimmung der thermodynamischen Signatur einer Bindung in Kombination mit Strukturdaten neue Einblicke in den Bindungsmechanismus erlangt werden (Luque *et al.* 1998a; Svensson *et al.* 2002; Weber *et al.* 2003). Eine hydrophobe Interaktion zwischen einem Makromolekül und einem Liganden zeichnet sich thermodynamisch häufig durch eine kleine positive Änderung der Enthalpie (ΔH) und eine große negative Änderung des entropischen Terms ($-T\Delta S$) aus (Luque *et al.* 1998a; Holdgate 2001). Die negative Entropieänderung kann mit der Verringerung des Ordnungsgrades des Lösungsmittels nach der Bindung erklärt werden, da die beiden Oberflächen der apolaren Moleküle miteinander agieren und somit nach der Reaktion die Solvathülle kleiner ist und mehr Lösungsmittelmoleküle frei beweglich vorliegen (Holdgate 2001). Generell sind Bindungen von geladenen Gruppen an Makromoleküle oft entropisch angetrieben und gehen mit kleinen

enthalpischen Änderungen einher (Dalpiaz *et al.* 2000; Holdgate 2001). Interaktionen über Wasserstoffbrücken (WSB) zeigen meist sehr geringe Änderungen der thermodynamischen Parameter, da für die Bildung von WSB in einem Makromolekül-Liganden-Komplex erst WSB zwischen Ligand und Lösungsmittel sowie zwischen Makromolekül und Lösungsmittel gebrochen werden müssen (Holdgate 2001). Generell gehen Bindungen über WSB, elektrostatische Wechselwirkungen und van-der-Waals Interaktionen mit einer Änderung von ΔH einher (Svensson *et al.* 2002).

In dieser Arbeit wurde die Bindung von cAMP, cAMP-Agonisten (6-AH-cAMP, Abbildung 9.10; 8-AHA-cAMP, Abbildung 9.16; cGMP, Abbildung 9.2; Sp-cAMPS, Abbildung 9.23) und eines cAMP-Antagonisten (Rp-cAMPS, Abbildung 9.24) an verschiedene Konstrukte der RI α -Untereinheit thermodynamisch untersucht (die Strukturen der cAMP-Analoga befinden sich im Anhang unter 9.2). Alle untersuchten cAMP-Analoga binden in einer (stark) exothermen Reaktion an die zyklonukleotid Bindungsdomänen (*cyclo nucleotide-binding domain*, CNB) R-Untereinheiten, wobei der entropische Term dieser treibenden Kraft entgegengesetzt ist (Publikation II, Publikation III, Publikation IV, unveröffentlichte Daten D. Moll). Die Bindung von cAMP an die CNB von Epac1 (*exchange protein directly activated by cAMP*, zyklonukleotidregulierter Guaninnukleotid-Austauschfaktor) zeigt ein vergleichbares Verhältnis der thermodynamischen Parameter, wobei aufgrund der deutlich niedrigeren Affinität von Epac1 zu cAMP ($K_D=20 \mu\text{M}$) die absoluten Werte deutlich geringer sind (Rehmann *et al.* 2003a). Die niedrigere Affinität im Vergleich zur R-Untereinheit gründet sich vermutlich auf das Fehlen einer WSB von Epac1 (entsprechend Glu200 der R-Untereinheit) zum 2'OH der Ribose (Enserink *et al.* 2002; Rehmann *et al.* 2003a).

Im Gegensatz zu diesen Daten zeigt die Bindung von cAMP an die beiden CNB des *E. coli* Proteins CAP (*catabolite activator protein*) unterschiedliche thermodynamische Signaturen. Während die Bindung des ersten cAMP-Moleküls an CAP sowohl entropisch als auch enthalpisch favorisiert ist, wird die Bindung des zweiten cAMP-Moleküls kooperativ, endotherm und rein entropisch angetrieben (Gorshkova *et al.* 1995; Lin *et al.* 2002). Die nicht-kooperative Bindung des CAP-Antagonisten cGMP ist an beide Bindedomänen enthalpisch und entropisch favorisiert (Gorshkova *et al.* 1995; Lin *et al.* 2002), während die cGMP-Bindung an die R-Untereinheit nur enthalpisch angetrieben wird.

Die Auftragung von ΔH - gegen $-T\Delta S$ -Werte ergibt für viele biologische Interaktionen eine Gerade, die dem „Bereich der Gibbs-Energie“ („ ΔG window““) entspricht (Cooper *et al.* 2001). Eine solche Darstellung der thermodynamischen Parameter ist in Abbildung 5.7 für die oben

beschriebenen Zyklonukleotidbindenden Proteine zusammengestellt. Deutlich zu erkennen sind die enthalpisch getriebenen Interaktionen der R-Untereinheit mit cAMP und Analoga (rot und lila), wobei die Bindung keine thermodynamische Kompensation zeigt, wie sie für viele Untersuchungen von Agonisten und Antagonisten beobachtet wurde (Dalpiaz *et al.* 1998; Borea *et al.* 2000; Gilli *et al.* 2005). Eine thermodynamische (Agonisten-Antagonisten) Kompensation liegt vor, wenn die Bindung des Agonisten über ΔH begünstigt ist, während der Antagonist über den entropischen Term favorisiert wird oder umgekehrt (Borea *et al.* 2000). Allerdings wirkt Rp-cAMPS auf den intakten PKA-Holoenzymkomplex antagonistisch und nicht allein auf die hier untersuchte CNB-A der RI α -Untereinheit, so dass für genauere Aussagen die thermodynamischen Parameter für die Bindung von Agonist und Antagonist an den Holoenzymkomplex ermittelt werden müssten. Dies gestaltet sich praktisch allerdings als schwierig, da bei dieser Interaktion viele thermodynamische Prozesse (Bindung, konformationelle Umlagerung, Dissoziation von R-Untereinheit und C-Untereinheit) stattfinden können, die in ihrer Komplexität mathematisch schwer auswertbar sind (**UNVERÖFFENTLICHTE DATEN D. Moll**). Trotzdem ist zu erkennen, dass im Vergleich zum Agonisten Sp-cAMPS die Bindung des Antagonisten Rp-cAMPS thermodynamisch deutlich in Richtung einer entropisch favorisierter Interaktionen geht. Dies deckt sich auch mit den Strukturdaten, welche belegen, dass die Bindung von Rp-cAMPS die Flexibilität der R-Untereinheit deutlich erhöht ((Wu *et al.* 2004a; Das *et al.* 2007a), siehe auch Abbildung 5.12), so dass die molekularen Freiheitsgrade im Molekül zunehmen. Dies führt thermodynamisch zu einer Abnahme von $-T\Delta S$. Diese Erkenntnisse könnten auch erklären, warum Modifikationen am Antagonist Rp-cAMPS zur Steigerung der Affinität bisher immer unweigerlich zur Synthese eines Agonisten geführt haben: Wenn die Modifikationen am Antagonisten neue WSB oder van-der-Waals-Wechselwirkungen mit der R-Untereinheit eingehen (Affinitätssteigerung durch negativeres ΔH), sich die Reaktion aber nur auf der gezeigten linearen Regression in Abbildung 5.7 bewegen kann, führt dies gleichzeitig zu einer Erhöhung des entropischen Terms und damit wieder zur Bildung eines Agonisten. Vom thermodynamischen Standpunkt her sollte bei der Entwicklung von neuen (affineren) PKA-Antagonisten die vermehrte Bildung neuer bzw. die Verstärkung von bereits vorhandenen Wechselwirkungen zwischen der CNB sowie dem cAMP-Analog im Vordergrund stehen.

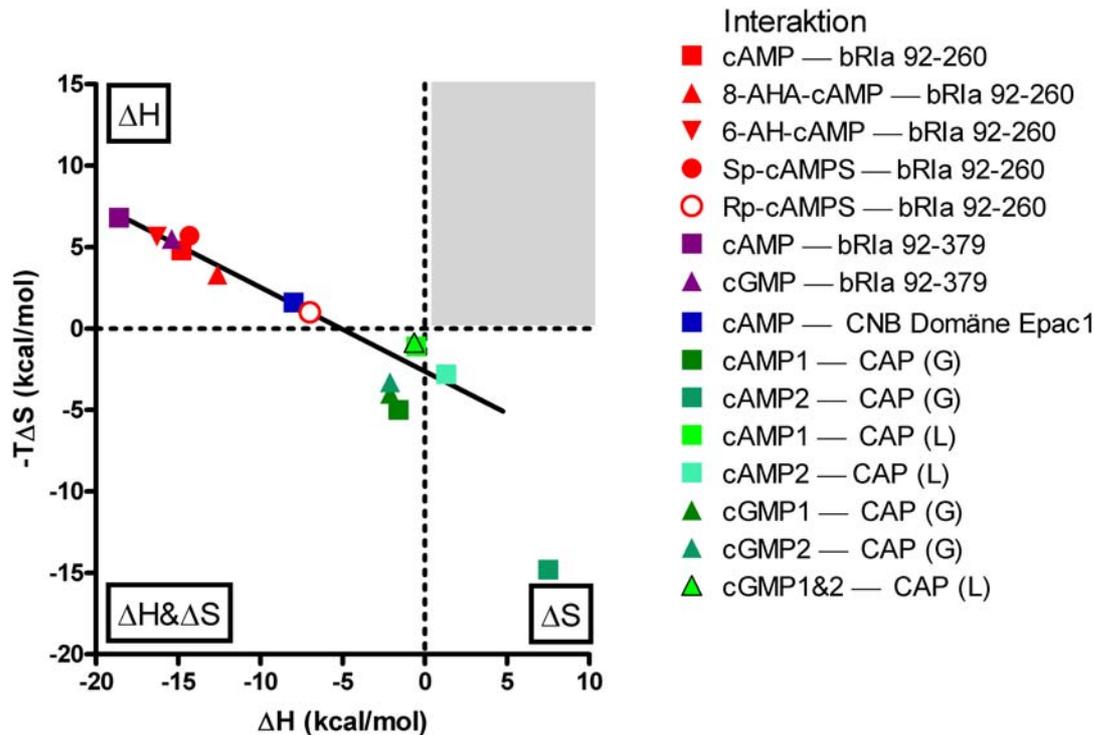


Abbildung 5.7 Darstellung des „ ΔG window“ für Nukleotidbindungen an verschiedene cAMP-bindende Proteine.

Aufgetragen sind die ΔH - gegen $-T\Delta S$ -Werte von verschiedenen Zyklonukleotidbindungen. ΔH : Reaktionen in diesem Quadranten sind enthalpisch favorisiert; ΔS : Reaktionen in diesem Quadranten sind entropisch favorisiert $\Delta H\&\Delta S$: Reaktionen in diesem Quadranten sind entropisch und enthalpisch angetrieben. Rot: Interaktionen mit der A-Domäne der R1 α -Untereinheit der PKA, lila: Interaktion mit dem Monomer der R1 α -Untereinheit, blau: Interaktion mit Epac1, grün: Interaktionen mit CAP. Die lineare Regression wurde durch die thermodynamischen Signaturen der R-Untereinheit gelegt.

Interaktionen: cAMP —, 8-AHA-cAMP —, 6-AH-cAMP — bR1 α 92-260: **PUBLIKATION IV**; Sp-cAMPS —, Rp-cAMPS — bR1 α 92-260: **UNVERÖFFENTLICHTE DATEN** D. Moll; cAMP — bR1 α 92-379: **PUBLIKATION II**; cGMP — bR1 α 92-379: **PUBLIKATION III**, cAMP — CNB Domäne Epac1: (Rehmann *et al.* 2003a), cAMP1 —, cAMP2 —, cGMP1 —, cGMP2 — CAP: Bindung an die erste (1) oder zweite (2) CNB von CRP. (G) aus (Gorshkova *et al.* 1995); (L) aus (Lin *et al.* 2002)

Die Enthalpie-Entropie-Kompensation ist ein weiteres, häufig vorkommendes Prinzip in der thermodynamischen Analyse von molekularen Interaktionen (Cooper *et al.* 2001). Sie beschreibt die Erfahrung, dass gravierende Änderungen der thermodynamischen Parameter meist mit einer kleinen Änderung der Affinität einhergehen. Dies könnte daran liegen, dass biologische Systeme sich durch ein sehr fein ausbalanciertes Netzwerk von Interaktionen regulieren, deren Funktionen deutlich mehr von ΔG als von den Beiträgen ΔH und $-T\Delta S$ abhängen. Geänderte Lebensbedingungen können somit in der Evolution eine drastische Änderung des Bindungs- und Erkennungsmechanismus erzwingen, die dann aber durch thermodynamische Kompensation ohne große funktionelle Einbußen vonstatten geht (Cooper

1999; Cooper *et al.* 2001). Die Enthalpie-Entropie-Kompensation konnte in dieser Arbeit bei vergleichenden Bindungsstudien von immobilisiertem zu frei in Lösung vorliegenden 6-AH-cAMP an die R-Untereinheit beobachtet werden (**PUBLIKATION IV**). Durch die Immobilisierung von 6-AH-cAMP an eine SPR-Sensoroberfläche änderte sich, bei nahezu gleichbleibendem ΔG , der ermittelte ΔH Wert um mehr als 4 kcal mol^{-1} im Vergleich zu Messungen in freier Lösung. Im Gegensatz dazu zeigt die Bindung von 8-AHA-cAMP nahezu identische thermodynamische Signaturen, unabhängig von der Messmethode, und damit keine Enthalpie-Entropie-Kompensation. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Position im cAMP, über die das Analog immobilisiert wird, entscheidend für den Bindungsmechanismus an die R-Untereinheit ist. Interessanterweise änderte sich die thermodynamische Equilibriums- und Übergangszustands-Signatur von 6-AH-cAMP durch die Immobilisierung an die Sensoroberfläche zu Signaturen, die mit 8-AHA-cAMP vergleichbar sind (**PUBLIKATION IV**). Dies könnte darauf hindeuten, dass 6-AH-cAMP durch die Immobilisierung vermehrt von der syn- in die anti-Konformation wechselt, die 8-AHA-cAMP aufgrund der Linkerposition in Lösung bevorzugt einnimmt.

5.1.3 NEUE MEMBRANPERMEABLE FLUOROPHORE ERMÖGLICHEN DIE UNTERSUCHUNG DER cAMP-DYNAMIK *IN VIVO*

In vivo Untersuchungen von cAMP und cAMP-Analoga vermitteln im Gegensatz zu den im Vorfeld beschriebenen Methoden keine Erkenntnisse über den physikalischen Bindungsmechanismus, aber dafür neue und wichtige Einblicke in die temporale und lokale Regulation dieses sekundären Botenstoffes im zellulären System.

Einerseits ist die Verteilung von cAMP in Zellen nur durch die Diffusionsgeschwindigkeit kontrolliert (Bacskai *et al.* 1993; Chen *et al.* 1999). Andererseits werden mittels auf FRET-basierten cAMP-Sensoren streng regulierte cAMP-Mikrodomänen gefunden (Zaccolo *et al.* 2002). (Die FRET- (*Fluoreszenz Resonanz Energy Transfer*) sowie die BRET- (*Bioluminescence Resonanz Energy Transfer*) Technik beruhen auf dem Prinzip des Förster Transfers, bei dem nur dann Energie von einem Fluorophor (Donor) auf einen anderen Fluorophor (Akzeptor) strahlungslos übertragen wird, wenn beide Fluorophore sich in relativer Nähe zueinander befinden (max. 10 nm) und das Emissionsspektrum des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors überlappt (Förster 1948; Stryer *et al.* 1967; Stryer 1978).) Mittels Fusion der R- und C-Untereinheit der PKA an Donor und Akzeptor konnten hochsensible FRET-Biosensoren (sogenannte cAMP-Sensoren) generiert werden, die es

ermöglichen, die zeitliche und räumliche Verteilung von cAMP *in vivo* detailliert aufzulösen (Adams *et al.* 1991; Johnson *et al.* 1993; Zaccolo *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2001; Zaccolo *et al.* 2002))

Diese *in vivo* Detektion von cAMP erfolgt indirekt über die artifiziellen cAMP-bindenden Proteine, die durch Überexpression in den zu untersuchenden Zellen vorliegen. Diese (zusätzlichen) Proteine können durch eigene Aktivität erhebliche Einflüsse auf das gesamte Zellsystem aufweisen (Nikolaev *et al.* 2006). Eine direkte Untersuchung der intrazellulären cAMP-Verteilung in Zellen wird durch die Hydrophobizität erschwert, die endogenes cAMP vor dem Eindringen aber auch Verlassen der Zelle schützt (Schultz *et al.* 1993). Aus diesem Grund sind aber auch extrazelluläre Anwendungen ineffektiv (Robison *et al.* 1968).

Schon früh wurden membrangängige cAMP-Derivate synthetisiert (Posternak *et al.* 1962; Falbriard *et al.* 1967; Henion *et al.* 1967; Posternak *et al.* 1974), wobei allerdings unklar ist, ob die gemessene Steigerung der Phosphorylaseaktivität an einer besseren Permeabilität oder an einer besseren Aktivierung der PKA durch diese Derivate lag (Sutherland 1972). Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Fluoreszenzfarbstoffe (benannt nach dem bekannten Leuchtturm von Alexandria: „Pharos“) physikalisch charakterisiert, von denen in ersten Experimenten 8-[Pharos-575]-cAMP (8-[ϕ -575]-cAMP, Abbildung 9.19) eine deutlich gesteigerte Membrangängigkeit aufweist (**PUBLIKATION VI**). Des Weiteren bindet 8-[ϕ -575]-cAMP Aufgrund dieser Daten wurden weitere Pharos-Fluoreszenzfarbstoffe entwickelt, von denen einer (Pharos-450) eine deutlich gesteigerte Quantenausbeute (88% im Vergleich zu 30% Pharos-575, **UNVERÖFFENTLICHTE DATEN D. Moll**) zeigte, der jedoch *in vivo* noch getestet werden muss. Der Nutzen dieser fluoreszierenden Nukleotide liegt vor allem in der Detektion der intrazellulären Verteilung von cAMP und dessen Bindungspartnern (Mucignat-Caretta *et al.* 1997; Cremo 2003). Allerdings treten in 8-[Pharos-575]-cAMP behandelten Zellen Aggregate auf (**PUBLIKATION V**), die Ähnlichkeiten aufweisen zu bekannten Aggregaten zwischen 8-Fluo-cAMP und der RI-Untereinheit (Mucignat-Caretta *et al.* 1999). Als Perspektive könnten antagonistisch wirkende Rp- ϕ -cAMPS-Analoga in Kombination mit den cAMP-Sensoren *in vivo* die Verteilung des Antagonisten verfolgen und gleichzeitig seine physiologischen Effekte auf cAMP-bindende Proteine näher charakterisiert werden. Die Anwendung dieser neuen Farbstoffe beschränkt sich aber nicht auf die Untersuchung von cAMP-Signalwegen, sondern darüber hinaus könnten auch andere interessante Biomoleküle durch Markierung mit den Pharos-Fluoreszenzfarbstoffen membranpermeabel gemacht werden. Andere Anwendungsbereiche für die neuen Pharos-Fluoreszenzfarbstoffe könnten sich im Gebiet der

Proteomforschung ergeben. So werden Fluoreszenzfarbstoffe zur Detektion wie auch für die gelbasierte Proteinquantifizierung über einen weiten dynamischen Konzentrationsbereich eingesetzt (Abbildung 5.1A), die neuen Pharos-Fluoreszenzfarbstoffe könnten hier Verwendung finden (Westermeier *et al.* 2005).

5.1.4 INTERAKTIONS-DATENBANKEN

Die ermittelten Bindungsdaten aus unterschiedlichen BIA-Methoden, die teilweise im HTS Verfahren innerhalb kurzer Zeit eine große Anzahl an Interaktionsdaten generieren, werden schnell unüberschaubar. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit im Rahmen einer Kooperation mit der Firma MicroDiscovery GmbH (Berlin) ein methodenübergreifendes Datenbanksystem (KinetXBase) zur Speicherung von generierten Interaktionsdaten entwickelt. KinetXBase bietet standardisierte und methodenbezogene Eingabemasken für die strukturelle Aufarbeitung der Daten und vielfältige Suchfunktionen, um methodenübergreifend Interaktionsdaten zu vergleichen und zu interpretieren (**PUBLIKATION** in Vorbereitung). Um komplexe Interaktionsnetzwerke nicht nur quantitativ zu erfassen, ist es dringend notwendig auch die Vielzahl an publizierten qualitativen Interaktions- und Regulationsdaten mit einfließen zu lassen.

Um diese Netzwerke strukturiert zusammenzufassen und weltweit der Wissenschaft zugänglich zu machen, entwickelte man schon fünf Jahre nachdem der Begriff Proteomics geprägt wurde die ersten Interaktionsdatenbanken, so z.B. die Datenbank BIND (Biomolecular Interaction Network Database, (Bader *et al.* 2000; Bader *et al.* 2001; Alfarano *et al.* 2005)). BIND wurde in BOND (Biomolecular Object Network Databank, <http://bind.ca>) integriert, in der neben den Interaktionsdaten, Beschreibungen molekularer Komplexe und Signalwege auch die Sequenzinformationen erfasst sind. Mittlerweile existiert eine Vielzahl, teilweise organismenspezifischer, Datenbanken, die biologische Netzwerke auf das Wesentliche konzentrieren können (Xia *et al.* 2004). Mittels dieser Datenbanken ist es nun möglich die Informationsmenge so zu reduzieren, dass daraus neue Aspekte sichtbar werden (Komponenten-Analyse), mit denen die Entwicklung von Liganden, basierend auf rationalem Design, ermöglicht werden.

5.2 RATIONALES DESIGN VON cAMP-ANALOGA UND IHRE ANWENDUNG

In dieser Arbeit wurden die quantitativen Ergebnisse von einer Vielzahl von cAMP-Analoga-Interaktionsanalysen an die verschiedenen R-Untereinheiten zusammengefasst und auf wenige Parameter reduziert ((Rannels *et al.* 1980; Corbin *et al.* 1982; de Wit *et al.* 1982; O'Brian *et al.* 1982; Døskeland *et al.* 1983; Rothermel *et al.* 1983; de Wit *et al.* 1984; Van Haastert *et al.* 1984; Ogreid *et al.* 1985; Pereira *et al.* 1987; Rothermel *et al.* 1988; Ogreid *et al.* 1989; Dostmann *et al.* 1990; Schwede *et al.* 2000b; Schwede *et al.* 2000a; Burghardt 2005), **PUBLIKATION III**, **PUBLIKATION** in Vorbereitung). Basierend auf dieser Übersicht konnten Annahmen über den Einfluss einzelner Modifikationen am cAMP getroffen werden. Diese Annahmen bildeten die Grundlage für die Entwicklung optimierter cAMP-Analoga für gekoppelte Affinitätsreinigung (cAMP-Agarosen) (**PUBLIKATION V**, siehe 5.2.1).

Die Studie vom Interactom eines Proteins oder eines sekundären Botenstoffes kann mit einer Vielzahl von Methoden erfolgen (siehe 5.2.2). In dieser Arbeit wurden die entwickelten cAMP-Agarosen in einer Interactomics-Studie genutzt, um die R-Untereinheit der PKA mit ihren Interaktionspartnern anzureichern und zu identifizieren (siehe 5.2.3). In einem zweiten Schritt wurden auch antagonistisch wirkende cAMP-Analoga weiterentwickelt, die es ermöglichten, den PKA-Holoenzymkomplex zusammen mit gebundenen Interaktionspartnern aus komplexen Proteingemischen zu isolieren (**PUBLIKATION V**, siehe 5.2.4).

5.2.1 NEUE cAMP-ANALOGA ZUR REINIGUNG ALLER ISOFORMEN DER REGULATORISCHEN UNTEREINHEIT

Schon 1971 erkannte man das Potential von matrixgekoppelten cAMP-Analoga (6-AC-cAMP, Abbildung 9.8) zur Fraktionierung der R-Untereinheiten aus partiell vorgereinigter PKA aus tierischem Gewebe (Wilchek *et al.* 1971). Allerdings war die Affinität der R-Untereinheit zu den bis dahin entwickelten cAMP-Analoga für eine schonende Elution zu hoch. Die Elutionen wurden daher unter vollständig denaturierenden Bedingungen (7 M Harnstoff) durchgeführt und die R-Untereinheit danach wieder renaturiert (Ramseyer *et al.* 1974). Nach dieser harschen Elution wurden starke Proteindegradation und Aktivitätsverlust beobachtet (Jergil *et al.* 1974). Die Synthese eines neuen cAMP-Analogs (6-AE-cAMP, Abbildung 9.9) machte die Elution der R-Untereinheiten bei 30°C in Gegenwart hoher cAMP-Konzentrationen (30 mM) möglich, was aber wiederum zu partiell degradiertem Protein führte (Dills *et al.* 1975). Bei Verwendung von 8-AEA-cAMP Agarose (im Gegensatz zu 8-AHA-cAMP Agarose) konnten 30-40% der

gesamten adsorbierten R-Untereinheit mit cAMP (25 mM, 35°C) eluiert werden, wobei auch hier als Ausgangsmaterial über Anionenaustauschchromatographie vorgereinigter PKA-Holoenzymkomplex eingesetzt wurde (Ramseyer *et al.* 1976). Dabei zeigte sich immer deutlicher, dass die Linkerposition wie auch die Linkerlänge am cAMP eine ganz entscheidende Rolle für die Elutionseffizienz spielt ((Ramseyer *et al.* 1976), **PUBLIKATION IV**, **PUBLIKATION V**). Bei einer Gegenüberstellung von cAMP-Affinitätschromatographie und klassischer Anionenaustauschchromatographie von Potter *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Reinigung über immobilisierte cAMP-Analoga zu deutlich geringeren Ausbeuten (3 mg aus 8 kg Material) als die klassische Reinigung (10 mg) über DEAE-Zellulose (Potter *et al.* 1978) führte. Somit wurde in den folgenden Jahren entweder mit renaturierten (Builder *et al.* 1980; Buechler *et al.* 1991), cAMP-gesättigten (Saraswat *et al.* 1986; Diller *et al.* 2000) oder über Anionenaustauschchromatographie fraktionierten (Corbin *et al.* 1977) R-Untereinheiten gearbeitet. Auch zur Reinigung der rekombinant exprimierten R-Untereinheiten wurden diese Strategien (geringfügig modifiziert) verwendet (Zick *et al.* 1982; Saraswat *et al.* 1986; Saraswat *et al.* 1988; Buechler *et al.* 1991; Diller *et al.* 2000; Kopperud *et al.* 2002). Zur Erleichterung der Reinigung wurden die R-Untereinheiten auch als Fusionskonstrukte mit Affinitäts-Tags exprimiert ((Solberg *et al.* 1994; Kopperud *et al.* 2002; Dao *et al.* 2006)), wobei jedoch sowohl die Fusion an den N-Terminus als auch an den C-Terminus als problematisch gilt. Modifikationen am N-Terminus liegen direkt an der Dimerisierungsdomäne der R-Untereinheiten und könnten sowohl die Dimerisierung als auch die Bindung an AKAP beeinflussen (Herberg *et al.* 2000). Am C-Terminus angebrachte Modifikationen liegen direkt an den cAMP-Bindedomänen und könnten damit die cAMP-Bindungseigenschaften durch sterische Effekte stark beeinflussen. Die Affinitäts-Tags wurden dann entweder in einem zusätzlichen (Reinigungs-)Schritt abgespalten (Solberg *et al.* 1994) oder das Fusionsprotein direkt verwendet. Somit fehlten bisher Strategien für die Reinigung der dimeren R-Untereinheiten, insbesondere der RI α .

Zusammengefasst sind die Kriterien für eine optimale Reinigungsstrategie sowohl eine effiziente und selektive Anreicherung des zu isolierenden Proteins in seiner aktiven Form wie auch eine bislang nicht mögliche wirkungsvolle Elution unter milden Bedingungen (**PUBLIKATION V**).

In Kooperation mit der Firma Biolog Life Science Institute (Bremen) wurden drei cAMP-Analoga rational entwickelt, welche aufgrund ihrer Struktur die genannten Kriterien für eine gekoppelte Affinitätschromatographie aller vier Isoformen der R-Untereinheit, speziell der RI α ,

erfüllen (**PUBLIKATION V**). Diese neuen cAMP-Analoga gehören alle zur Gruppe der Sp-cAMPS-Analoga, bei denen der axiale exozyklische Sauerstoff der Phosphatgruppe gegen einen Schwefel ausgetauscht ist (Baraniak *et al.* 1979). Diese Gruppe zeichnet sich durch eine etwa 10fach geringere Affinität zu den R-Untereinheiten im Vergleich zu cAMP aus (de Wit *et al.* 1982; de Wit *et al.* 1984). Durch die Variation der zur Kopplung an die Agarosematrix verwendeten Linkerpositionen und -längen konnten unterschiedliche Bindungs- und Elutionsprofile erzeugt werden (**PUBLIKATION V**). Für die selektive Reinigung der vier Isoformen der R-Untereinheit ist das an der Position 8 des Adeninringes gekoppelte cAMP-Analog mit kurzem Aminoethyllinker (Sp-8-AEA-cAMPS, Abbildung 9.28) am effizientesten (**PUBLIKATION V**). Diese neue Reinigungsstrategie ermöglicht es nun, große Mengen an cAMP-freier und vor allem biologisch hoch aktiver R-Untereinheit zu isolieren. Diese hochkonzentrierte und reine R-Untereinheit kann im Anschluss für weitere Nukleotidbindungsstudien genutzt werden (**PUBLIKATION VI**).

5.2.2 INTERACTOMICS: DIE SYSTEMATISCHE ANALYSE VON PROTEIN-PROTEIN-WECHSELWIRKUNGEN

Um die Rolle der R-Untereinheiten im zellulären Kontext besser verstehen zu können, und nicht nur einzelne Interaktionen *in vitro* quantitativ zu erfassen, wurde in dieser Arbeit ausgehend von cAMP eine Interactomics-Studie durchgeführt. Für Interactomics-Studien gibt es allerdings eine Vielzahl von *in vitro* und *in vivo* Methoden, wovon einige im Folgenden kurz vorgestellt werden (Phizicky *et al.* 1995; Zhu *et al.* 2003).

Mittels der *Yeast Two Hybrid*-Methode (Hefedihybridsystem, YTH, (Fields *et al.* 1989)) konnte bereits eine Vielzahl von binären *in vivo* Interaktionen aufgeklärt werden (Cagney *et al.* 2000; Parrish *et al.* 2006). Diese Methode basiert auf der Translation eines Reportergens als Folge der Interaktion einer DNA-Bindedomäne (DBD) mit einer Transkriptionsaktivierungsdomäne (AD) eines Transkriptionsfaktors. Durch die Trennung der Domänen und die Fusion der DBD an das zu untersuchende Protein (Köderprotein) und der AD an potentielle Interaktionspartner kann nur bei erfolgter Interaktion der beiden Proteine (im Zellkern) die Transkription des Reportergens stattfinden. Mittels YTH-Analysen im Hochdurchsatzverfahren (*high-throughput screening*, HTS) und mittlerweile zahlreicher modifizierter Ansätze konnten komplexe Proteinnetzwerke z.B. von krankheitsrelevanten Signalwegen näher charakterisiert werden (Fromont-Racine *et al.* 1997; Uetz *et al.* 2000; Ito *et al.* 2001; Goehler *et al.* 2004).

Für ein *in vitro* Screening von Protein-Protein Interaktionspaaren im miniaturisierten HTS eignet sich vor allem die Protein-Array-Technologie (Stoll *et al.* 2002; Templin *et al.* 2002b, a). Hierbei kann, beginnend mit einzelnen Proteinen bis zum gesamten Proteom, ein Interaktionspartner als Mikrosport auf eine Oberfläche immobilisiert werden (Schweitzer *et al.* 2003). Für einige Organismen, z.B. für *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe), sind vorgespottete Arrays bereits kommerziell erhältlich. Der fragliche Interaktionspartner, welcher mittels Fluoreszenz, Chemilumineszenz oder Radioaktivität markiert vorliegt, wird zusammen mit den immobilisierten Proteinen inkubiert und die Bindung anhand der Markierung detektiert (Templin *et al.* 2003).

Durch die Verwendung einer Tandemaffinitätsreinigung (*tandem affinity purification*, „Tap Tagging“) (Rigaut *et al.* 1999; Puig *et al.* 2001; Gavin *et al.* 2002) kombiniert mit MS können relevante *in vivo* Interaktionen und Proteinkomplexe identifiziert werden (Gavin *et al.* 2006). Dazu wird das Köderprotein mit einen oder mehrere Affinitäts-Fusionsanteilen generiert und auf endogenem Niveau in Zellen exprimiert. Die Reinigung des Köderproteins mit den gebundenen Interaktionspartnern erfolgt über den Affinitäts-Tag (Burckstummer *et al.* 2006). Für verschiedene Isoformen der katalytischen (C) Untereinheit der PKA wurde eine modifizierte Tandemaffinitätsreinigung erfolgreich entwickelt und es konnten sowohl bekannte Interaktionspartner (z.B. PKI, R-Untereinheit, 14-3-3 ϵ , katalytische Untereinheit der Proteinphosphatase γ) verifiziert sowie CARP-1 (*cell cycle and apoptosis regulatory protein-1*) als ein neuer Interaktionspartner identifiziert werden (Erlbruch 2007; Erlbruch *et al.* in preparation).

Zur Identifikation von *in vivo* Protein-Protein Interaktionen findet häufig auch eine Methodenkombination aus Affinitätschromatographie und MS Verwendung (Bauer *et al.* 2003). Eine typische Affinitätsreinigung beruht auf der Interaktion zwischen Antikörper und Antigen (Co-Immunpräzipitation oder auch „Pull down“ genannt), wobei der (kovalent) an eine Matrix gekoppelte Antikörper das Antigen spezifisch und reversibel aus komplexen Proben (z.B. lysierte Zellen, Gewebe oder komplexe Körperflüssigkeiten) adsorbiert und die gebundenen Proteine dann eluiert werden können. Die anschließende Identifizierung der interagierenden Proteine erfolgt über MS. Die Anwendung dieses Prinzips beschränkt sich jedoch nicht nur auf Antikörper-Antigen Interaktionen (Ajuh *et al.* 2000; Wang *et al.* 2000; Schumacher *et al.* 2007), sondern wurde z.B. auch für Interaktionen zwischen Enzyminhibitor-Enzym (Daub 2005), Hormon-Rezeptor, (GST-)Protein-Protein (Becamel *et al.* 2002), Peptid-Proteinkomplex (Husi *et al.* 2000) oder RNA-Protein (Neubauer *et al.* 1998) erfolgreich durchgeführt. Im Gegensatz zum YTH System oder einer Tandemaffinitätsreinigung können mit dieser Methode

Interaktionspartner von Sub-Proteomen ohne Eingriff in das Expressionsmuster mit natürlichen, prozessierten und posttranslational modifizierten Proteinen aus beliebigem Material identifiziert werden (Xia *et al.* 2004; Selbach *et al.* 2006; Tribl *et al.* 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einer Methodenkombination aus Affinitätschromatographie und anschließender Analyse des isolierten Sub-Proteoms mittels MS das Interactom um den sekundären Botenstoff cAMP aus Rinderherz- und Schweinehirngewebe eingehend untersucht (**PUBLIKATION V**, siehe 5.2.3, 5.2.4). Dazu wurde die Affinitätsreinigung mit verschiedenen an Agarosematrizes gekoppelten cAMP-Analoga durchgeführt. Neben bekannten cAMP-bindenden Proteinen wie den R-Untereinheiten der PKA konnten sowohl bekannte wie auch bisher unbestätigte Interaktionspartner dieser Proteine identifiziert werden. Parallel konnten bereits im Rahmen einer Diplomarbeit in der Abteilung Biochemie cAMP-Agarosen erfolgreich eingesetzt werden, um cAMP-bindende Proteine aus *Dictyostelium discoideum* zu isolieren und massenspektrometrisch zu identifizieren. Durch den Vergleich von vegetativen und differenzierten Zellen wurde dabei zusätzlich die differenzielle Expression cAMP-bindender Proteine über iTRAQ quantitativ untersucht (Roth 2006).

5.2.3 ANREICHERUNG VON cAMP-BINDENDEN PROTEINEN MIT IHREN NATÜRLICHEN INTERAKTIONSPARTNERN

Die rational entwickelten cAMP-Agarosen, basierend auf den neu entwickelten Analoga stellen einen entscheidenden Schritt bei der selektiven Anreicherung und Elution in cAMP-Interactomics-Studien dar. Bisher wurden cAMP- (und auch cGMP-) Agarosen genutzt, um cAMP- sowie cGMP-bindende Proteine zusammen mit deren Interaktionspartnern aus komplexen Proteingemischen anzureichern und mittels MS zu identifizieren (Scholten *et al.* 2006; Scholten *et al.* 2007). Eine effiziente Elution cAMP-bindender Proteine war bisher nicht möglich, da die verwendeten Analoga (8-AET-cGMP, Abbildung 9.14; 2-AH-cGMP, Abbildung 9.4; 8-AEA-cAMP, Abbildung 9.12; 2-AHA-cAMP, Abbildung 9.3) eine sehr hohe Affinität zu den R-Untereinheiten aufweisen (Scholten *et al.* 2006; Scholten *et al.* 2007). Erste Versuche mit den neu entwickelten Sp-cAMPS-Analoga (Sp-8-AEA-cAMPS, Abbildung 9.28; Sp-8-AHA-cAMPS, Abbildung 9.30; Sp-2-AEA-cAMPS, Abbildung 9.26) konnten zeigen, dass aus Schweinehirngewebe je nach Linkerposition eine sehr unterschiedliche Anzahl und Zusammensetzung von Proteinen spezifisch angereichert und mit cAMP wieder eluiert werden konnten (Abbildung 5.8, siehe 9.3).

Von der Sp-8-AEA-cAMPS-Agarose konnten alle vier Isoformen der R-Untereinheit angereichert und eluiert werden (*Bande 1, 2*). Die beiden prominenten Banden auf dem SDS-Gel wurden als GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, *Bande 3*) und LDH (Laktatdehydrogenase, *Bande 4*) identifiziert. Beides sind Proteine, die mit hoher Affinität NAD^+ (Nicotinamid-adenin-dinucleotid) binden. Verantwortlich für diese „Kontamination“ ist vermutlich das Adeninmotiv im cAMP, welches diese Enzyme als Erkennung für NAD^+ nutzen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass speziell das hoch abundante GAPDH eine Präferenz für den 8-AEA- und 8-AET-Linker am cAMP besitzt (Laukens *et al.* 2001; Scholten *et al.* 2006).

Beim Anreichern von cAMP-bindenden

Proteinen aus Schweinegehirn mit Sp-2-AEA-cAMPS-Agarose zeigte die Elution mit cAMP ein deutlich vielfältigeres Bandenmuster im Vergleich zur Sp-8-AEA-cAMPS-Agarose (Abbildung 5.8, siehe 9.3). Hier konnten ebenfalls alle vier Isoformen der R-Untereinheit eindeutig mittels MS Analyse nachgewiesen werden (Abbildung 5.8, *Banden 12, 13*). Darüber hinaus wurden aber auch bekannte Interaktionspartner der R-Untereinheiten gefunden: die AKAP (Synonyme der genannten AKAP siehe 9.1) MAP2 (*Bande 6*, (Theurkauf *et al.* 1982)), AKAP 5 (*Bande 9*, (Bregman *et al.* 1989)), AKAP 9 (*Bande 15*, (Bailly *et al.* 1989; Schmidt *et al.* 1999)) und Ezrin (*Bande 6*, (Dransfield *et al.* 1997)).

AKAP 5 und AKAP 9 sind bekannte Vertreter der AKAP Familie im Gehirn, während MAP2 ubiquitär exprimiert wird (Tasken *et al.* 2004). Ezrin konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal in Gehirn- und Muskelgewebe detektiert werden (**PUBLIKATION V**, Abbildung 5.8). Bisher wurde dieses AKAP nur in sekretorischen Zellen nachgewiesen (Tasken *et al.* 2004). Ein publizierter Interaktionspartner von AKAP 5 (und auch AKAP 6), die Calcium-abhängige-Phosphatase Calcineurin, konnte ebenfalls eindeutig identifiziert werden (*Bande 11*) (Coghlan *et al.* 1995; Oliveria *et al.* 2003; Pare *et al.* 2005). Des Weiteren wurde das im Gehirn abundant

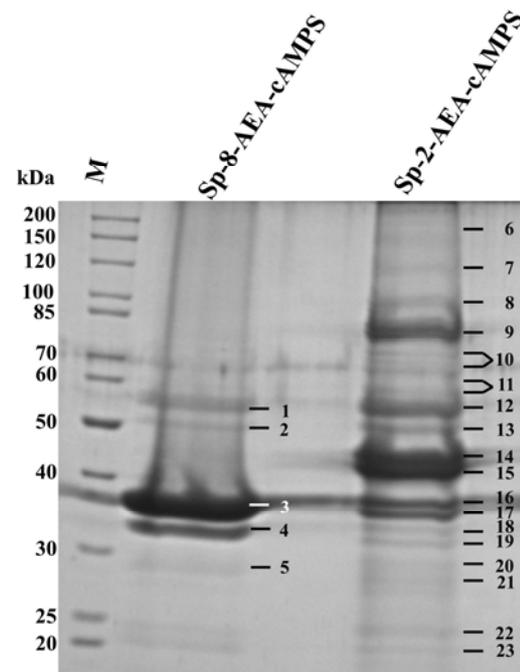


Abbildung 5.8 **cAMP-Elutionen von den Sp-cAMPS-Agarosen, SDS-PAGE.** Präparation von cAMP-bindenden Proteinen und deren Interaktionspartnern aus Schweinegehirn mittels zweier Sp-cAMPS-Agarosen (Sp-8- und Sp-2-AEA-cAMPS). Die markierten Proteinbanden wurden mittels MS identifiziert.

vorkommende Adapterprotein 14-3-3 (Isoformen ϵ , γ , ζ , *Banden 5, 21*) isoliert, das sowohl als Substrat der PKA beschrieben ist (Gu *et al.* 2006) als auch direkt mit der RII β Isoform und mit AKAP 13 interagiert (Carr *et al.* 1992; Diviani *et al.* 2004; Angrand *et al.* 2006). Ein weiterer bekannter Interaktionspartner von 14-3-3, aber auch von AKAP 5 (*Bande 9*) ist die in dieser Untersuchung ebenfalls identifizierte Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase, (CaMK, *Bande 12*) (Angrand *et al.* 2006). Die CaMK kann wiederum auch über das Protein Calmodulin direkt in Verbindung zu Ca^{2+} abhängigen cAMP-Signalwegen stehen (Martin *et al.* 2006). Eine bekannte Kolokalisation von PKA und PKG (Proteinkinase G, *Bande 10*) wurde bisher über das AKAP Ezrin (Yun *et al.* 1998; Cha *et al.* 2005) oder über das Protein Caveolin-1 (Linder *et al.* 2005) gezeigt, wobei das AKAP Ezrin in dieser Studie (*Bande 6*) ebenfalls detektiert werden konnte. Ein weiteres identifiziertes Proteine ist das 20 kDa große Onkogen DJ-1 (PARK 7, *Bande 23*) (Nagakubo *et al.* 1997; van Duijn *et al.* 2001), welches bekanntermaßen eine Interaktion mit GAPDH eingeht (Cookson 2005). DJ-1 ist ein Sensor für oxidativen Stress und verschiedene Mutationen im DJ-1 Gen stehen im Zusammenhang mit familiärem Parkinson (Pankratz *et al.* 2004). Ein weiteres bereits bekanntes Protein im cAMP-Signalweg ist das 74 kDa Protein Synapsin-1 (*Bande 9*). Es ist sowohl das presynaptische (Haupt-)Substrat der PKA als auch ein Substrat der CaMK und vermittelt die synaptische Vesikel-Exocytose in Neuronen (Bonanomi *et al.* 2005; Menegon *et al.* 2006). Die PDE10A (*Bande 8*) ist ein bekanntes Substrat der PKA (Kotera *et al.* 2004). Durch die Phosphorylierung am Thr17 wird die Golgi-Lokalisation aufgehoben und PDE10A kann frei ins Cytosol diffundieren (Kotera *et al.* 2004).

Auffällig ist auch das gehäufte Auftreten von Enzymen des Kohlenhydratstoffwechsels (siehe auch (Scholten *et al.* 2006)) wie Phosphofruktokinase (*Bande 9*) Glykogenphosphorylase (*Bande 8*), Pyruvatkinase (*Bande 11*), Enolase (*Bande 13*), Pyridoxalkinase (*Bande 17*) Glutaminsynthetase (*Bande 14*) und Adenylatkinase (*Bande 23*). Eine unspezifische Bindung der identifizierten Proteine an die Agarosematrix ist auszuschließen, da vergleichende Untersuchungen mit aktiviertem und sukzessive deaktiviertem Agarosematerial keine der angereicherten Proteine gezeigt haben, welche von der cAMP-gekoppelten Agarosen eluiert werden konnten (UNVERÖFFENTLICHTE DATEN D. Moll).

Auch mit der Sp-2-AEA-cAMPS-Agarose wurden die unspezifisch gebundenen Proteine GAPDH und LDH über einen weiten Banden-Bereich (*Banden 16, 18, 19, 20*) gefunden, allerdings sind die angereicherten Mengen deutlich geringer als mit der an der Position 8 verlinkten Agarose. Weitere Versuche konnten zeigen, das gerade GAPDH und LDH durch

mehrmalige Waschschr tte mit NADH von den Sp-Agarosen hochselektiv eluiert werden und damit diese Verunreinigungen vermindert werden können (UNVERÖFFENTLICHTE DATEN D. Moll).

Für eingehendere Studien der nativ gebildeten und aus Gewebe gezogenen Komplexe bietet sich eine 2D-Gelelektrophorese an, bei der eine Auftragung der eluierten intakten Komplexe in der ersten Dimension auf einem nativen Gel stattfindet (Blue-Native-PAGE, BN-PAGE), welche die unterschiedlichen Interaktionskomplexe voneinander trennt und dann in der zweiten denaturierenden Dimension die Komponenten der einzelnen Komplexe separiert (Camacho-Carvajal *et al.* 2004).

Die Ergebnisse aus diesen Arbeiten geben neue Einblicke in die cAMP-vermittelten Netzwerke. Speziell im Gehirn scheinen cAMP-bindende Proteine wichtige Funktionen zu übernehmen. Auch die R-Untereinheiten der PKA kommen gerade im Gehirn abundant vor und die Phänotypen von R-Deletionsmutanten weisen Defizite in den kognitiven Fähigkeiten auf (Chin *et al.* 2002). Des Weiteren sind Zusammenhänge zwischen dem zweiten cAMP-Effektorprotein Epac und neurodegenerativen Krankheiten bekannt (McPhee *et al.* 2005). Außerdem spielen Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Serin und Threoninresten eine Schlüsselrolle in der Regulation von synaptischer Plastizität im Hippocampus (Winder *et al.* 2001). Neueste Erkenntnisse zeigen, dass cAMP-abhängige Ionenkanäle wichtige Funktionen in der Gedächtnisbildung erfüllen (Salinas *et al.* 2007; Wang *et al.* 2007). Generell eröffnet die Untersuchung von Sub-Proteomen des Gehirns die Möglichkeit, spezifische Einblicke in Gehirnfunktionen zu bekommen (Tribl *et al.* 2006).

Die hier gezeigte Identifizierung von bekannten Interaktionspartnern und die erhöhte Stabilität der Sp-cAMPS-Analoga gegenüber Degradation durch Phosphodiesterasen (Schaap *et al.* 1993) verifiziert diese Methode für weitere cAMP-Interactomics-Studien, z.B. aus verschiedenen Organismen, Geweben und Materialien.

5.2.4 ANREICHERUNG DES INTAKTEN HOLOENZYMKOMPLEXES DER PKA MIT SEINEN NATÜRLICHEN INTERAKTIONSPARTNERN

Neben den neu entwickelten Sp-cAMPS-Agarosen, die primär zur effizienten Reinigung rekombinant exprimierter R-Untereinheiten eingesetzt werden sollten, wurden auch Analoga speziell mit dem Fokus auf cAMP-Interactom-Studien entwickelt. Dabei handelte es sich im Vergleich zu den agonistischen Sp-cAMPS-Analoga um antagonistisch wirkende Rp-cAMPS-Analoga, bei denen der  quatoriale exozyklische Sauerstoff der Phosphatgruppe gegen einen

Schwefel ausgetauscht ist (Baraniak *et al.* 1979). Von Rp-cAMPS abstammende Derivate sind die einzigen bekannten Antagonisten für PKA. Sie binden an die R-Untereinheit im Holoenzymkomplex, initiieren aber keine Dissoziation (Van Haastert *et al.* 1984; Dostmann *et al.* 1990; Dostmann *et al.* 1991; Dostmann 1995). Mit Rp-cAMPS-Agarosen kann daher gezielt der intakte PKA-Holoenzymkomplex gebunden werden, so dass zusätzlich zu den Interaktionspartnern der R-Untereinheit (neue) Interaktionspartner der katalytischen Unterheit (z.B. AKIP) sowie Interaktionspartner des gesamten Holoenzymkomplexes aus Proteingemischen herausgezogen werden können.

Mittels der Rp-8-AHA-cAMPS-Agarose (Abbildung 9.31) konnten aus Rinderherzgewebe 82 Proteine angereichert und über MS-Analyse identifiziert werden (**PUBLIKATION V**). Neben drei Isoformen der R-Untereinheit (RI α , RII α , RII β) und der C α -Untereinheit der PKA wurden zwei AKAP in diesem Ansatz identifiziert: AKAP 2 und Ezrin (SDS-PAGE siehe **PUBLIKATION V**). AKAP 2 konnte mittels cAMP-Analoga Agarosen erst vor Kurzem zum ersten Mal in Herzgewebe nachgewiesen werden (Scholten *et al.* 2006). Des Weiteren konnte das bekannte PKA Substrat Calpastatin (Proteaseinhibitor) (Salamino *et al.* 1994; Cong *et al.* 1998) identifiziert werden. Außerdem konnte sowohl die Rho-Kinase (*Rho-associated protein kinase 2*, ROK α , ROCK2), die das AKAP Ezrin phosphoryliert, wie auch Vinculin (ein Aktinbindendes Protein und möglicher Tumorsuppressor) (Rodriguez Fernandez *et al.* 1993; Rudiger 1998; Porter *et al.* 2001) eindeutig nachgewiesen werden. Mit Rp-8-AHA-cAMPS konnte in diesem Experiment auch das potentielle A-Kinase-Interaktionsprotein AIF (*apoptosis inducing factor*, persönliche Mitteilung Mira Sastri) isoliert werden (**PUBLIKATION V**).

Bei Untersuchungen von Schweinehirngewebe mit Rp-cAMPS-Agarosen konnte, neben den schon im Zusammenhang mit den Sp-Agarosen genannten Proteinen (Abbildung 5.9, Calcineurin *Bande 24*; alle vier Isoformen der R-Untereinheit *Banden 25, 26, 34, 35*; 14-3-3 $\alpha/\beta, \epsilon, \gamma$ *Bande 30*; MAP2 & AKAP 9 in *Bande 32*; Glykogenphosphorylase & PDE10A2 in *Bande 33*) die C α -Untereinheit eindeutig nachgewiesen werden (*Bande 27, 37*).

Weiterhin konnte über die Anreicherung mit Rp-8-AEA-cAMPS-Agarose (Abbildung 9.29) das Protein Myomegalin (*PDE4D interacting protein*, *Bande 32*) identifiziert werden, welches die Phosphodiesterase 4 (PDE4) in der Golgi/Centrosom-Region lokalisiert (Jin *et al.* 1998; Verde *et al.* 2001).

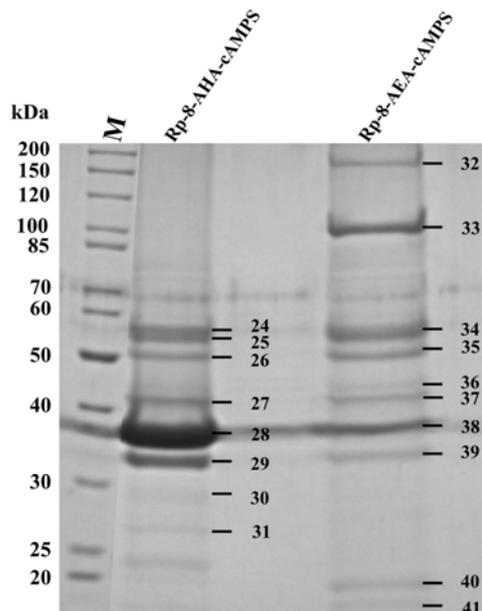


Abbildung 5.9 **cAMP-Elutionen von den Rp-cAMPS-Agarosen, SDS-PAGE.** Präparation des intakten Holoenzymkomplexes von PKA und deren Interaktionspartnern, sowie Rp-cAMPS-bindende Proteine aus Schweinegehirn mittels zweier Rp-cAMPS-Agarosen (Rp-8-AHA- und Rp-8-AEA-cAMPS). Die markierten Proteinbanden wurden mittels MS identifiziert.

Über diesen Ansatz wurde jedoch auch eine Vielzahl von Proteinen als potentielle Interaktionspartner identifiziert, deren Rolle in der cAMP-Signaltransduktion noch genauer geklärt werden muss (siehe 9.3). Ein Vergleich der eluierten Interaktionspartner von Rp-cAMPS-Agarosen zeigte wie auch schon bei den Sp-cAMPS Agarosen eine deutliche Abhängigkeit der angereicherten Proteine von der Linkerlänge (Abbildung 5.9, **PUBLIKATION V**). Erstaunlicherweise zeigte die Rp-8-AHA-cAMPS-Agarose eine deutlich höhere Affinität zu den Enzymen GAPDH und LDH als die Rp-8-AEA-cAMPS-Agarose. Basierend auf diesen Ergebnissen eignet sich die Rp-cAMPS-Agarose mit dem kurzen Aminoethylamino-Linker an der Position 8 des Adeninringes am besten für weitere Studien.

Sowohl die Rp- wie auch die Sp-cAMPS-Analoga sind im Vergleich zu cAMP relativ stabil gegen den Abbau durch Phosphodiesterasen (Botelho *et al.* 1988; Schaap *et al.* 1993) und werden somit bei der Inkubation mit Zell-Lysaten nur geringfügig degradiert. Dies stellt einen entscheidenden Vorteil gegenüber den bisher genutzten cAMP-Agarosen dar. Im Vergleich zu den Sp-cAMPS-Agarosen ziehen die antagonistischen Rp-cAMPS-Analoga ein andere Zusammensetzung an Interaktionspartnern aus den Lysaten (**PUBLIKATION V**, Abbildung 5.8, Abbildung 5.9). Die vermehrte Identifizierung von PKA Substraten aus diesen Ansätzen kann zu der Annahme führen, dass die Lokalisierung der PKA mittels AKAP nicht nur in die Nähe von Substraten erfolgt (Shabb 2001; Carnegie *et al.* 2003; Tasken *et al.* 2004), sondern Substrate direkt an AKAP gebunden sein können. Um diese Annahme näher zu untersuchen, könnte die Elution von den Rp-cAMPS-Agarosen mit einem antagonistischen Rp-cAMPS-Analog erfolgen, welches die natürlichen Komplexe nicht dissoziiert aber trotzdem von der Agarose eluiert. Für eine MS-Analyse müssten diese Komplexe dann über eine 2D-Gelelektrophorese zunächst in der ersten Dimension nativ voneinander getrennt werden und im zweiten Schritt durch eine SDS-PAGE in die einzelnen Komponenten der Komplexe aufgetrennt werden (Camacho-Carvajal *et al.* 2004). Die

Ergebnisse aus dieser Methodenkombination würden neue detailliertere Einblicke in die cAMP-induzierten Signalwege und Signalkomplexe vermitteln (Abbildung 1.1).

5.3 UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS DER AKTIVIERUNG VON PKA

Nicht nur die zellulären Signalwege von cAMP sind von hohem wissenschaftlichem Interesse, sondern auch die molekularen Mechanismen, mit denen cAMP Prozesse in der Zelle reguliert.

Der Hauptbindedpartner von cAMP in der eukaryotischen Zelle ist die R-Untereinheit der PKA, die durch cAMP in ihrer katalytischen Aktivität reguliert wird. Die molekularen Grundlagen dieses Mechanismus sind bis heute Gegenstand der Forschung. Nachdem cAMP an die Zyklonukelotid-Bindungsdomänen (CNB) der R-Untereinheit gebunden hat, muss das Signal, welches die Dissoziation des Holo Komplexes auslöst, über intramolekulare Wechselwirkungen an die inhibitorische Sequenz der R-Untereinheit weitergeleitet werden. Jede CNB besteht aus helikalen Subdomänen (α -Subdomäne) und acht β -Faltblättern in der Konformation eines β -Fasses (β -Subdomäne). Konservierte Aminosäuren (AS) in der Phosphatbindungskassette (PBC) binden das cAMP und schützen es vor dem Abbau (Canaves *et al.* 2002).

Generell interagiert die R-Untereinheit im Holoenzymkomplex mit der katalytisch aktiven C-Untereinheit über die Inhibitorsequenz (AS 94-98), die α C-Helix (AS 236-244, siehe Abbildung 5.11) und Teile der CNB-A (Huang *et al.* 1998; Anand *et al.* 2002; Hamuro *et al.* 2002; Anand *et al.* 2003; Hamuro *et al.* 2003; Hamuro *et al.* 2004). (Die Nummerierungen der AS und Sequenzen beziehen sich immer auf die bovine RI α .)

Durch chemisch induzierte Mutagenese von S49 Lymphoma Zellen unter cAMP-Stress und Vergleich mit der Kristallstruktur der homologen CNB aus CAP (*catabolite activator protein* in *E. coli*) konnten in der R-Untereinheit mehrere AS identifiziert werden, die bei der cAMP-Bindung und/oder in der PKA-Aktivierung zentrale Funktionen übernehmen (Steinberg *et al.* 1977; Clegg *et al.* 1987; Steinberg *et al.* 1987b; Weber *et al.* 1987a; Bubis *et al.* 1988a; OGREID *et al.* 1988; Steinberg *et al.* 1991; Steinberg *et al.* 1992; Gorman *et al.* 1994).

Mutationen in den im folgenden beschriebenen AS in der CNB-A (AS 141-260) führen alle zu einer signifikanten Erhöhung der PKA Aktivierungskonstante für cAMP (Neitzel *et al.* 1991; Steinberg *et al.* 1991; Symcox *et al.* 1994; Herberg *et al.* 1996). Das invariante Arg209 interagiert mit dem äquatorialen exozyklischen Sauerstoff der cAMP-Phosphatgruppe ((Su *et al.* 1993),

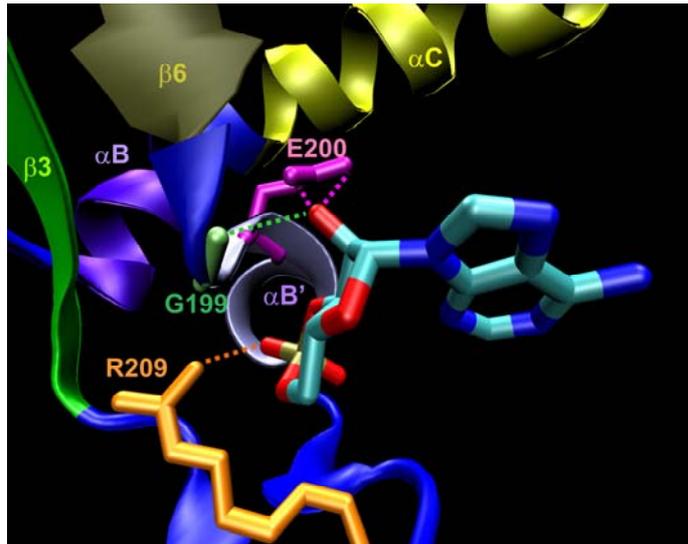


Abbildung 5.10 **Interaktionen von cAMP mit der CNB-A der RI α** (PDB 1NE4). Die β -Faltblattstrukturen ($\beta 3$ und $\beta 6$) sowie die α -Helix Strukturen (αB , $\alpha B'$, αC) sind farblich gekennzeichnet. Visualisierung erfolgte mit VMD 1.8.5 (Humphrey *et al.* 1996)

1987b; Weber *et al.* 1987a; Bubis *et al.* 1988a; Zawadzki *et al.* 2004). Die invarianten AS Gly199 und Glu200 interagieren mit dem 2'OH von cAMP (Abbildung 5.10), wobei Glu200 zusätzlich eine Wasserstoffbrücke (WSB) zu Trp260 ausbildet und über elektrostatische Wechselwirkung mit Arg241 interagiert (Su *et al.* 1993). Auch Punktmutationen am Glu200 haben zur Folge, dass die cAMP-Bindung nicht mehr stattfinden kann (Steinberg *et al.* 1991). Punktmutationen am Arg241 verringern die Affinität zu cAMP um den Faktor 25 (Symcox *et al.* 1994).

Ausgehend von diesen identifizierten AS in Kombination mit Kristallstrukturen der R-Untereinheit (Su *et al.* 1995; Diller *et al.* 2001; Wu *et al.* 2004b; Wu *et al.* 2004a) und der C-Untereinheit ((Bossemeyer *et al.* 1993; Engh *et al.* 1996) für eine Übersicht der C-Untereinheit Kristallstrukturen siehe (Götte 2004)) wurden zwei prinzipiell verschiedene Aktivierungsmechanismen ausgehend von der CNB-A postuliert.

(1) Der Salzbrückenmechanismus basiert auf dem Umklappen einer Salzbrücke zwischen Glu200 (auf der $\alpha B'$ -Helix) und dem Arg241 (auf der αC -Helix) in der Nukleotid-freien Form bzw. dem 2'OH des cAMP in der cAMP-gebundenen Form ((Symcox *et al.* 1994; Su *et al.* 1995; Huang *et al.* 1998; Sorol *et al.* 2000; Diller *et al.* 2001), Abbildung 5.11). Des Weiteren soll eine Interaktion zwischen dem Arg239 auf der αC -Helix mit der C-Untereinheit stattfinden.

(2) Der hydrophobe Mechanismus basiert auf dem postulierten cAMP-Aktivierungsmechanismus des Guaninnukleotid-Austauschfaktors Epac2 (Rehmann *et al.* 2003a). Dabei wurden durch Sequenzvergleiche zwischen den evolutionär konservierten Zyklonukleotid-Bindungsdomänen von Pro- und Eukaryoten hochkonservierte hydrophobe AS identifiziert (analog zur CNB-A der RI α -Untereinheit: Leu203 in der hochkonservierten PBC (Canaves *et al.* 2002) und Tyr229 in der α B-Helix, Abbildung 5.11), die über hydrophobe und van-der-Waals-Interaktionen die Dissoziation der katalytischen Domäne initiieren

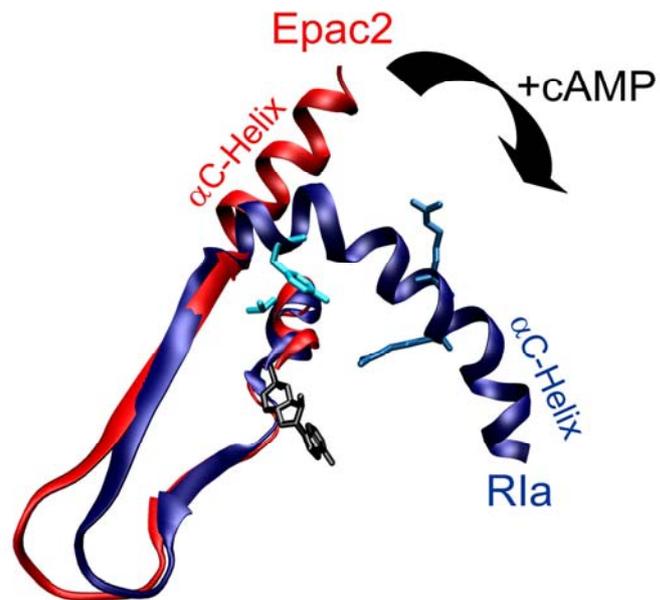


Abbildung 5.11 **Konformationsänderung durch cAMP-Bindung** Strukturvergleich von der CNB von Epac2 ohne zykliches Nukleotid (rot, PDB 1O7F) und RI α mit zyklichem Nukleotid (blau, PDB 1NE4), cAMP in der CNB (schwarz). Die hellblau dargestellten AS Leu203 und Tyr229 sind nach dem postulierten hydrophoben Mechanismus in die Aktivierung involviert; die dunkelblau dargestellten AS Arg239 und Arg241 sind nach dem Salzbrückenmechanismus in die Aktivierung involviert (**PUBLIKATION I**). Visualisierung erfolgte mit VMD 1.8.5 (Humphrey *et al.* 1996)

können (Anand *et al.* 2002; Rehmann *et al.* 2003a). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die potentiell für den Salzbrücken- und hydrophoben Mechanismus verantwortlichen AS an dem Konstrukt RI α 92-259 zielgerichtet mutiert und der Einfluss der Mutationen auf die cAMP-Bindung sowie die Interaktion mit der C-Untereinheit untersucht (**PUBLIKATION I**). An dem verwendeten kurzen R-Untereinheit Konstrukt kann die Interaktion der R-Untereinheit mit der C-Untereinheit quantitativ analysiert werden ohne das kooperative Effekte zwischen der CNB-A und der CNB-B die Ergebnisse beeinflussen (Saraswat *et al.* 1988; Ringheim *et al.* 1990). Durch diese Untersuchungen konnte ein hydrophober Mechanismus, ähnlich zur Aktivierung von Epac2 für die RI α Isoform bestätigt werden (**PUBLIKATION I**). Dieser Mechanismus führt über die AS in der hydrophoben Tasche der PBC (Leu201 über Ala202 zu Leu203) zu einer van-der-Waals-Wechselwirkung mit Tyr229, das zu einer Umorientierung der gesamten α C Helix in der R Untereinheit führt, die dann die C Untereinheit dissoziiert (Abbildung 5.11, **PUBLIKATION I**)

Anhand der ersten Kristallstruktur des Holoenzymkomplexes, bestehend aus einer C-Untereinheit und einem noch kürzeren R-Untereinheiten Konstrukt (RI α 91-244), konnte gezeigt werden, dass die C-Untereinheit bei der Bindung an die R-Untereinheit kaum strukturelle Veränderungen eingeht, während die R-Untereinheit erhebliche konformationelle Änderungen ausführt (Kim *et al.* 2005).

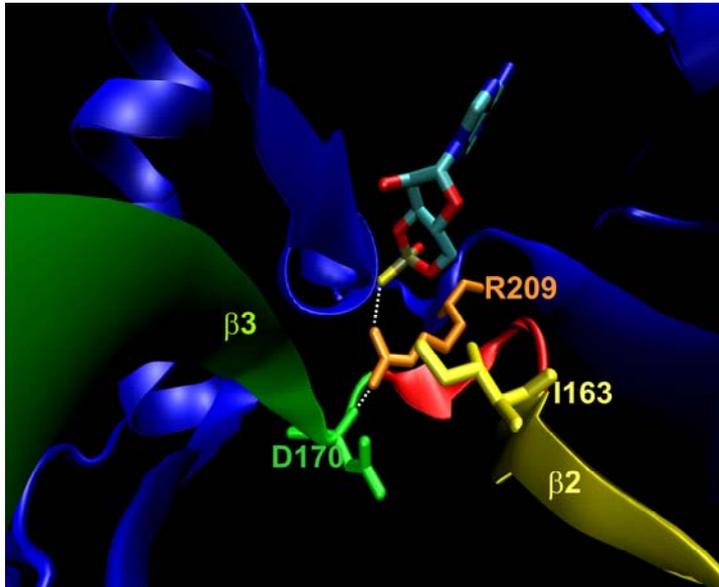
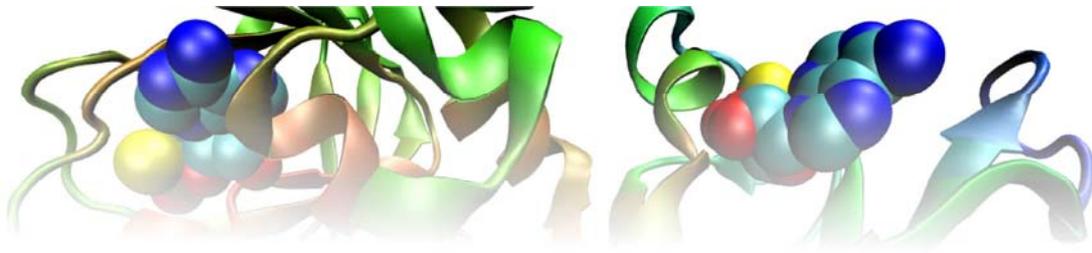


Abbildung 5.12 **Einblick in die CNB-A Struktur** mit gebundenem Rp-cAMPS (äquatorialer Sauerstoff des zyklischen Phosphates ausgetauscht zu einem Schwefel, gelb, PDB 1NE4) zur Verdeutlichung der Interaktionen nach (Vigil *et al.* 2006; Das *et al.* 2007b). Arg209 (R209) interagiert sowohl mit dem gebundenem cAMP als auch mit Asp170 (D170) auf dem β 3-Faltblatt und mit Ile163 (I163) auf dem β 2-Faltblatt. Visualisierung erfolgte mit VMD 1.8.5 (Humphrey *et al.* 1996)

Durch eine molekulardynamische Simulation der R-Untereinheit, Untersuchungen an punktmutierter RI α 91-244 und NMR-Studien am Holoenzymkomplex wurde dann ein erweiterter Mechanismus postuliert, indem die AS Arg209, Asp170 (β 3-Faltblatt) und Ile163 (β 2-Faltblatt) bei gebundenem cAMP netzwerkartige Interaktionen zwischen den β -Faltblättern aufweisen ((Su *et al.* 1995; Vigil *et al.* 2006; Das *et al.* 2007b), Abbildung 5.12). Dabei wurde ein 3-Schalenmodell aufgestellt: Die AS, die direkt von der cAMP-Bindung beeinflusst werden (primäre Schale, Arg209, Ile163, Asp170, Asn171,

Glu200, Arg241), wirken auf die AS der sekundären Schale (Val162, α B-Helix, speziell Arg226), die zusammen mit den AS der ersten Schale die AS der tertiären Schale vernetzen und dadurch die Aktivierung initiieren (Diller *et al.* 2001; Zawadzki *et al.* 2003; Das *et al.* 2007b). Das ist insbesondere für die Unterscheidung von Agonisten und Antagonisten interessant, da gezeigt werden konnte, dass Arg209 eine signifikant engere Bindung mit dem Antagonisten am äquatorialen exozyklischen ausgetauschten Schwefel der Phosphatgruppe (Rp-cAMPS) eingeht, obwohl die Bindung schwächer ist (Wu *et al.* 2004a). Die Bindung des Agonisten Sp-cAMPS induziert über Asp170 eine Konformationsänderung in dem dynamischen β 3-Faltblatt. Beim Antagonisten Rp-cAMPS dagegen wird dies durch die engere Bindung vom äquatorialen Schwefel zum Arg209 verhindert (Das *et al.* 2007a), die Konformation bleibt unverändert.

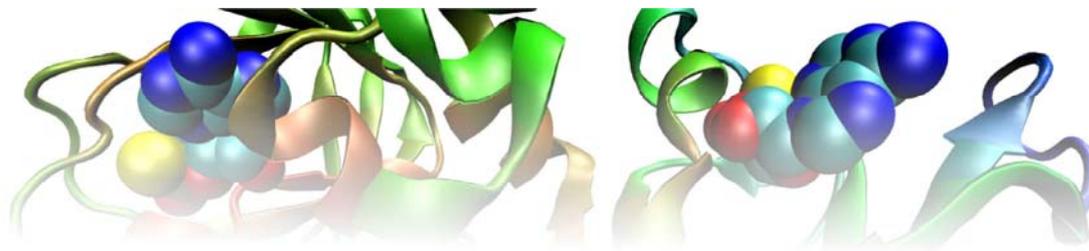
Allerdings ist zu bedenken, dass zur Untersuchung des Aktivierungsmechanismus bisher nur verkürzte CNB-A Konstrukte der R-Untereinheit verwendet wurden ((Vigil *et al.* 2006; Das *et al.* 2007b), **PUBLIKATION I**). Es gibt Hinweise darauf, dass AS außerhalb dieser voll funktionsfähigen Domäne wichtige Interaktionen für die Aktivierung eingehen, z.B. das Asp265, das mit der Salzbrücke Arg241/Glu200 interagiert, oder die AS Trp260, die wie eine Art Deckel die Bindung von cAMP in der CNB-A stabilisiert (Vigil *et al.* 2006). So wird die Aufklärung des Aktivierungsmechanismus bis zur Lösung der Kristallstrukturen des vollständigen Holoenzymkomplexes mit der dimeren R-Untereinheit und einer Struktur ohne gebundene Zyklonuklotide in den CNB der R-Untereinheit weiter diskutiert werden. Interessanterweise konnte in einer Kristallstrukturanalyse der RII β gezeigt werden, dass das zum Arg241 korrespondierende Arg262 nicht in der Lage ist, eine Salzbrücke zum korrespondierenden Glu200 aufzubauen (Diller *et al.* 2001). Dies führt zu der Annahme, dass der Aktivierungsmechanismus für jede der vier verschiedenen Isoformen der R-Untereinheit auch gewisse Unterschiede aufweist, die mit ihren verschiedenen biologischen Funktionen korrelieren.



6. ZUSAMMENFASSUNG

Der sekundäre Botenstoff zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) reguliert viele fundamentale zelluläre Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung, Energiemetabolismus und Genexpression. In eukaryotischen Zellen vermittelt die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) die meisten biologischen Funktionen von cAMP. Die PKA besteht aus jeweils zwei regulatorischen (R) und katalytischen (C) Untereinheiten, die zusammen einen inaktiven Holoenzymkomplex bilden, der durch cAMP aktiviert wird.

In dieser Arbeit wurde die Bindung von cAMP und cAMP-Analoga an die R-Untereinheit der PKA unter funktionellen und mechanistischen Aspekten untersucht. Eine neue, auf Fluoreszenzpolarisation basierende Methode wurde entwickelt, um die Affinität von cAMP-Analoga in einem homogenen Ansatz schnell, reproduzierbar und nicht radioaktiv zu quantifizieren. Zur detaillierten Untersuchung des Bindungsmechanismus von cAMP und cAMP-Analoga (Agonisten und Antagonisten) wurden thermodynamische Studien im direkten Vergleich mittels isothermaler Titrationskalorimetrie und kinetischen Analysen (Oberflächenplasmonresonanz, SPR) durchgeführt, wodurch thermodynamische Signaturen für das Bindungsverhalten der Nukleotide an die R-Untereinheit der PKA erhalten werden konnten. Durch Interaktionsstudien an mutagenisierten R-Untereinheiten wurde der intramolekulare Aktivierungsmechanismus der PKA in Bezug auf cAMP-Bindung, Holoenzymkomplex-Formierung und -Aktivierung untersucht. Die dabei erhaltenen Ergebnisse wurden mit zwei Modellen der cAMP-induzierten Konformationsänderung verglichen, und ein Aktivierungsmechanismus postuliert, der auf konservierten hydrophoben Aminosäuren basiert. Für *in vivo* Untersuchungen wurden zusammen mit Kooperationspartnern membranpermeable, fluoreszierende cAMP-Analoga entwickelt, die Einblicke in die Dynamik der cAMP-Verteilung in Zellen erlauben. Neu entwickelte, Festphasen gebundene cAMP-Analoga (Agonisten und Antagonisten) wurden in einem (sub)proteomischen Ansatz dazu genutzt, natürliche Komplexe der R-Untereinheit und des PKA-Holoenzym aus Zellysaten zu isolieren und zu identifizieren. Diese Untersuchungen fließen letztlich in einem systembiologischen Ansatz zusammen, der neue Einblicke in die vielschichtigen cAMP gesteuerten Netzwerke und Regulationsprozesse erlaubt.

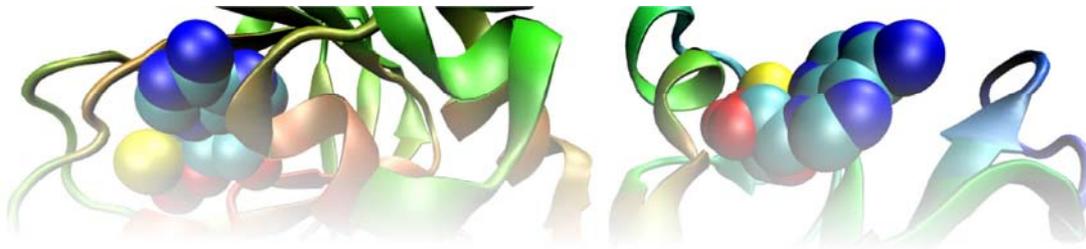


7. SUMMARY

The second messenger cyclic adenosine monophosphate (cAMP) regulates many fundamental cellular processes like cell proliferation, differentiation, energy metabolism and gene expression. In the eucaryotic cell the cAMP-dependent protein kinase (PKA) mediates most biological functions of cAMP. The PKA consists of each two regulatory (R) and catalytic (C) subunits that form together an inactive holoenzyme complex, which is activated by cAMP.

In this work the binding of cAMP and cAMP analogs to the R-subunit of PKA were investigated under functional and mechanistic aspects. A novel method, based on fluorescence polarisation, was developed to quantify the affinity of cAMP analogs in a homogeneous assay format in a rapid, reproducible and non-radioactive way. For a detailed analysis of the binding mechanism of cAMP and analogs thereof (agonists and antagonists), comparative thermodynamic studies were carried out by means of isothermal titration calorimetry (ITC) and kinetic studies (surface plasmon resonance, SPR), which allowed to obtain thermodynamic signatures for the binding of the nucleotides to the PKA R-subunit. By studies on mutagenised R-subunits, the intramolecular activation mechanism of PKA was investigated with respect to cAMP binding, as well as formation and activation of the holoenzyme. Thereby obtained data were compared to two models for cAMP-induced conformational changes, and an activation mechanism postulated that is based on conserved hydrophobic amino acids. For *in vivo* investigations, membrane permeable fluorescent cAMP analogs were developed together with co-operation partners that allow to gain insight into the dynamics of the cellular cAMP distribution. Newly developed cAMP analogs (agonists and antagonists) were immobilised on a solid phase and used in a (sup)proteomic approach to isolate and identify native complexes of both the R-subunit and the PKA holoenzyme from cell lysates.

These investigations ultimately merge in a Systems Biology approach allowing novel insight into the complex networks and regulatory processes controlled by cAMP.



8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ababou, A. and Ladbury, J.E. (2006). Survey of the year 2005: literature on applications of isothermal titration calorimetry. Journal of Molecular Recognition **20**(1): 4-14.
2. Abel, T., Nguyen, P.V., Barad, M., Deuel, T.A., Kandel, E.R. and Bourtschouladze, R. (1997). Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. Cell **88**(5): 615-26.
3. Adams, M.R., Brandon, E.P., Chartoff, E.H., Idzerda, R.L., Dorsa, D.M. and McKnight, G.S. (1997). Loss of haloperidol induced gene expression and catalepsy in protein kinase A-deficient mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(22): 12157-61.
4. Adams, S.R., Harootunian, A.T., Buechler, Y.J., Taylor, S.S. and Tsien, R.Y. (1991). Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. Nature **349**(6311): 694-7.
5. Adayev, T., Chen-Hwang, M.C., Murakami, N., Wang, R. and Hwang, Y.W. (2006). MNB/DYRK1A phosphorylation regulates the interactions of synaptojanin 1 with endocytic accessory proteins. Biochemical and Biophysical Research Communications **351**(4): 1060-5.
6. Aebersold, R. and Goodlett, D.R. (2001). Mass spectrometry in proteomics. Chemical Reviews **101**(2): 269-95.
7. Ajuh, P., Kuster, B., Panov, K., Zomerdijk, J.C., Mann, M. and Lamond, A.I. (2000). Functional analysis of the human CDC5L complex and identification of its components by mass spectrometry. Embo J **19**(23): 6569-81.
8. Alberts, B. (1998). The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. Cell **92**(3): 291-4.
9. Alfaro, C., Andrade, C.E., Anthony, K., Bahroos, N., Bajec, M., Bantoft, K., Betel, D., Bobechko, B., Boutilier, K., Burgess, E., Buzadzija, K., Cavero, R., D'Abreo, C., Donaldson, I., Dorairajoo, D., Dumontier, M.J., Dumontier, M.R., Earles, V., Farrall, R., Feldman, H., Garderman, E., Gong, Y., Gonzaga, R., Grytsan, V., Gryz, E., Gu, V., Haldorsen, E., Halupa, A., Haw, R., Hrvojic, A., Hurrell, L., Isserlin, R., Jack, F., Juma, F., Khan, A., Kon, T., Konopinsky, S., Le, V., Lee, E., Ling, S., Magidin, M., Moniakis, J., Montojo, J., Moore, S., Muskat, B., Ng, I., Paraiso, J.P., Parker, B., Pintilie, G., Pirone, R., Salama, J.J., Sgro, S., Shan, T., Shu, Y., Siew, J., Skinner, D., Snyder, K., Stasiuk, R., Strumpf, D., Tuekam, B., Tao, S., Wang, Z., White, M., Willis, R., Wolting, C., Wong, S., Wrong, A., Xin, C., Yao, R., Yates, B., Zhang, S., Zheng, K., Pawson, T., Ouellette, B.F. and Hogue, C.W. (2005). The Biomolecular Interaction Network Database and related tools 2005 update. Nucleic Acids Res **33**(Database issue): D418-24.
10. Altenhofen, W., Ludwig, J., Eismann, E., Kraus, W., Bonigk, W. and Kaupp, U.B. (1991). Control of ligand specificity in cyclic nucleotide-gated channels from rod photoreceptors and olfactory epithelium. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **88**(21): 9868-72.
11. Amieux, P.S., Cummings, D.E., Motamed, K., Brandon, E.P., Wailes, L.A., Le, K., Idzerda, R.L. and McKnight, G.S. (1997). Compensatory regulation of RIalpha protein levels in protein kinase A mutant mice. Journal of Biological Chemistry **272**(7): 3993-8.
12. Anand, G.S., Hughes, C.A., Jones, J.M., Taylor, S.S. and Komives, E.A. (2002). Amide H/2H exchange reveals communication between the cAMP and catalytic subunit-binding sites in the R(I)alpha subunit of protein kinase A. Journal of Molecular Biology **323**(2): 377-86.
13. Anand, G.S., Law, D., Mandell, J.G., Snead, A.N., Tsigelny, I., Taylor, S.S., Eyck, L.F. and Komives, E.A. (2003). Identification of the protein kinase A regulatory RI{alpha}-catalytic subunit interface by amide H/2H exchange and protein docking. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(23): 13264-13269.
14. Anderson, N.G. and Anderson, N.L. (1996). Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. Electrophoresis **17**(3): 443-53.
15. Angelo, R. and Rubin, C.S. (1998). Molecular characterization of an anchor protein (AKAPCE) that binds the RI subunit (RCE) of type I protein kinase A from *Caenorhabditis elegans*. Journal of Biological Chemistry **273**(23): 14633-43.
16. Angrand, P.O., Segura, I., Volkel, P., Ghidelli, S., Terry, R., Brajenovic, M., Vintersten, K., Klein, R., Superti-Furga, G., Drewes, G., Kuster, B., Bouwmeester, T. and Acker-Palmer, A. (2006). Transgenic mouse proteomics identifies new 14-3-3-associated proteins involved in cytoskeletal rearrangements and cell signaling. Mol Cell Proteomics **5**(12): 2211-27.
17. Antoni, F.A. (2000). Molecular diversity of cyclic AMP signalling. Frontiers in Neuroendocrinology **21**(2): 103-32.
18. Arena, S., Benvenuti, S. and Bardelli, A. (2005). Genetic analysis of the kinome and phosphatome in cancer. Cellular and Molecular Life Sciences **62**(18): 2092-9.
19. Bacskai, B.J., Hochner, B., Mahaut-Smith, M., Adams, S.R., Kaang, B.K., Kandel, E.R. and Tsien, R.Y. (1993). Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons. Science **260**(5105): 222-6.
20. Bader, G.D. and Hogue, C.W. (2000). BIND--a data specification for storing and describing biomolecular

interactions, molecular complexes and pathways. *Bioinformatics* **16**(5): 465-77.

21. Bader, G.D., Donaldson, I., Wolting, C., Ouellette, B.F., Pawson, T. and Hogue, C.W. (2001). BIND-The Biomolecular Interaction Network Database. *Nucleic Acids Res* **29**(1): 242-5.

22. Bailly, E., Doree, M., Nurse, P. and Bornens, M. (1989). p34cdc2 is located in both nucleus and cytoplasm; part is centrosomally associated at G2/M and enters vesicles at anaphase. *EMBO Journal* **8**(13): 3985-95.

23. Baraniak, J., Kinas, R.W., Lesiak, K. and Stec, W.J. (1979). Stereospecific synthesis of adenosine 3,5-(Sp)- and -(Rp)-cyclic phosphorothioates (cAMPS). *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*(21): 940-941.

24. Barsony, J. and Marx, S.J. (1990). Immunocytology on microwave-fixed cells reveals rapid and agonist-specific changes in subcellular accumulation patterns for cAMP or cGMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(3): 1188-92.

25. Bauer, A. and Kuster, B. (2003). Affinity purification-mass spectrometry. Powerful tools for the characterization of protein complexes. *European Journal of Biochemistry* **270**(4): 570-8.

26. Beavo, J.A., Bechtel, P.J. and Krebs, E.G. (1974). Preparation of homogeneous cyclic AMP-dependent protein kinase(s) and its subunits from rabbit skeletal muscle. *Methods in Enzymology* **38**: 299-308.

27. Beavo, J.A. and Brunton, L.L. (2002). Cyclic nucleotide research - still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(9): 710-8.

28. Becamel, C., Alonso, G., Galeotti, N., Demey, E., Jouin, P., Ullmer, C., Dumuis, A., Bockaert, J. and Marin, P. (2002). Synaptic multiprotein complexes associated with 5-HT_{2C} receptors: a proteomic approach. *EMBO Journal* **21**(10): 2332-42.

29. Beebe, S.J., Oyen, O., Sandberg, M., Froysa, A., Hansson, V. and Jahnsen, T. (1990). Molecular cloning of a tissue-specific protein kinase (C gamma) from human testis--representing a third isoform for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Molecular Endocrinology* **4**(3): 465-75.

30. Beebe, S.J., Salomonsky, P., Jahnsen, T. and Li, Y. (1992). The C gamma subunit is a unique isozyme of the cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **267**(35): 25505-12.

31. Berman, H.M., Ten Eyck, L.F., Goodsell, D.S., Haste, N.M., Kornev, A. and Taylor, S.S. (2005). The cAMP binding domain: an ancient signaling module. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(1): 45-50.

32. Berson, S.A. and Yalow, R.S. (1959a). Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. *Journal of Clinical Investigation* **38**: 1996-2016.

33. Berson, S.A. and Yalow, R.S. (1959b). Recent studies on insulin-binding antibodies. *Annals of the New York Academy of Sciences* **82**: 338-44.

34. Birnbaumer, L. (2007). Expansion of signal transduction by G proteins. The second 15 years or so:

from 3 to 16 alpha subunits plus betagamma dimers. *Biochimica et Biophysica Acta* **1768**(4): 772-93.

35. Blandamer, M.J. (1998). Thermodynamic background to isothermal Titration Calorimetry. *Biocalorimetry: Applications of Calorimetry in the Biological Science*. J. E. Ladbury and B. Z. Chowdhry, John Wiley & Sons Ltd: 5-25.

36. Blume-Jensen, P. and Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**(6835): 355-65.

37. Bonanomi, D., Menegon, A., Miccio, A., Ferrari, G., Corradi, A., Kao, H.T., Benfenati, F. and Valtorta, F. (2005). Phosphorylation of synapsin I by cAMP-dependent protein kinase controls synaptic vesicle dynamics in developing neurons. *Journal of Neuroscience* **25**(32): 7299-308.

38. Borea, P.A., Dalpiaz, A., Varani, K., Gilli, P. and Gilli, G. (2000). Can thermodynamic measurements of receptor binding yield information on drug affinity and efficacy? *Biochemical Pharmacology* **60**(11): 1549-56.

39. Bos, J.L., de Rooij, J. and Reedquist, K.A. (2001). Rap1 signalling: adhering to new models. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(5): 369-77.

40. Bos, J.L. (2006). Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends in Biochemical Sciences* **31**(12): 680-6.

41. Bossemeyer, D., Engh, R.A., Kinzel, V., Ponstingl, H. and Huber, R. (1993). Phosphotransferase and substrate binding mechanism of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from porcine heart as deduced from the 2.0 Å structure of the complex with Mn²⁺ adenylyl imidodiphosphate and inhibitor peptide PKI(5-24). *EMBO Journal* **12**(3): 849-59.

42. Botelho, L.H.P., Rothermel, J.D., Coombs, R.V. and Jastorff, B. (1988). cAMP analog antagonists of cAMP action. *Methods in Enzymology* **159**: 159-72.

43. Brandon, E.P., Zhuo, M., Huang, Y.Y., Qi, M., Gerhold, K.A., Burton, K.A., Kandel, E.R., McKnight, G.S. and Idzerda, R.L. (1995). Hippocampal long-term depression and depotentiation are defective in mice carrying a targeted disruption of the gene encoding the RI beta subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(19): 8851-5.

44. Brandon, E.P., Idzerda, R.L. and McKnight, G.S. (1997). PKA isoforms, neural pathways, and behaviour: making the connection. *Current Opinion in Neurobiology* **7**(3): 397-403.

45. Brandon, E.P., Logue, S.F., Adams, M.R., Qi, M., Sullivan, S.P., Matsumoto, A.M., Dorsa, D.M., Wehner, J.M., McKnight, G.S. and Idzerda, R.L. (1998). Defective motor behavior and neural gene expression in RI beta-protein kinase A mutant mice. *Journal of Neuroscience* **18**(10): 3639-49.

46. Bregman, D.B., Bhattacharyya, N. and Rubin, C.S. (1989). High affinity binding protein for the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase II-B. Cloning, characterization, and expression of cDNAs for rat brain P150. *Journal of Biological Chemistry* **264**(8): 4648-56.

47. Brooker, G., Harper, J.F., Terasaki, W.L. and Moylan, R.D. (1979). Radioimmunoassay of cyclic AMP and cyclic GMP. *Advances in Cyclic Nucleotide Research* **10**: 1-33.

48. Bubis, J., Vedvick, T.S. and Taylor, S.S. (1987). Antiparallel alignment of the two protomers of the regulatory subunit dimer of cAMP-dependent protein kinase I. Journal of Biological Chemistry **262**(31): 14961-6.
49. Bubis, J., Neitzel, J.J., Saraswat, L.D. and Taylor, S.S. (1988a). A point mutation abolishes binding of cAMP to site A in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. Journal of Biological Chemistry **263**(20): 9668-73.
50. Bubis, J., Saraswat, L.D. and Taylor, S.S. (1988b). Tyrosine-371 contributes to the positive cooperativity between the two cAMP binding sites in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase I. Biochemistry **27**(5): 1570-6.
51. Buck, J., Sinclair, M.L., Schapal, L., Cann, M.J. and Levin, L.R. (1999). Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(1): 79-84.
52. Buechler, Y.J. and Taylor, S.S. (1991). Mutations in the autoinhibitor site of the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase I. Replacement of Ala-97 and Ser-99 interferes with reassociation with the catalytic subunit. Journal of Biological Chemistry **266**(6): 3491-7.
53. Builder, S.E., Beavo, J.A. and Krebs, E.G. (1980). The mechanism of activation of bovine skeletal muscle protein kinase by adenosine 3':5'-monophosphate. Journal of Biological Chemistry **255**(8): 3514-9.
54. Burckstummer, T., Bennett, K.L., Preradovic, A., Schütze, G., Hantschel, O., Superti-Furga, G. and Bauch, A. (2006). An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. Nat Methods **3**(12): 1013-9.
55. Burghardt, N.C.G. (2005). Diplomarbeit: Biochemische und strukturelle Untersuchungen zur Zyklonukleotidbindung bei der cAMP-abhängigen Proteinkinase. Kassel University, Biochemistry
56. Burke, T.J., Loniello, K.R., Beebe, J.A. and Ervin, K.M. (2003). Development and application of fluorescence polarization assays in drug discovery. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening **6**(3): 183-194.
57. Burns-Hamuro, L.L., Ma, Y., Kammerer, S., Reineke, U., Self, C., Cook, C., Olson, G.L., Cantor, C.R., Braun, A. and Taylor, S.S. (2003). Designing isoform-specific peptide disruptors of protein kinase A localization. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(7): 4072-7.
58. Burton, K.A., Johnson, B.D., Hausken, Z.E., Westenbroek, R.E., Idzerda, R.L., Scheuer, T., Scott, J.D., Catterall, W.A. and McKnight, G.S. (1997). Type II regulatory subunits are not required for the anchoring-dependent modulation of Ca²⁺ channel activity by cAMP-dependent protein kinase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(20): 11067-72.
59. Burton, K.A., Treash-Osio, B., Muller, C.H., Dunphy, E.L. and McKnight, G.S. (1999). Deletion of type II α regulatory subunit delocalizes protein kinase A in mouse sperm without affecting motility or fertilization. Journal of Biological Chemistry **274**(34): 24131-6.
60. Butt, E., van Bemmelen, M., Fischer, L., Walter, U. and Jastorff, B. (1990). Inhibition of cGMP-dependent protein kinase by (Rp)-guanosine 3',5'-monophosphorothioates. FEBS Letters **263**(1): 47-50.
61. Butt, E., Beltman, J., Becker, D.E., Jensen, G.S., Rybalkin, S.D., Jastorff, B. and Beavo, J.A. (1995). Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases with cyclic AMP analogs: topology of the catalytic sites and comparison with other cyclic AMP-binding proteins. Molecular Pharmacology **47**(2): 340-7.
62. Cadd, G.G. and McKnight, G.S. (1989). Distinct Patterns of cAMP-Dependent Protein Kinase Gene Expression in Mouse Brain. Neuron **3**(1): 71-79.
63. Cagney, G., Uetz, P. and Fields, S. (2000). High-throughput screening for protein-protein interactions using two-hybrid assay. Methods in Enzymology **328**: 3-14.
64. Camacho-Carvajal, M.M., Wollscheid, B., Aebersold, R., Steimle, V. and Schamel, W.W. (2004). Two-dimensional Blue native/SDS gel electrophoresis of multi-protein complexes from whole cellular lysates: a proteomics approach. Mol Cell Proteomics **3**(2): 176-82.
65. Canaves, J.M. and Taylor, S.S. (2002). Classification and phylogenetic analysis of the cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit family. Journal of Molecular Evolution **54**(1): 17-29.
66. Caretta, A. and Saibil, H. (1989). Visualization of cyclic nucleotide binding sites in the vertebrate retina by fluorescence microscopy. Journal of Cell Biology **108**(4): 1517-22.
67. Carlson, C.R., Witzczak, O., Vossebein, L., Labbe, J.C., Skalhegg, B.S., Keryer, G., Herberg, F.W., Collas, P. and Tasken, K. (2001). CDK1-mediated phosphorylation of the RII α regulatory subunit of PKA works as a molecular switch that promotes dissociation of RII α from centrosomes at mitosis. Journal of Cell Science **114**(Pt 18): 3243-54.
68. Carlson, H.A. (2002). Protein flexibility and drug design: how to hit a moving target. Current Opinion in Chemical Biology **6**(4): 447-52.
69. Carnegie, G.K. and Scott, J.D. (2003). A-kinase anchoring proteins and neuronal signaling mechanisms. Genes & Development **17**(13): 1557-68.
70. Carr, D.W., Stofko-Hahn, R.E., Fraser, I.D., Bishop, S.M., Acott, T.S., Brennan, R.G. and Scott, J.D. (1991). Interaction of the regulatory subunit (RII) of cAMP-dependent protein kinase with RII-anchoring proteins occurs through an amphipathic helix binding motif. Journal of Biological Chemistry **266**(22): 14188-92.
71. Carr, D.W., Hausken, Z.E., Fraser, I.D., Stofko-Hahn, R.E. and Scott, J.D. (1992). Association of the type II cAMP-dependent protein kinase with a human thyroid RII-anchoring protein. Cloning and characterization of the RII-binding domain. Journal of Biological Chemistry **267**(19): 13376-82.
72. Catimel, B., Rothacker, J. and Nice, E. (2002). Biosensors and proteomics. Today's Life Science **14**(1).
73. Catimel, B., Rothacker, J., Catimel, J., Faux, M., Ross, J., Connolly, L., Clippingdale, A., Burgess, A.W. and Nice, E. (2005). Biosensor-based micro-affinity purification for

- the proteomic analysis of protein complexes. J Proteome Res **4**(5): 1646-56.
- 74.** Cha, B., Kim, J.H., Hut, H., Hogema, B.M., Nadarja, J., Zizak, M., Cavet, M., Lee-Kwon, W., Lohmann, S.M., Smolenski, A., Tse, C.M., Yun, C., de Jonge, H.R. and Donowitz, M. (2005). cGMP inhibition of Na⁺/H⁺ antiporter 3 (NHE3) requires PDZ domain adapter NHERF2, a broad specificity protein kinase G-anchoring protein. Journal of Biological Chemistry **280**(17): 16642-50.
- 75.** Checovich, W.J., Bolger, R.E. and Burke, T. (1995). Fluorescence polarization--a new tool for cell and molecular biology. Nature **375**(6528): 254-6.
- 76.** Chen, C., Nakamura, T. and Koutalos, Y. (1999). Cyclic AMP diffusion coefficient in frog olfactory cilia. Biophysical Journal **76**(5): 2861-7.
- 77.** Chen, Y., Cann, M.J., Litvin, T.N., Iourgenko, V., Sinclair, M.L., Levin, L.R. and Buck, J. (2000). Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. Science **289**(5479): 625-8.
- 78.** Chin, K.V., Yang, W.L., Ravatn, R., Kita, T., Reitman, E., Vettori, D., Cvijic, M.E., Shin, M. and Iacono, L. (2002). Reinventing the wheel of cyclic AMP: novel mechanisms of cAMP signaling. Annals of the New York Academy of Sciences **968**: 49-64.
- 79.** Chiorini, J.A., Zimmermann, B., Yang, L., Smith, R.H., Ahearn, A., Herberg, F. and Kotin, R.M. (1998). Inhibition of PrKX, a novel protein kinase, and the cyclic AMP-dependent protein kinase PKA by the regulatory proteins of adeno-associated virus type 2. Molecular and Cellular Biology **18**(10): 5921-9.
- 80.** Cho-Chung, Y.S., Pepe, S., Clair, T., Budillon, A. and Nesterova, M. (1995). cAMP-dependent protein kinase: role in normal and malignant growth. Critical Reviews in Oncology/Hematology **21**(1-3): 33-61.
- 81.** Cho-Chung, Y.S. (2004). Antisense protein kinase A RI alpha-induced tumor reversion: portrait of a microarray. Biochimica et Biophysica Acta **1697**(1-2): 71-9.
- 82.** Cho-Chung, Y.S. and Nesterova, M.V. (2005). Tumor reversion: protein kinase a isozyme switching. Annals of the New York Academy of Sciences **1058**: 76-86.
- 83.** Christensen, A.E., Selheim, F., de Rooij, J., Dremier, S., Schwede, F., Dao, K.K., Martinez, A., Maenhaut, C., Bos, J.L., Genieser, H.G. and Doskeland, S.O. (2003). cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. Journal of Biological Chemistry **278**(37): 35394-402.
- 84.** Clapham, D.E. and Neer, E.J. (1993). New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. Nature **365**(6445): 403-6.
- 85.** Clegg, C.H., Correll, L.A., Cadd, G.G. and McKnight, G.S. (1987). Inhibition of intracellular cAMP-dependent protein kinase using mutant genes of the regulatory type I subunit. Journal of Biological Chemistry **262**(27): 13111-9.
- 86.** Clegg, C.H., Cadd, G.G. and McKnight, G.S. (1988). Genetic characterization of a brain-specific form of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **85**(11): 3703-7.
- 87.** Clegg, C.H., Ran, W., Uhler, M.D. and McKnight, G.S. (1989). A mutation in the catalytic subunit of protein kinase A prevents myristylation but does not inhibit biological activity. Journal of Biological Chemistry **264**(33): 20140-6.
- 88.** Cliff, M.J. and Ladbury, J.E. (2003). A survey of the year 2002 literature on applications of isothermal titration calorimetry. Journal of Molecular Recognition **16**(6): 383-91.
- 89.** Coghlan, V.M., Perrino, B.A., Howard, M., Langeberg, L.K., Hicks, J.B., Gallatin, W.M. and Scott, J.D. (1995). Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. Science **267**(5194): 108-11.
- 90.** Cohen, P. (2000). The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. Trends in Biochemical Sciences **25**(12): 596-601.
- 91.** Cohen, P. (2002). Protein kinases - the major drug targets of the twenty-first century? Nat Rev Drug Discov **1**(4): 309-15.
- 92.** Cong, M., Thompson, V.F., Goll, D.E. and Antin, P.B. (1998). The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity. Journal of Biological Chemistry **273**(1): 660-6.
- 93.** Conti, M. and Beavo, J. (2007). Biochemistry and Physiology of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Essential Components in Cyclic Nucleotide Signaling. Annual Review of Biochemistry.
- 94.** Cookson, M.R. (2005). The biochemistry of Parkinson's disease. Annual Review of Biochemistry **74**: 29-52.
- 95.** Cooper, A. (1999). Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. Current Opinion in Chemical Biology **3**(5): 557-63.
- 96.** Cooper, A., Johnson, C.M., Lakey, J.H. and Nollmann, M. (2001). Heat does not come in different colours: entropy-enthalpy compensation, free energy windows, quantum confinement, pressure perturbation calorimetry, solvation and the multiple causes of heat capacity effects in biomolecular interactions. Biophysical Chemistry **93**(2-3): 215-30.
- 97.** Cooper, D.M. (2005). Compartmentalization of adenylyl cyclase and cAMP signalling. Biochemical Society Transactions **33**(Pt 6): 1319-22.
- 98.** Cooper, M.A. (2003). Label-free screening of biomolecular interactions. Anal Bioanal Chem **377**(5): 834-42.
- 99.** Corbin, J.D., Keely, S.L. and Park, C.R. (1975). The distribution and dissociation of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases in adipose, cardiac, and other tissues. Journal of Biological Chemistry **250**(1): 218-25.
- 100.** Corbin, J.D. and Keely, S.L. (1977). Characterization and regulation of heart adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase isozymes. Journal of Biological Chemistry **252**(3): 910-8.

- 101.** Corbin, J.D., Rannels, S.R., Flockhart, D.A., Robinson-Steiner, A.M., Tigani, M.C., Doskeland, S.O., Suva, R.H., Suva, R. and Miller, J.P. (1982). Effect of cyclic nucleotide analogs on intrachain site I of protein kinase isozymes. European Journal of Biochemistry **125**(2): 259-66.
- 102.** Craven, K.B. and Zagotta, W.N. (2006). CNG and HCN channels: two peas, one pod. Annual Review of Physiology **68**: 375-401.
- 103.** Cremo, C.R. (2003). Fluorescent nucleotides: synthesis and characterization. Methods in Enzymology **360**: 128-77.
- 104.** Cummings, D.E., Brandon, E.P., Planas, J.V., Motamed, K., Idzerda, R.L. and McKnight, G.S. (1996). Genetically lean mice result from targeted disruption of the RII beta subunit of protein kinase A. Nature **382**(6592): 622-6.
- 105.** Dalpiaz, A., Townsend-Nicholson, A., Beukers, M.W., Schofield, P.R. and AP, I.J. (1998). Thermodynamics of full agonist, partial agonist, and antagonist binding to wild-type and mutant adenosine A1 receptors. Biochemical Pharmacology **56**(11): 1437-45.
- 106.** Dalpiaz, A., Scatturin, A., Varani, K., Pecoraro, R., Pavan, B. and Borea, P.A. (2000). Binding thermodynamics and intrinsic activity of adenosine A(1) receptor ligands. Life Sciences **67**(12): P11517-P11524.
- 107.** Dao, K.K., Teigen, K., Kopperud, R., Hodneland, E., Schwede, F., Christensen, A.E., Martinez, A. and Doskeland, S.O. (2006). Epac1 and cAMP-dependent Protein Kinase Holoenzyme Have Similar cAMP Affinity, but Their cAMP Domains Have Distinct Structural Features and Cyclic Nucleotide Recognition. Journal of Biological Chemistry **281**(30): 21500-11.
- 108.** Das, R. and Melacini, G. (2007a). A Model for Agonism and Antagonism in an Ancient and Ubiquitous cAMP-binding Domain. Journal of Biological Chemistry **282**(1): 581-93.
- 109.** Das, R., Esposito, V., Abu-Abed, M., Anand, G.S., Taylor, S.S. and Melacini, G. (2007b). cAMP activation of PKA defines an ancient signaling mechanism. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(1): 93-8.
- 110.** Daub, H. (2005). Characterisation of kinase-selective inhibitors by chemical proteomics. Biochimica et Biophysica Acta **1754**(1-2): 183-90.
- 111.** De Cesare, D., Fimia, G.M. and Sassone-Corsi, P. (1999). Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. Trends in Biochemical Sciences **24**(7): 281-5.
- 112.** de Rooij, J., Rehmann, H., van Triest, M., Cool, R.H., Wittinghofer, A. and Bos, J.L. (2000). Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. Journal of Biological Chemistry **275**(27): 20829-20836.
- 113.** de Wit, R.J. and Hoppe, J. (1981). Separation of two nonidentical cAMP binding sites in the cAMP-dependent protein kinase type I. FEBS Letters **127**(1): 9-12.
- 114.** de Wit, R.J., Hoppe, J., Stec, W.J., Baraniak, J. and Jastorff, B. (1982). Interaction of cAMP derivatives with the 'stable' cAMP-binding site in the cAMP-dependent protein kinase type I. European Journal of Biochemistry **122**(1): 95-9.
- 115.** de Wit, R.J., Hekstra, D., Jastorff, B., Stec, W.J., Baraniak, J., Van Driel, R. and Van Haastert, P.J. (1984). Inhibitory action of certain cyclophosphate derivatives of cAMP on cAMP-dependent protein kinases. European Journal of Biochemistry **142**(2): 255-60.
- 116.** Dell'Acqua, M.L., Faux, M.C., Thorburn, J., Thorburn, A. and Scott, J.D. (1998). Membrane-targeting sequences on AKAP79 bind phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate. EMBO Journal **17**(8): 2246-60.
- 117.** Demaille, J.G., Peters, K.A., Strandjord, T.P. and Fischer, E.H. (1978). Isolation and properties of the bovine brain protein inhibitor of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases. FEBS Letters **86**(1): 113-6.
- 118.** Desseyn, J.L., Burton, K.A. and McKnight, G.S. (2000). Expression of a nonmyristylated variant of the catalytic subunit of protein kinase A during male germ-cell development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(12): 6433-8.
- 119.** Diller, T.C., Xuong, N.H. and Taylor, S.S. (2000). Type II beta regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase: purification strategies to optimize crystallization. Protein Expression and Purification **20**(3): 357-64.
- 120.** Diller, T.C., Madhusudan, Xuong, N.H. and Taylor, S.S. (2001). Molecular basis for regulatory subunit diversity in cAMP-dependent protein kinase: crystal structure of the type II beta regulatory subunit. Structure (Camb) **9**(1): 73-82.
- 121.** Dills, W.L., Jr., Beavo, J.A., Bechtel, P.J. and Krebs, E.G. (1975). Purification of rabbit skeletal muscle protein kinase regulatory subunit using cyclic adenosine-3':5'-monophosphate affinity chromatography. Biochemical and Biophysical Research Communications **62**(1): 70-7.
- 122.** Diviani, D., Abuin, L., Cotecchia, S. and Pansier, L. (2004). Anchoring of both PKA and 14-3-3 inhibits the Rho-GEF activity of the AKAP-Lbc signaling complex. EMBO Journal **23**(14): 2811-20.
- 123.** Dodge-Kafka, K.L. and Kapiloff, M.S. (2006). The mAkap signaling complex: integration of cAMP, calcium, and MAP kinase signaling pathways. European Journal of Cell Biology **85**(7): 593-602.
- 124.** Døskeland, S.O. (1978). Evidence that rabbit muscle protein kinase has two kinetically distinct binding sites for adenosine 3' ; 5'-cyclic monophosphate. Biochemical and Biophysical Research Communications **83**(2): 542-9.
- 125.** Døskeland, S.O. and Øgreid, D. (1981). Binding proteins for cyclic AMP in mammalian tissues. International Journal of Biochemistry **13**(1): 1-19.
- 126.** Døskeland, S.O., Øgreid, D., Ekanger, R., Sturm, P.A., Miller, J.P. and Suva, R.H. (1983). Mapping of the two intrachain cyclic nucleotide binding sites of adenosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase I. Biochemistry **22**(5): 1094-101.
- 127.** Døskeland, S.O. and Øgreid, D. (1988). Ammonium Sulfate Precipitation Assay for the Study of Cyclic Nucleotide Binding to Proteins. Methods in Enzymology **159**: 147-50.

- 128.** Dostmann, W.R., Taylor, S.S., Genieser, H.G., Jastorff, B., Døskeland, S.O. and Øgreid, D. (1990). Probing the cyclic nucleotide binding sites of cAMP-dependent protein kinases I and II with analogs of adenosine 3',5'-cyclic phosphorothioates. Journal of Biological Chemistry **265**(18): 10484-91.
- 129.** Dostmann, W.R. and Taylor, S.S. (1991). Identifying the molecular switches that determine whether (Rp)-cAMPS functions as an antagonist or an agonist in the activation of cAMP-dependent protein kinase I. Biochemistry **30**(35): 8710-6.
- 130.** Dostmann, W.R. (1995). (RP)-cAMPS inhibits the cAMP-dependent protein kinase by blocking the cAMP-induced conformational transition. FEBS Letters **375**(3): 231-4.
- 131.** Doyle, M.L. (1997). Characterization of binding interactions by isothermal titration calorimetry. Curr Opin Biotechnol **8**(1): 31-5.
- 132.** Dransfield, D.T., Bradford, A.J., Smith, J., Martin, M., Roy, C., Mangeat, P.H. and Goldenring, J.R. (1997). Ezrin is a cyclic AMP-dependent protein kinase anchoring protein. EMBO Journal **16**(1): 35-43.
- 133.** Dubois, T., Mira, J.P., Feliens, D., Solito, E., Russo-Marie, F. and Oudinet, J.P. (1998). Annexin V inhibits protein kinase C activity via a mechanism of phospholipid sequestration. The Biochemical journal **330** (Pt 3): 1277-82.
- 134.** Durgerian, S. and Taylor, S.S. (1989). The consequences of introducing an autophosphorylation site into the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. Journal of Biological Chemistry **264**(17): 9807-13.
- 135.** Engh, R.A., Girod, A., Kinzel, V., Huber, R. and Bossemeyer, D. (1996). Crystal structures of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in complex with isoquinolinesulfonyl protein kinase inhibitors H7, H8, and H89. Structural implications for selectivity. Journal of Biological Chemistry **271**(42): 26157-64.
- 136.** Engvall, E., Jonsson, K. and Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. Biochimica et Biophysica Acta **251**(3): 427-34.
- 137.** Enserink, J.M., Christensen, A.E., de Rooij, J., van Triest, M., Schwede, F., Genieser, H.G., Døskeland, S.O., Blank, J.L. and Bos, J.L. (2002). A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. Nat Cell Biol **4**(11): 901-6.
- 138.** Erlbruch, A. (2007). Dissertation: Entwicklung einer expressionsfreien Tandem-Affinitätsreinigung zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen der Isoformen der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A. Universität Kassel, Fachbereich Naturwissenschaften
- 139.** Erlbruch, A., C.-H., C.-W.H., Borrmann, K., Gesellchen, F., Koenig, N., Kuebler, D., Herberg, F.W., Lehmann, W.D. and Bossemeyer, D. (in preparation). A Complex of CARP-1 and PKA C-beta 1 Identified by Expression Coupled Tandem Affinity Purification, a Versatile Method for Tissue Interaction Proteomics.
- 140.** Erlichman, J., Rosenfeld, R. and Rosen, O.M. (1974). Phosphorylation of a cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. Journal of Biological Chemistry **249**(15): 5000-3.
- 141.** Falbriard, J.-G., Posternak, T. and Sutherland, E.W. (1967). Preparation of derivatives of adenosine 3',5'-phosphate. Biochimica et Biophysica Acta **148**(1): 99-105.
- 142.** Fantozzi, D.A., Harootunian, A.T., Wen, W., Taylor, S.S., Feramisco, J.R., Tsien, R.Y. and Meinkoth, J.L. (1994). Thermostable inhibitor of cAMP-dependent protein kinase enhances the rate of export of the kinase catalytic subunit from the nucleus. Journal of Biological Chemistry **269**(4): 2676-86.
- 143.** Fazakerley, G.V. and Wolfe, M.A. (1977). Determination of the solution conformation of adenosine 2':3'-monophosphate by nuclear magnetic resonance with lanthanide probes. European Journal of Biochemistry **74**(2): 337-41.
- 144.** Ficarro, S.B., McClelland, M.L., Stukenberg, P.T., Burke, D.J., Ross, M.M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and White, F.M. (2002). Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. Nature Biotechnology **20**(3): 301-5.
- 145.** Fields, S. and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature **340**(6230): 245-6.
- 146.** Fischer, E.H. (1992). Nobel Lecture: Protein phosphorylation and cellular regulation, II.
- 147.** Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. Ann. Physik **2**: 55-75.
- 148.** Frey, P.A. and Sammons, R.D. (1985). Bond order and charge localization in nucleoside phosphorothioates. Science **228**(4699): 541-5.
- 149.** Fromont-Racine, M., Rain, J.C. and Legrain, P. (1997). Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. Nature Genetics **16**(3): 277-82.
- 150.** Fukunaga, K., Muller, D. and Miyamoto, E. (1995). Increased Phosphorylation of Ca[IMAGE]/Calmodulin-dependent Protein Kinase II and Its Endogenous Substrates in the Induction of Long Term Potentiation. Journal of Biological Chemistry **270**(11): 6119-6124.
- 151.** Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M.A., Copley, R.R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G. and Superti-Furga, G. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. Nature **415**(6868): 141-7.
- 152.** Gavin, A.C. and Superti-Furga, G. (2003). Protein complexes and proteome organization from yeast to man. Current Opinion in Chemical Biology **7**(1): 21-7.
- 153.** Gavin, A.C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L.J., Bastuck, S., Dumpelfeld, B., Edelmann, A., Heurtier, M.A.,

- Hoffman, V., Hoefert, C., Klein, K., Hudak, M., Michon, A.M., Schelder, M., Schirle, M., Remor, M., Rudi, T., Hooper, S., Bauer, A., Bouwmeester, T., Casari, G., Drewes, G., Neubauer, G., Rick, J.M., Kuster, B., Bork, P., Russell, R.B. and Superti-Furga, G. (2006). Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. Nature **440**(7084): 631-6.
- 154.** Geahlen, R.L., Carmichael, D.F., Hashimoto, E. and Krebs, E.G. (1982). Phosphorylation of cAMP-dependent protein kinase subunits. Advances in Enzyme Regulation **20**: 195-209.
- 155.** Genieser, H.G., Dostmann, W.R., Bottin, U., Butt, E. and Jastorff, B. (1988). Synthesis of nucleoside-3',5'-cyclic phosphorothioates by cyclothiophosphorylation of unprotected nucleosides. Tetrahedron Letters **29**(23): 2803-2804.
- 156.** Gesellchen, F., Zimmermann, B. and Herberg, F.W. (2005). Direct optical detection of protein-ligand interactions. Methods in Molecular Biology **305**: 17-46.
- 157.** Gesellchen, F., Prinz, A., Zimmermann, B. and Herberg, F.W. (2006). Quantification of cAMP antagonist action in vitro and in living cells. European Journal of Cell Biology **85**(7): 663-72.
- 158.** Gibson, R.M., Ji-Buechler, Y. and Taylor, S.S. (1997). Interaction of the regulatory and catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinase. Electrostatic sites on the type Ialpha regulatory subunit. Journal of Biological Chemistry **272**(26): 16343-16350.
- 159.** Gilli, P., Gilli, G., Borea, P.A., Varani, K., Scatturin, A. and Dalpiaz, A. (2005). Binding thermodynamics as a tool to investigate the mechanisms of drug-receptor interactions: Thermodynamics of cytoplasmic steroid/nuclear receptors in comparison with membrane receptors. Journal of Medicinal Chemistry **48**(6): 2026-2035.
- 160.** Gilman, A.G. (1994). Nobel Lecture: G proteins and regulation of adenylyl cyclase.
- 161.** Goehler, H., Lalowski, M., Stelzl, U., Waelter, S., Stroedicke, M., Worm, U., Droege, A., Lindenberg, K.S., Knoblich, M., Haenig, C., Herbst, M., Suopanki, J., Scherzinger, E., Abraham, C., Bauer, B., Hasenbank, R., Fritzsche, A., Ludewig, A.H., Bussow, K., Coleman, S.H., Gutekunst, C.A., Landwehrmeyer, B.G., Lehrach, H. and Wanker, E.E. (2004). A protein interaction network links GIT1, an enhancer of huntingtin aggregation, to Huntington's disease. Molecular Cell **15**(6): 853-65.
- 162.** Gold, M.G., Barford, D. and Komander, D. (2006a). Lining the pockets of kinases and phosphatases. Current Opinion in Structural Biology **16**(6): 693-701.
- 163.** Gold, M.G., Lygren, B., Dokurno, P., Hoshi, N., McConnachie, G., Tasken, K., Carlson, C.R., Scott, J.D. and Barford, D. (2006b). Molecular basis of AKAP specificity for PKA regulatory subunits. Molecular Cell **24**(3): 383-95.
- 164.** Gonzalez, G.A. and Montminy, M.R. (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. Cell **59**(4): 675-80.
- 165.** Gorman, K.B. and Steinberg, R.A. (1994). Spectrum of spontaneous missense mutations causing cyclic AMP-resistance phenotypes in cultured S49 mouse lymphoma cells differs markedly from those of mutations induced by alkylating mutagens. Somatic Cell and Molecular Genetics **20**(4): 301-11.
- 166.** Gorshkova, I., Moore, J.L., McKenney, K.H. and Schwarz, F.P. (1995). Thermodynamics of cyclic nucleotide binding to the cAMP receptor protein and its T127L mutant. Journal of Biological Chemistry **270**(37): 21679-83.
- 167.** Götte, M. (2004). Diplomarbeit: In silico Untersuchungen zur cAMP-Bindung an regulatorische Untereinheiten der cAMP-abhängigen Proteinkinase. Universität Kassel, Fachbereich 18 - Naturwissenschaften
- 168.** Granot, J., Mildvan, A.S., Hiyama, K., Kondo, H. and Kaiser, E.T. (1980). Magnetic resonance studies of the effect of the regulatory subunit on metal and substrate binding to the catalytic subunit of bovine heart protein kinase. Journal of Biological Chemistry **255**(10): 4569-73.
- 169.** Graves, P.R. and Haystead, T.A. (2002). Molecular biologist's guide to proteomics. Microbiology and Molecular Biology Reviews **66**(1): 39-63; table of contents.
- 170.** Graves, P.R. and Haystead, T.A. (2003). A functional proteomics approach to signal transduction. Recent Progress in Hormone Research **58**: 1-24.
- 171.** Gronenborn, A.M. and Clore, G.M. (1982). Proton nuclear magnetic resonance studies on cyclic nucleotide binding to the Escherichia coli adenosine cyclic 3',5'-phosphate receptor protein. Biochemistry **21**(17): 4040-8.
- 172.** Gu, Y.M., Jin, Y.H., Choi, J.K., Baek, K.H., Yeo, C.Y. and Lee, K.Y. (2006). Protein kinase A phosphorylates and regulates dimerization of 14-3-3 epsilon. FEBS Letters **580**(1): 305-10.
- 173.** Gupta, M. and Yarwood, S.J. (2005). MAP1A light chain 2 interacts with exchange protein activated by cyclic AMP 1 (EPAC1) to enhance Rap1 GTPase activity and cell adhesion. Journal of Biological Chemistry **280**(9): 8109-16.
- 174.** Guthrie, C.R., Skalhegg, B.S. and McKnight, G.S. (1997). Two novel brain-specific splice variants of the murine Cbeta gene of cAMP-dependent protein kinase. Journal of Biological Chemistry **272**(47): 29560-5.
- 175.** Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H. and Aebersold, R. (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. Nature Biotechnology **17**(10): 994-9.
- 176.** Haddox, M.K., Nicol, S.E. and Goldberg, N.D. (1973). pH induced increase in cyclic GMP reactivity with cyclic AMP-dependent protein kinases. Biochemical and Biophysical Research Communications **54**(4): 1444-50.
- 177.** Hahnefeld, C. (2004). Dissertation: Regulation von zyklonukleotidabhängigen Proteinkinasen. Universität Kassel, Fachbereich 18 - Naturwissenschaften, Abteilung Biochemie
- 178.** Hahnefeld, C., Drewianka, S. and Herberg, F.W. (2004). Determination of kinetic data using surface plasmon resonance biosensors. Methods in Molecular Medicine **94**: 299-320.

- 179.** Hamuro, Y., Burns, L., Canaves, J., Hoffman, R., Taylor, S. and Woods, V. (2002). Domain organization of D-AKAP2 revealed by enhanced deuterium exchange-mass spectrometry (DXMS). Journal of Molecular Biology **321**(4): 703-14.
- 180.** Hamuro, Y., Zawadzki, K.M., Kim, J.S., Stranz, D.D., Taylor, S.S. and Woods, V.L., Jr. (2003). Dynamics of cAPK type IIbeta activation revealed by enhanced amide H/2H exchange mass spectrometry (DXMS). Journal of Molecular Biology **327**(5): 1065-76.
- 181.** Hamuro, Y., Anand, G.S., Kim, J.S., Juliano, C., Stranz, D.D., Taylor, S.S. and Woods, V.L., Jr. (2004). Mapping intersubunit interactions of the regulatory subunit (RIalpha) in the type I holoenzyme of protein kinase A by amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry (DXMS). Journal of Molecular Biology **340**(5): 1185-96.
- 182.** Han, D.K., Eng, J., Zhou, H. and Aebersold, R. (2001). Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. Nature Biotechnology **19**(10): 946-51.
- 183.** Hanks, S.K., Quinn, A.M. and Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. Science **241**(4861): 42-52.
- 184.** Hanks, S.K. and Quinn, A.M. (1991). Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. Methods in Enzymology **200**: 38-62.
- 185.** Hanks, S.K. and Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. FASEB Journal **9**(8): 576-96.
- 186.** Hargrove, M.S. (2005). Ligand binding with stopped-flow rapid mixing. Methods in Molecular Biology: Protein Ligand Interactions: Methods and Applications. G. U. Nienhaus. Totowa, Humana Press. **305**: 323-42.
- 187.** Harper, J.F. and Brooker, G. (1975). Femtomole sensitive radioimmunoassay for cyclic AMP and cyclic GMP after 2'0 acetylation by acetic anhydride in aqueous solution. Journal of Cyclic Nucleotide Research **1**(4): 207-18.
- 188.** Hayashi, F., Akasaka, K. and Hatano, H. (1979). Conformation of adenosine 3',5'-monophosphate in solution as studied by the NMR-desert method. II. Self-association and temperature-dependent glycosidic isomerization at pH 7. Biochimica et Biophysica Acta **588**(2): 181-92.
- 189.** Henion, W.F., Sutherland, E.W. and Posternak, T. (1967). Effects of derivatives of adenosine 3',5'-phosphate on liver slices and intact animals. Biochimica et Biophysica Acta **148**(1): 106-13.
- 190.** Herberg, F.W. and Taylor, S.S. (1993). Physiological inhibitors of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase: effect of MgATP on protein-protein interactions. Biochemistry **32**(50): 14015-22.
- 191.** Herberg, F.W., Dostmann, W.R., Zorn, M., Davis, S.J. and Taylor, S.S. (1994). Crosstalk between domains in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase: influence of amino terminus on cAMP binding and holoenzyme formation. Biochemistry **33**(23): 7485-94.
- 192.** Herberg, F.W., Taylor, S.S. and Dostmann, W.R. (1996). Active site mutations define the pathway for the cooperative activation of cAMP-dependent protein kinase. Biochemistry **35**(9): 2934-42.
- 193.** Herberg, F.W., Doyle, M.L., Cox, S. and Taylor, S.S. (1999). Dissection of the nucleotide and metal-phosphate binding sites in cAMP-dependent protein kinase. Biochemistry **38**(19): 6352-60.
- 194.** Herberg, F.W., Maleszka, A., Eide, T., Vossebein, L. and Tasken, K. (2000). Analysis of A-kinase anchoring protein (AKAP) interaction with protein kinase A (PKA) regulatory subunits: PKA isoform specificity in AKAP binding. Journal of Molecular Biology **298**(2): 329-39.
- 195.** Herzog, W. and Weber, K. (1978). Fractionation of brain microtubule-associated proteins. Isolation of two different proteins which stimulate tubulin polymerization in vitro. European Journal of Biochemistry **92**(1): 1-8.
- 196.** Hofmann, F., Beavo, J.A., Bechtel, P.J. and Krebs, E.G. (1975). Comparison of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases from rabbit skeletal and bovine heart muscle. Journal of Biological Chemistry **250**(19): 7795-801.
- 197.** Holdgate, G.A. (2001). Making cool drugs hot: isothermal titration calorimetry as a tool to study binding energetics. BioTechniques **31**(1): 164-6, 168, 170 passim.
- 198.** Holdgate, G.A. and Ward, W.H.J. (2005). Measurements of binding thermodynamics in drug discovery. Drug Discovery Today **10**(22): 1543-1550.
- 199.** Huang, L.J., Durick, K., Weiner, J.A., Chun, J. and Taylor, S.S. (1997). Identification of a novel protein kinase A anchoring protein that binds both type I and type II regulatory subunits. Journal of Biological Chemistry **272**(12): 8057-64.
- 200.** Huang, L.J. and Taylor, S.S. (1998). Dissecting cAMP binding domain A in the RIalpha subunit of cAMP-dependent protein kinase. Distinct subsites for recognition of cAMP and the catalytic subunit. Journal of Biological Chemistry **273**(41): 26739-46.
- 201.** Huang, X. (2003). Equilibrium competition binding assay: inhibition mechanism from a single dose response. J Theor Biol **225**(3): 369-76.
- 202.** Huang, Y.Y., Kandel, E.R., Varshavsky, L., Brandon, E.P., Qi, M., Idzerda, R.L., McKnight, G.S. and Bourchouladze, R. (1995). A genetic test of the effects of mutations in PKA on mossy fiber LTP and its relation to spatial and contextual learning. Cell **83**(7): 1211-22.
- 203.** Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. Journal of Molecular Graphics **14**(1): 27-28, 33-38.
- 204.** Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. Cell **80**(2): 225-36.
- 205.** Hunter, T. (2000). Signaling-2000 and beyond. Cell **100**(1): 113-27.
- 206.** Husi, H., Ward, M.A., Choudhary, J.S., Blackstock, W.P. and Grant, S.G. (2000). Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. Nature Neuroscience **3**(7): 661-9.

- 207.** Iancu, R.V., Jones, S.W. and Harvey, R.D. (2007). Compartmentation of cAMP Signaling in Cardiac Myocytes: A Computational Study. Biophysical Journal.
- 208.** Ikehara, M., Uesugi, S. and Yoshida, K. (1972). Studies on the conformation of purine nucleosides and their 5'-phosphates. Biochemistry **11**(5): 830-6.
- 209.** Inagaki, M., Gonda, Y., Nishizawa, K., Kitamura, S., Sato, C., Ando, S., Tanabe, K., Kikuchi, K., Tsuiki, S. and Nishi, Y. (1990). Phosphorylation sites linked to glial filament disassembly in vitro locate in a non-alpha-helical head domain. Journal of Biological Chemistry **265**(8): 4722-4729.
- 210.** Inan, M., Lu, H.C., Albright, M.J., She, W.C. and Crair, M.C. (2006). Barrel map development relies on protein kinase A regulatory subunit II beta-mediated cAMP signaling. Journal of Neuroscience **26**(16): 4338-49.
- 211.** Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M. and Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(8): 4569-74.
- 212.** Jacoby, E., Bouhelal, R., Gerspacher, M. and Seuwen, K. (2006). The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. ChemMedChem **1**(8): 761-82.
- 213.** Jahnsen, T., Lohmann, S.M., Walter, U., Hedin, L. and Richards, J.S. (1985). Purification and characterization of hormone-regulated isoforms of the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase from rat ovaries. Journal of Biological Chemistry **260**(29): 15980-7.
- 214.** Jahnsen, T., Hedin, L., Kidd, V.J., Beattie, W.G., Lohmann, S.M., Walter, U., Durica, J., Schulz, T.Z., Schiltz, E., Browner, M. and et al. (1986). Molecular cloning, cDNA structure, and regulation of the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase from rat ovarian granulosa cells. Journal of Biological Chemistry **261**(26): 12352-61.
- 215.** Jaiswal, B.S. and Conti, M. (2003). Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(19): 10676-81.
- 216.** Jameson, D.M. and Mocz, G. (2005). Fluorescence polarization/anisotropy approaches to study protein-ligand interactions: effects of errors and uncertainties. Methods in Molecular Biology: Protein Ligand Interactions: Methods and Applications. G. U. Nienhaus. Totowa, Humana Press. **305**: 301-22.
- 217.** Jergil, B., Guilford, H. and Mosbach, K. (1974). Biospecific affinity chromatography of an adenosine 3':5'-cyclic monophosphate-stimulated protein kinase (protamine kinase from trout testis) by using immobilized adenine nucleotides. Biochemical Journal **139**(2): 441-8.
- 218.** Jin, S.L., Bushnik, T., Lan, L. and Conti, M. (1998). Subcellular localization of rolipram-sensitive, cAMP-specific phosphodiesterases. Differential targeting and activation of the splicing variants derived from the PDE4D gene. Journal of Biological Chemistry **273**(31): 19672-8.
- 219.** Jobling, M.A., Lo, I.C., Turner, D.J., Bowden, G.R., Lee, A.C., Xue, Y., Carvalho-Silva, D., Hurles, M.E., Adams, S.M., Chang, Y.M., Kraaijenbrink, T., Henke, J., Guanti, G., McKeown, B., van Oorschot, R.A., Mitchell, R.J., de Knijff, P., Tyler-Smith, C. and Parkin, E.J. (2007). Structural variation on the short arm of the human Y chromosome: recurrent multigene deletions encompassing Amelogenin Y. Human Molecular Genetics **16**(3): 307-16.
- 220.** Johannessen, M., Delghandi, M.P. and Moens, U. (2004). What turns CREB on? Cellular Signalling **16**(11): 1211-27.
- 221.** Johnson, D.A., Leathers, V.L., Martinez, A.M., Walsh, D.A. and Fletcher, W.H. (1993). Fluorescence resonance energy transfer within a heterochromatic cAMP-dependent protein kinase holoenzyme under equilibrium conditions: new insights into the conformational changes that result in cAMP-dependent activation. Biochemistry **32**(25): 6402-10.
- 222.** Johnson, D.A., Akamine, P., Radzio-Andzelm, E., Madhusudan, M. and Taylor, S.S. (2001a). Dynamics of cAMP-dependent protein kinase. Chemical Reviews **101**(8): 2243-70.
- 223.** Johnson, L.N. and Lewis, R.J. (2001b). Structural basis for control by phosphorylation. Chemical Reviews **101**(8): 2209-42.
- 224.** Johnson, S.A. and Hunter, T. (2005). Kinomics: methods for deciphering the kinome. Nat Methods **2**(1): 17-25.
- 225.** Jordan, J.D., Landau, E.M. and Iyengar, R. (2000). Signaling networks: the origins of cellular multitasking. Cell **103**(2): 193-200.
- 226.** Junttila, I., Bourette, R.P., Rohrschneider, L.R. and Silvennoinen, O. (2003). M-CSF induced differentiation of myeloid precursor cells involves activation of PKC-delta and expression of Pkare. Journal of Leukocyte Biology **73**(2): 281-8.
- 227.** Kamenetsky, M., Middelhaufe, S., Bank, E.M., Levin, L.R., Buck, J. and Steegborn, C. (2006). Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. Journal of Molecular Biology **362**(4): 623-39.
- 228.** Kannan, N., Taylor, S.S., Zhai, Y., Venter, J.C. and Manning, G. (2007). Structural and Functional Diversity of the Microbial Kinome. PLoS Biol **5**(3): e17.
- 229.** Karlsson, R. (2004). SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas. Journal of Molecular Recognition **17**(3): 151-61.
- 230.** Kasai, H. and Petersen, O.H. (1994). Spatial dynamics of second messengers: IP3 and cAMP as long-range and associative messengers. Trends in Neurosciences **17**(3): 95-101.
- 231.** Katada, T., Northup, J.K., Bokoch, G.M., Ui, M. and Gilman, A.G. (1984a). The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Subunit dissociation and guanine nucleotide-dependent hormonal inhibition. Journal of Biological Chemistry **259**(6): 3578-85.
- 232.** Katada, T., Bokoch, G.M., Smigel, M.D., Ui, M. and Gilman, A.G. (1984b). The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Subunit dissociation and the inhibition of adenylate cyclase in S49 lymphoma cyc- and wild type membranes. Journal of Biological Chemistry **259**(6): 3586-95.

- 233.** Kellner, R. (2000). Proteomics. Concepts and perspectives. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry **366**(6-7): 517-24.
- 234.** Kemp, B.E., Graves, D.J., Benjamini, E. and Krebs, E.G. (1977). Role of multiple basic residues in determining the substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase. Journal of Biological Chemistry **252**(14): 4888-94.
- 235.** Kemp, B.E. and Pearson, R.B. (1990). Protein kinase recognition sequence motifs. Trends in Biochemical Sciences **15**(9): 342-6.
- 236.** Kennelly, P.J. and Krebs, E.G. (1991). Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. Journal of Biological Chemistry **266**(24): 15555-8.
- 237.** Kim, B.B., Dikova, E.B., Sheller, U., Dikov, M.M., Gavrilova, E.M. and Egorov, A.M. (1990). Evaluation of dissociation constants of antigen-antibody complexes by ELISA. Journal of Immunological Methods **131**(2): 213-22.
- 238.** Kim, C., Xuong, N.H. and Taylor, S.S. (2005). Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (R1alpha) subunits of PKA. Science **307**(5710): 690-6.
- 239.** Kim, C., Vigil, D., Anand, G. and Taylor, S.S. (2006). Structure and dynamics of PKA signaling proteins. European Journal of Cell Biology **85**(7): 651-4.
- 240.** Kinzel, V., Konig, N., Pipkorn, R., Bossemeyer, D. and Lehmann, W.D. (2000). The amino terminus of PKA catalytic subunit--a site for introduction of posttranslational heterogeneities by deamidation: D-Asp2 and D-isoAsp2 containing isozymes. Protein Science **9**(11): 2269-77.
- 241.** Klauck, T.M., Faux, M.C., Labudda, K., Langeberg, L.K., Jaken, S. and Scott, J.D. (1996). Coordination of three signaling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein. Science **271**(5255): 1589-92.
- 242.** Klink, A., Schiebel, K., Winkelmann, M., Rao, E., Horsthemke, B., Ludecke, H.J., Claussen, U., Scherer, G. and Rappold, G. (1995). The human protein kinase gene PKX1 on Xp22.3 displays Xp/Yp homology and is a site of chromosomal instability. Human Molecular Genetics **4**(5): 869-78.
- 243.** Knighton, D.R., Zheng, J.H., Ten Eyck, L.F., Xuong, N.H., Taylor, S.S. and Sowadski, J.M. (1991a). Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. Science **253**(5018): 414-20.
- 244.** Knighton, D.R., Zheng, J.H., Ten Eyck, L.F., Ashford, V.A., Xuong, N.H., Taylor, S.S. and Sowadski, J.M. (1991b). Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. Science **253**(5018): 407-14.
- 245.** Kopperud, R., Christensen, A.E., Kjarland, E., Viste, K., Kleivdal, H. and Doskeland, S.O. (2002). Formation of inactive cAMP-saturated holoenzyme of cAMP-dependent protein kinase under physiological conditions. Journal of Biological Chemistry **277**(16): 13443-8.
- 246.** Kotera, J., Sasaki, T., Kobayashi, T., Fujishige, K., Yamashita, Y. and Omori, K. (2004). Subcellular localization of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 10A variants, and alteration of the localization by cAMP-dependent protein kinase-dependent phosphorylation. Journal of Biological Chemistry **279**(6): 4366-75.
- 247.** Krebs, E.G. (1992). Nobel Lecture: Protein phosphorylation and cellular regulation, I.
- 248.** Ladbury, J.E. and Chowdhry, B.Z. (1996). Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. Chemistry and Biology **3**(10): 791-801.
- 249.** Larsericsdotter, H., Jansson, O., Zhukov, A., Areskou, D., Oscarsson, S. and Buijs, J. (2006). Optimizing the surface plasmon resonance/mass spectrometry interface for functional proteomics applications: how to avoid and utilize nonspecific adsorption. Proteomics **6**(8): 2355-64.
- 250.** Lattanzi, W., Di Giacomo, M.C., Lenato, G.M., Chimienti, G., Voglino, G., Resta, N., Pepe, G. and Guanti, G. (2005). A large interstitial deletion encompassing the amelogenin gene on the short arm of the Y chromosome. Human Genetics **116**(5): 395-401.
- 251.** Laukens, K., Roef, L., Witters, E., Slegers, H. and Van Onckelen, H. (2001). Cyclic AMP affinity purification and ESI-QTOF MS-MS identification of cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and two nucleoside diphosphate kinase isoforms from tobacco BY-2 cells. FEBS Letters **508**(1): 75-9.
- 252.** Lawson, C.L., Swigon, D., Murakami, K.S., Darst, S.A., Berman, H.M. and Ebricht, R.H. (2004). Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. Current Opinion in Structural Biology **14**(1): 10-20.
- 253.** Leavitt, S. and Freire, E. (2001). Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. Current Opinion in Structural Biology **11**(5): 560-6.
- 254.** Lee, B.J., Aiba, H. and Kyogoku, Y. (1991). Nuclear magnetic resonance study on the structure and interaction of cyclic AMP receptor protein and its mutants: a deuterium-labeling and photo-CIDNP study. Biochemistry **30**(37): 9047-54.
- 255.** Lee, D.C., Carmichael, D.F., Krebs, E.G. and McKnight, G.S. (1983). Isolation of a cDNA clone for the type I regulatory subunit of bovine cAMP-dependent protein kinase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **80**(12): 3608-12.
- 256.** Lefkowitz, R.J. (2004). Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. Trends in Pharmacological Sciences **25**(8): 413-22.
- 257.** Leon, D.A., Herberg, F.W., Banky, P. and Taylor, S.S. (1997). A stable alpha-helical domain at the N terminus of the R1alpha subunits of cAMP-dependent protein kinase is a novel dimerization/docking motif. Journal of Biological Chemistry **272**(45): 28431-7.
- 258.** Levy, F.O., Oyen, O., Sandberg, M., Tasken, K., Eskild, W., Hansson, V. and Jahnsen, T. (1988). Molecular cloning, complementary deoxyribonucleic acid structure and predicted full-length amino acid sequence of the hormone-inducible regulatory subunit of 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase from human testis. Molecular Endocrinology **2**(12): 1364-73.

259. Li, W., Yu, Z.X. and Kotin, R.M. (2005). Profiles of PrKX Expression in Developmental Mouse Embryo and Human Tissues. Journal of Histochemistry and Cytochemistry **53**(8): 1003-9.
260. Li, X., Li, H.P., Amsler, K., Hyink, D., Wilson, P.D. and Burrow, C.R. (2002). PRKX, a phylogenetically and functionally distinct cAMP-dependent protein kinase, activates renal epithelial cell migration and morphogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(14): 9260-5.
261. Liliom, K., Orosz, F., Horvath, L. and Ovadi, J. (1991). Quantitative evaluation of indirect ELISA. Effect of calmodulin antagonists on antibody binding to calmodulin. Journal of Immunological Methods **143**(1): 119-25.
262. Lin, S.H. and Lee, J.C. (2002). Communications between the high-affinity cyclic nucleotide binding sites in E. coli cyclic AMP receptor protein: effect of single site mutations. Biochemistry **41**(39): 11857-67.
263. Linder, A.E., McCluskey, L.P., Cole, K.R., 3rd, Lanning, K.M. and Webb, R.C. (2005). Dynamic association of nitric oxide downstream signaling molecules with endothelial caveolin-1 in rat aorta. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **314**(1): 9-15.
264. Lipkin, D., Cook, W.H. and Markham, R. (1959). Adenosine-3':5'-phosphoric acid: a proof of structure. Journal of the American Chemical Society **81**: 6198-6203.
265. Litvin, T.N., Kamenetsky, M., Zarifyan, A., Buck, J. and Levin, L.R. (2003). Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. Journal of Biological Chemistry **278**(18): 15922-6.
266. Luque, I., Gomez, J., Semo, N. and Freire, E. (1998a). Structure-based thermodynamic design of peptide ligands: application to peptide inhibitors of the aspartic protease endothiasepsin. Proteins **30**(1): 74-85.
267. Luque, I., Todd, M.J., Gomez, J., Semo, N. and Freire, E. (1998b). Molecular basis of resistance to HIV-1 protease inhibition: a plausible hypothesis. Biochemistry **37**(17): 5791-7.
268. Luque, I. and Freire, E. (2000). Structural stability of binding sites: consequences for binding affinity and allosteric effects. Proteins Suppl **4**: 63-71.
269. Luque, I. and Freire, E. (2002). Structural parameterization of the binding enthalpy of small ligands. Proteins **49**(2): 181-90.
270. Luttrell, D.K. and Luttrell, L.M. (2003). Signaling in time and space: G protein-coupled receptors and mitogen-activated protein kinases. Assay Drug Dev Technol **1**(2): 327-38.
271. Mackenzie, C.W., 3rd (1982). Bovine lung cyclic GMP-dependent protein kinase exhibits two types of specific cyclic GMP-binding sites. Journal of Biological Chemistry **257**(10): 5589-93.
272. Magde, D., Wong, R. and Seybold, P.G. (2002). Fluorescence quantum yields and their relation to lifetimes of rhodamine 6G and fluorescein in nine solvents: Improved absolute standards for quantum yields. Photochemistry and Photobiology **75**(4): 327-334.
273. Magiera, M.M., Gupta, M., Rundell, C.J., Satish, N., Erns, I. and Yarwood, S.J. (2004). Exchange protein directly activated by cAMP (EPAC) interacts with the light chain (LC) 2 of MAP1A. Biochemical Journal **382**(Pt 3): 803-10.
274. Maier, C.S. and Deinzer, M.L. (2005). Protein conformations, interactions, and H/D exchange. Methods in Enzymology **402**: 312-60.
275. Maldonado, F. and Hanks, S.K. (1988). A cDNA clone encoding human cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit C alpha. Nucleic Acids Res **16**(16): 8189-90.
276. Malmberg, A.B., Brandon, E.P., Idzerda, R.L., Liu, H., McKnight, G.S. and Basbaum, A.I. (1997). Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. Journal of Neuroscience **17**(19): 7462-70.
277. Manning, G., Plowman, G.D., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002a). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. Trends in Biochemical Sciences **27**(10): 514-20.
278. Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002b). The protein kinase complement of the human genome. Science **298**(5600): 1912-34.
279. Martin, A.C. and Cooper, D.M. (2006). Layers of organization of cAMP microdomains in a simple cell. Biochemical Society Transactions **34**(Pt 4): 480-3.
280. Martinovic, S., Veenstra, T.D., Anderson, G.A., Pasatolic, L. and Smith, R.D. (2002). Selective incorporation of isotopically labeled amino acids for identification of intact proteins on a proteome-wide level. Journal of Mass Spectrometry **37**(1): 99-107.
281. McKay, D.B., Weber, I.T. and Steitz, T.A. (1982). Structure of catabolite gene activator protein at 2.9-A resolution. Incorporation of amino acid sequence and interactions with cyclic AMP. Journal of Biological Chemistry **257**(16): 9518-24.
282. McKnight, G.S., Cummings, D.E., Amieux, P.S., Sikorski, M.A., Brandon, E.P., Planas, J.V., Motamed, K. and Idzerda, R.L. (1998). Cyclic AMP, PKA, and the physiological regulation of adiposity. Recent Progress in Hormone Research **53**: 139-59; discussion 160-1.
283. McPhee, I., Gibson, L.C., Kewney, J., Darroch, C., Stevens, P.A., Spinks, D., Cooreman, A. and MacKenzie, S.J. (2005). Cyclic nucleotide signalling: a molecular approach to drug discovery for Alzheimer's disease. Biochemical Society Transactions **33**(Pt 6): 1330-2.
284. Menegon, A., Bonanomi, D., Albertinazzi, C., Lotti, F., Ferrari, G., Kao, H.T., Benfenati, F., Baldelli, P. and Valtorta, F. (2006). Protein kinase A-mediated synapsin I phosphorylation is a central modulator of Ca²⁺-dependent synaptic activity. Journal of Neuroscience **26**(45): 11670-81.
285. Meyer, R.B., Jr., Uno, H., Robins, R.K., Simon, L.N. and Miller, J.P. (1975). 2-substituted derivatives of adenosine and inosine cyclic 3',5'-phosphate. Synthesis, enzymic activity, and analysis of the structural

- requirements of the binding locale of the 2-substituent on bovine brain protein kinase. *Biochemistry* **14**(15): 3315-21.
- 286.** Miles, D.W., Townsend, L.B., Robins, M.J., Robins, R.K., Inskip, W.H. and Eyring, H. (1971). Circular dichroism of nucleoside derivatives. X. Influence of solvents and substituents upon the Cotton effects of guanosine derivatives. *Journal of the American Chemical Society* **93**(7): 1600-8.
- 287.** Montminy, M.R., Gonzalez, G.A. and Yamamoto, K.K. (1990). Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. *Trends in Neurosciences* **13**(5): 184-8.
- 288.** Moorhead, G.B., Trinkle-Mulcahy, L. and Ulke-Lemee, A. (2007). Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(3): 234-44.
- 289.** Morikis, D., Roy, M., Newlon, M.G., Scott, J.D. and Jennings, P.A. (2002). Electrostatic properties of the structure of the docking and dimerization domain of protein kinase A I α . *European Journal of Biochemistry* **269**(8): 2040-51.
- 290.** Mucignat-Caretta, C. and Caretta, A. (1997). Binding of two fluorescent cAMP analogues to type I and II regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1357**(1): 81-90.
- 291.** Mucignat-Caretta, C., Conti, V. and Caretta, A. (1999). cAMP-dependent protein kinase type RI is found in clusters in the rat detergent-insoluble neuronal fraction. *Neuroscience Letters* **273**(1): 1-4.
- 292.** Nagakubo, D., Taira, T., Kitaura, H., Ikeda, M., Tamai, K., Iguchi-Ariga, S.M. and Ariga, H. (1997). DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **231**(2): 509-13.
- 293.** Narayana, N., Diller, T.C., Koide, K., Bunnage, M.E., Nicolaou, K.C., Brunton, L.L., Xuong, N.H., Ten Eyck, L.F. and Taylor, S.S. (1999). Crystal structure of the potent natural product inhibitor balanol in complex with the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* **38**(8): 2367-76.
- 294.** Naula, C., Parsons, M. and Mottram, J.C. (2005). Protein kinases as drug targets in trypanosomes and Leishmania. *Biochimica et Biophysica Acta* **1754**(1-2): 151-9.
- 295.** Neary, C.L., Nesterova, M., Cho, Y.S., Cheadle, C., Becker, K.G. and Cho-Chung, Y.S. (2004). Protein kinase A isozyme switching: eliciting differential cAMP signaling and tumor reversion. *Oncogene* **23**(54): 8847-56.
- 296.** Neitzel, J.J., Dostmann, W.R. and Taylor, S.S. (1991). Role of MgATP in the activation and reassociation of cAMP-dependent protein kinase I: consequences of replacing the essential arginine in cAMP binding site A. *Biochemistry* **30**(3): 733-9.
- 297.** Neubauer, G., King, A., Rappsilber, J., Calvio, C., Watson, M., Ajuh, P., Sleeman, J., Lamond, A. and Mann, M. (1998). Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nature Genetics* **20**(1): 46-50.
- 298.** Newlon, M.G., Roy, M., Morikis, D., Hausken, Z.E., Coghlan, V., Scott, J.D. and Jennings, P.A. (1999). The molecular basis for protein kinase A anchoring revealed by solution NMR. *Nature Structural Biology* **6**(3): 222-7.
- 299.** Newlon, M.G., Roy, M., Morikis, D., Carr, D.W., Westphal, R., Scott, J.D. and Jennings, P.A. (2001). A novel mechanism of PKA anchoring revealed by solution structures of anchoring complexes. *EMBO Journal* **20**(7): 1651-62.
- 300.** Newton, R.P. and Smith, C.J. (2004). Cyclic nucleotides. *Phytochemistry* **65**(17): 2423-37.
- 301.** Niedner, R.H., Buzko, O.V., Haste, N.M., Taylor, A., Gribskov, M. and Taylor, S.S. (2006). Protein kinase resource: an integrated environment for phosphorylation research. *Proteins* **63**(1): 78-86.
- 302.** Nikolaev, V.O. and Lohse, M.J. (2006). Monitoring of cAMP synthesis and degradation in living cells. *Physiology (Bethesda)* **21**: 86-92.
- 303.** Nishimura, T., Ogiwara, A., Fujii, K., Kawakami, T., Kawamura, T., Anyouji, H. and Kato, H. (2005). Disease proteomics toward bedside reality. *Journal of Gastroenterology* **40 Suppl 16**: 7-13.
- 304.** Nolan, M.A., Babcock, D.F., Wennemuth, G., Brown, W., Burton, K.A. and McKnight, G.S. (2004). Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit C α 2 orchestrates cAMP signaling for male fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(37): 13483-13488.
- 305.** O'Brian, C.A., Rocznik, S.O., Bramson, H.N., Baraniak, J., Stec, W.J. and Kaiser, E.T. (1982). A kinetic study of interactions of (Rp)- and (Sp)-adenosine cyclic 3',5'-phosphorothioates with type II bovine cardiac muscle adenosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase. *Biochemistry* **21**(18): 4371-6.
- 306.** Ogez, J.R. and Segel, I.H. (1976). Interaction of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate with protein kinase. Equilibrium binding models. *Journal of Biological Chemistry* **251**(15): 4551-6.
- 307.** Ogreid, D. and Doskeland, S.O. (1981a). The kinetics of the interaction between cyclic AMP and the regulatory moiety of protein kinase II. Evidence for interaction between the binding sites for cyclic AMP. *FEBS Letters* **129**(2): 282-6.
- 308.** Ogreid, D. and Doskeland, S.O. (1981b). The kinetics of association of cyclic AMP to the two types of binding sites associated with protein kinase II from bovine myocardium. *FEBS Letters* **129**(2): 287-92.
- 309.** Ogreid, D., Doskeland, S.O. and Miller, J.P. (1983). Evidence that cyclic nucleotides activating rabbit muscle protein kinase I interact with both types of cAMP binding sites associated with the enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **258**(2): 1041-9.
- 310.** Ogreid, D., Ekanger, R., Suva, R.H., Miller, J.P., Sturm, P., Corbin, J.D. and Doskeland, S.O. (1985). Activation of protein kinase isozymes by cyclic nucleotide analogs used singly or in combination. Principles for optimizing the isozyme specificity of analog combinations. *European Journal of Biochemistry* **150**(1): 219-27.
- 311.** Ogreid, D., Doskeland, S.O., Gorman, K.B. and Steinberg, R.A. (1988). Mutations that prevent cyclic nucleotide binding to binding sites A or B of type I cyclic AMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **263**(33): 17397-404.

- 312.** Ogreid, D., Ekanger, R., Suva, R.H., Miller, J.P. and Doskeland, S.O. (1989). Comparison of the two classes of binding sites (A and B) of type I and type II cyclic-AMP-dependent protein kinases by using cyclic nucleotide analogs. *European Journal of Biochemistry* **181**(1): 19-31.
- 313.** Øgreid, D., Dostmann, W., Genieser, H.G., Niemann, P., Døskeland, S.O. and Jastorff, B. (1994). (Rp)- and (Sp)-8-piperidino-adenosine 3',5'-(cyclic)thiophosphates discriminate completely between site A and B of the regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinase type I and II. *European Journal of Biochemistry* **221**(3): 1089-94.
- 314.** Ohtaka, H., Velazquez-Campoy, A., Xie, D. and Freire, E. (2002). Overcoming drug resistance in HIV-1 chemotherapy: the binding thermodynamics of Amprenavir and TMC-126 to wild-type and drug-resistant mutants of the HIV-1 protease. *Protein Science* **11**(8): 1908-16.
- 315.** Ohtaka, H., Schon, A. and Freire, E. (2003). Multidrug resistance to HIV-1 protease inhibition requires cooperative coupling between distal mutations. *Biochemistry* **42**(46): 13659-66.
- 316.** Oliveria, S.F., Gomez, L.L. and Dell'Acqua, M.L. (2003). Imaging kinase--AKAP79--phosphatase scaffold complexes at the plasma membrane in living cells using FRET microscopy. *Journal of Cell Biology* **160**(1): 101-12.
- 317.** Omori, K. and Kotera, J. (2007). Overview of PDEs and their regulation. *Circulation Research* **100**(3): 309-27.
- 318.** Ong, S.E., Mittler, G. and Mann, M. (2004). Identifying and quantifying in vivo methylation sites by heavy methyl SILAC. *Nat Methods* **1**(2): 119-26.
- 319.** Orosz, F. and Ovadi, J. (2002). A simple method for the determination of dissociation constants by displacement ELISA. *Journal of Immunological Methods* **270**(2): 155-62.
- 320.** Orstavik, S., Reinton, N., Frengen, E., Langeland, B.T., Jahnsen, T. and Skalhegg, B.S. (2001). Identification of novel splice variants of the human catalytic subunit Cbeta of cAMP-dependent protein kinase. *European Journal of Biochemistry* **268**(19): 5066-73.
- 321.** Orstavik, S., Funderud, A., Hafte, T.T., Eikvar, S., Jahnsen, T. and Skalhegg, B.S. (2005). Identification and characterization of novel PKA holoenzymes in human T lymphocytes. *FEBS Journal* **272**(7): 1559-1567.
- 322.** Overington, J.P., Al-Lazikani, B. and Hopkins, A.L. (2006). How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* **5**(12): 993-6.
- 323.** Oyen, O., Myklebust, F., Scott, J.D., Hansson, V. and Jahnsen, T. (1989). Human testis cDNA for the regulatory subunit RII alpha of cAMP-dependent protein kinase encodes an alternate amino-terminal region. *FEBS Letters* **246**(1-2): 57-64.
- 324.** Pankratz, N. and Foroud, T. (2004). Genetics of Parkinson disease. *NeuroRx* **1**(2): 235-42.
- 325.** Pare, G.C., Bauman, A.L., McHenry, M., Michel, J.J., Dodge-Kafka, K.L. and Kapiloff, M.S. (2005). The mA-KAP complex participates in the induction of cardiac myocyte hypertrophy by adrenergic receptor signaling. *Journal of Cell Science* **118**(Pt 23): 5637-46.
- 326.** Parker Botelho, L.H., Webster, L.C., Rothermel, J.D., Baraniak, J. and Stec, W.J. (1988). Inhibition of cAMP-dependent protein kinase by adenosine cyclic 3', 5'-phosphorodithioate, a second cAMP antagonist. *Journal of Biological Chemistry* **263**(11): 5301-5.
- 327.** Parker, P.J. and Parkinson, S.J. (2001). AGC protein kinase phosphorylation and protein kinase C. *Biochemical Society Transactions* **29**(Pt 6): 860-3.
- 328.** Parrish, J.R., Gulyas, K.D. and Finley, R.L., Jr. (2006). Yeast two-hybrid contributions to interactome mapping. *Current Opinion in Biotechnology* **17**(4): 387-93.
- 329.** Passner, J.M. and Steitz, T.A. (1997). The structure of a CAP-DNA complex having two cAMP molecules bound to each monomer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(7): 2843-7.
- 330.** Pawson, T. and Nash, P. (2000). Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes & Development* **14**(9): 1027-47.
- 331.** Pereira, M.E., Segaloff, D.L., Ascoli, M. and Eckstein, F. (1987). Inhibition of choriogonadotropin-activated steroidogenesis in cultured Leydig tumor cells by the Rp diastereoisomer of adenosine 3',5'-cyclic phosphorothioate. *Journal of Biological Chemistry* **262**(13): 6093-100.
- 332.** Petricoin, E.F., Zoon, K.C., Kohn, E.C., Barrett, J.C. and Liotta, L.A. (2002). Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality. *Nat Rev Drug Discov* **1**(9): 683-95.
- 333.** Phizicky, E.M. and Fields, S. (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiological Reviews* **59**(1): 94-123.
- 334.** Pierce, J.D., Fakhari, M., Works, K.V., Pierce, J.T. and Clancy, R.L. (2007). Understanding proteomics. *Nurs Health Sci* **9**(1): 54-60.
- 335.** Pierce, M.M., Raman, C.S. and Nall, B.T. (1999). Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods* **19**(2): 213-21.
- 336.** Planas, J.V., Cummings, D.E., Idzerda, R.L. and McKnight, G.S. (1999). Mutation of the RIIbeta subunit of protein kinase A differentially affects lipolysis but not gene induction in white adipose tissue. *Journal of Biological Chemistry* **274**(51): 36281-7.
- 337.** Porter, S.E., Dwyer-Nield, L.D. and Malkinson, A.M. (2001). Regulation of lung epithelial cell morphology by cAMP-dependent protein kinase type I isozyme. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280**(6): L1282-9.
- 338.** Posner, J.B., Hammermeister, K.E., Bratvold, G.E. and Krebs, E.G. (1964). The Assay of Adenosine-3', 5'-Phosphate in Skeletal Muscle. *Biochemistry* **3**: 1040-4.
- 339.** Posternak, T., Sutherland, E.W. and Henion, W.F. (1962). Derivatives of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate. *Biochimica et Biophysica Acta* **65**: 558-60.
- 340.** Posternak, T. and Weimann, G. (1974). The preparation of acylated derivatives of cyclic nucleotides. *Methods in Enzymology* **38**: 399-409.
- 341.** Potter, R.L., Stafford, P.H. and Taylor, S. (1978). Regulatory subunit of cyclic AMP-dependent protein

- kinase I from porcine skeletal muscle: purification and proteolysis. Archives of Biochemistry and Biophysics **190**(1): 174-80.
- 342.** Prinz, A., Erlbruch, A. and Herberg, F. (2004). Monitoring cAMP dependent protein kinase subunit interaction in intact cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). FASEB Journal **18**: C-159-C160 Suppl. S.
- 343.** Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Guo, H., Jona, G., Breitkreutz, A., Sopko, R., McCartney, R.R., Schmidt, M.C., Rachidi, N., Lee, S.J., Mah, A.S., Meng, L., Stark, M.J., Stern, D.F., De Virgilio, C., Tyers, M., Andrews, B., Gerstein, M., Schweitzer, B., Predki, P.F. and Snyder, M. (2005). Global analysis of protein phosphorylation in yeast. Nature **438**(7068): 679-84.
- 344.** Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. and Seraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. Methods **24**(3): 218-29.
- 345.** Pullman, B. and Saran, A. (1976). Quantum-mechanical studies on the conformation of nucleic acids and their constituents. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology **18**: 215-322.
- 346.** Ramseyer, J., Kaslow, H.R. and Gill, G.N. (1974). Purification of the cAMP receptor protein by affinity chromatography. Biochemical and Biophysical Research Communications **59**(2): 813-21.
- 347.** Ramseyer, J., Kanstein, C.B., Walton, G.M. and Gill, G. (1976). The use of affinity chromatography in purification of cyclic nucleotide receptor proteins. Biochimica et Biophysica Acta **446**(2): 358-70.
- 348.** Rangel-Aldao, R. and Rosen, O.M. (1976). Dissociation and reassociation of the phosphorylated and nonphosphorylated forms of adenosine 3':5' - monophosphate-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. Journal of Biological Chemistry **251**(11): 3375-80.
- 349.** Rangel-Aldao, R. and Rosen, O.M. (1977). Effect of cAMP and ATP on the reassociation of phosphorylated and nonphosphorylated subunits of the cAMP-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. Journal of Biological Chemistry **252**(20): 7140-5.
- 350.** Rannels, S.R. and Corbin, J.D. (1980). Two different intrachain cAMP binding sites of cAMP-dependent protein kinases. Journal of Biological Chemistry **255**(15): 7085-8.
- 351.** Rannels, S.R. and Corbin, J.D. (1981). Studies on the function of the two intrachain cAMP binding sites of protein kinase. Journal of Biological Chemistry **256**(15): 7871-6.
- 352.** Rannels, S.R. and Corbin, J.D. (1983). Using analogs to study selectivity and cooperativity of cyclic nucleotide binding sites. Methods in Enzymology **99**: 168-75.
- 353.** Rannels, S.R., Cobb, C.E., Landiss, L.R. and Corbin, J.D. (1985). The regulatory subunit monomer of cAMP-dependent protein kinase retains the salient kinetic properties of the native dimeric subunit. Journal of Biological Chemistry **260**(6): 3423-30.
- 354.** Rebhan, M., Chalifa-Caspi, V., Prilusky, J. and Lancet, D. (1997) "GeneCards: encyclopedia for genes, proteins and diseases. Weizmann Institute of Science, Bioinformatics Unit and Genome Center." I. (Rehovot. World Wide Web URL: <http://www.genecards.org/>
- 355.** Rehmann, H., Prakash, B., Wolf, E., Rueppel, A., De Rooij, J., Bos, J.L. and Wittinghofer, A. (2003a). Structure and regulation of the cAMP-binding domains of Epac2. Nature Structural Biology **10**(1): 26-32.
- 356.** Rehmann, H., Schwede, F., Doskeland, S.O., Wittinghofer, A. and Bos, J.L. (2003b). Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. Journal of Biological Chemistry **278**(40): 38548-38556.
- 357.** Reimann, E.M., Walsh, D.A. and Krebs, E.G. (1971). Purification and properties of rabbit skeletal muscle adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. Journal of Biological Chemistry **246**(7): 1986-95.
- 358.** Reinton, N., Haugen, T.B., Orstavik, S., Skalhogg, B.S., Hansson, V., Jahnsen, T. and Tasken, K. (1998). The gene encoding the C gamma catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase is a transcribed retroposon. Genomics **49**(2): 290-7.
- 359.** Reinton, N., Collas, P., Haugen, T.B., Skalhogg, B.S., Hansson, V., Jahnsen, T. and Tasken, K. (2000a). Localization of a novel human A-kinase-anchoring protein, hAKAP220, during spermatogenesis. Developmental Biology **223**(1): 194-204.
- 360.** Reinton, N., Orstavik, S., Haugen, T.B., Jahnsen, T., Tasken, K. and Skalhogg, B.S. (2000b). A novel isoform of human cyclic 3',5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase, c alpha-s, localizes to sperm midpiece. Biology of Reproduction **63**(2): 607-11.
- 361.** Rich, R.L. and Myszka, D.G. (2000). Survey of the 1999 surface plasmon resonance biosensor literature. Journal of Molecular Recognition **13**(6): 388-407.
- 362.** Rich, R.L. and Myszka, D.G. (2001a). Survey of the year 2000 commercial optical biosensor literature. Journal of Molecular Recognition **14**(5): 273-94.
- 363.** Rich, R.L. and Myszka, D.G. (2002). Survey of the year 2001 commercial optical biosensor literature. Journal of Molecular Recognition **15**(6): 352-76.
- 364.** Rich, R.L. and Myszka, D.G. (2003). A survey of the year 2002 commercial optical biosensor literature. Journal of Molecular Recognition **16**(6): 351-82.
- 365.** Rich, R.L. and Myszka, D.G. (2005a). Survey of the year 2003 commercial optical biosensor literature. Journal of Molecular Recognition **18**(1): 1-39.
- 366.** Rich, R.L. and Myszka, D.G. (2005b). Survey of the year 2004 commercial optical biosensor literature. Journal of Molecular Recognition **18**(6): 431-78.
- 367.** Rich, R.L. and Myszka, D.G. (2006). Survey of the year 2005 commercial optical biosensor literature. Journal of Molecular Recognition **19**(6): 478-534.
- 368.** Rich, R.L. and Myszka, D.G. (2007). Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis. Analytical Biochemistry **361**(1): 1-6.

- 369.** Rich, T.C., Fagan, K.A., Tse, T.E., Schaack, J., Cooper, D.M. and Karpen, J.W. (2001b). A uniform extracellular stimulus triggers distinct cAMP signals in different compartments of a simple cell. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(23): 13049-54.
- 370.** Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. and Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. Nature Biotechnology **17**(10): 1030-2.
- 371.** Ringheim, G.E. and Taylor, S.S. (1990). Dissecting the domain structure of the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase I and elucidating the role of MgATP. Journal of Biological Chemistry **265**(9): 4800-8.
- 372.** Robidoux, J., Martin, T.L. and Collins, S. (2004). Beta-adrenergic receptors and regulation of energy expenditure: a family affair. Annual Review of Pharmacology and Toxicology **44**: 297-323.
- 373.** Robinson-Steiner, A.M. and Corbin, J.D. (1983). Probable involvement of both intrachain cAMP binding sites in activation of protein kinase. Journal of Biological Chemistry **258**(2): 1032-40.
- 374.** Robison, G.A., Butcher, R.W. and Sutherland, E.W. (1968). Cyclic AMP. Annual Review of Biochemistry **37**: 149-74.
- 375.** Rodbell, M. (1994). Nobel Lecture: Signal transduction: Evolution of an idea.
- 376.** Rodriguez Fernandez, J.L., Geiger, B., Salomon, D. and Ben-Ze'ev, A. (1993). Suppression of vinculin expression by antisense transfection confers changes in cell morphology, motility, and anchorage-dependent growth of 3T3 cells. Journal of Cell Biology **122**(6): 1285-94.
- 377.** Rosen, O.M. and Erlichman, J. (1975). Reversible autophosphorylation of a cyclic 3':5'-AMP-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. Journal of Biological Chemistry **250**(19): 7788-94.
- 378.** Roth, S.E. (2006). Diplomarbeit: Massenspektrometrische Analyse differenziell exprimierter Proteine. Universität Kassel, Fachbereich Naturwissenschaften
- 379.** Rothermel, J.D., Stec, W.J., Baraniak, J., Jastorff, B. and Botelho, L.H. (1983). Inhibition of glycogenolysis in isolated rat hepatocytes by the Rp diastereomer of adenosine cyclic 3',5'-phosphorothioate. Journal of Biological Chemistry **258**(20): 12125-8.
- 380.** Rothermel, J.D., Perillo, N.L., Marks, J.S. and Botelho, L.H. (1984). Effects of the specific cAMP antagonist, (Rp)-adenosine cyclic 3',5'-phosphorothioate, on the cAMP-dependent protein kinase-induced activity of hepatic glycogen phosphorylase and glycogen synthase. Journal of Biological Chemistry **259**(24): 15294-300.
- 381.** Rothermel, J.D. and Parker Botelho, L.H. (1988). A mechanistic and kinetic analysis of the interactions of the diastereoisomers of adenosine 3',5'-(cyclic)phosphorothioate with purified cyclic AMP-dependent protein kinase. Biochemical Journal **251**(3): 757-62.
- 382.** Rudiger, M. (1998). Vinculin and alpha-catenin: shared and unique functions in adherens junctions. BioEssays **20**(9): 733-40.
- 383.** Sachsenmaier, C. (2001). Targeting protein kinases for tumor therapy. Onkologie **24**(4): 346-55.
- 384.** Salamino, F., De Tullio, R., Michetti, M., Mengotti, P., Melloni, E. and Pontremoli, S. (1994). Modulation of calpastatin specificity in rat tissues by reversible phosphorylation and dephosphorylation. Biochemical and Biophysical Research Communications **199**(3): 1326-32.
- 385.** Salinas, E. and Romo, R. (2007). Molecules to remember. Cell **129**(2): 245-7.
- 386.** Sandberg, M., Tasken, K., Oyen, O., Hansson, V. and Jahnsen, T. (1987). Molecular cloning, cDNA structure and deduced amino acid sequence for a type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from human testis. Biochemical and Biophysical Research Communications **149**(3): 939-45.
- 387.** Saraswat, L.D., Filutowicz, M. and Taylor, S.S. (1986). Expression of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in Escherichia coli. Journal of Biological Chemistry **261**(24): 11091-6.
- 388.** Saraswat, L.D., Ringheim, G.E., Bubis, J. and Taylor, S.S. (1988). Deletion mutants as probes for localizing regions of subunit interaction in cAMP-dependent protein kinase. Journal of Biological Chemistry **263**(34): 18241-6.
- 389.** Sastri, M., Barraclough, D.M., Carmichael, P.T. and Taylor, S.S. (2005). A-kinase-interacting protein localizes protein kinase A in the nucleus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(2): 349-54.
- 390.** Schaap, P., van Ments-Cohen, M., Soede, R.D., Brandt, R., Firtel, R.A., Dostmann, W., Genieser, H.G., Jastorff, B. and van Haastert, P.J. (1993). Cell-permeable non-hydrolyzable cAMP derivatives as tools for analysis of signaling pathways controlling gene regulation in Dictyostelium. Journal of Biological Chemistry **268**(9): 6323-31.
- 391.** Schiebel, K., Winkelmann, M., Mertz, A., Xu, X., Page, D.C., Weil, D., Petit, C. and Rappold, G.A. (1997a). Abnormal XY interchange between a novel isolated protein kinase gene, PRKY, and its homologue, PRKX, accounts for one third of all (Y+)XX males and (Y-)XY females. Human Molecular Genetics **6**(11): 1985-9.
- 392.** Schiebel, K., Mertz, A., Winkelmann, M., Glaser, B., Schempp, W. and Rappold, G. (1997b). FISH localization of the human Y-homolog of protein kinase PRKX (PRKY) to Yp11.2 and two pseudogenes to 15q26 and Xq12-->q13. Cytogenetics and Cell Genetics **76**(1-2): 49-52.
- 393.** Schmidt, P.H., Dransfield, D.T., Claudio, J.O., Hawley, R.G., Trotter, K.W., Milgram, S.L. and Goldenring, J.R. (1999). AKAP350, a multiply spliced protein kinase A-anchoring protein associated with centrosomes. Journal of Biological Chemistry **274**(5): 3055-66.
- 394.** Scholten, A., Poh, M.K., van Veen, T.A., van Breukelen, B., Vos, M.A. and Heck, A.J. (2006). Analysis of the cGMP/cAMP interactome using a chemical proteomics approach in mammalian heart tissue validates sphingosine kinase type 1-interacting protein as a genuine

- and highly abundant AKAP. *J Proteome Res* **5**(6): 1435-47.
- 395.** Scholten, A., Veen, T.A., Vos, M.A. and Heck, A.J. (2007). Diversity of cAMP-Dependent Protein Kinase Isoforms and Their Anchoring Proteins in Mouse Ventricular Tissue. *J Proteome Res* **6**(5): 1705-1717.
- 396.** Schreyer, S.A., Cummings, D.E., McKnight, G.S. and LeBoeuf, R.C. (2001). Mutation of the RIIbeta subunit of protein kinase A prevents diet-induced insulin resistance and dyslipidemia in mice. *Diabetes* **50**(11): 2555-62.
- 397.** Schultz, C., Vajanaphanich, M., Harootunian, A.T., Sammak, P.J., Barrett, K.E. and Tsien, R.Y. (1993). Acetoxymethyl esters of phosphates, enhancement of the permeability and potency of cAMP. *Journal of Biological Chemistry* **268**(9): 6316-22.
- 398.** Schumacher, J.A., Crockett, D.K., Elenitoba-Johnson, K.S. and Lim, M.S. (2007). Evaluation of enrichment techniques for mass spectrometry: identification of tyrosine phosphoproteins in cancer cells. *J Mol Diagn* **9**(2): 169-77.
- 399.** Schwede, F., Maronde, E., Genieser, H. and Jastorff, B. (2000a). Cyclic nucleotide analogs as biochemical tools and prospective drugs. *Pharmacology & Therapeutics* **87**(2-3): 199-226.
- 400.** Schwede, F., Christensen, A., Liauw, S., Hippe, T., Kopperud, R., Jastorff, B. and Doskeland, S.O. (2000b). 8-Substituted cAMP analogues reveal marked differences in adaptability, hydrogen bonding, and charge accommodation between homologous binding sites (AI/AII and BI/BII) in cAMP kinase I and II. *Biochemistry* **39**(30): 8803-12.
- 401.** Schweitzer, B., Predki, P. and Snyder, M. (2003). Microarrays to characterize protein interactions on a whole-proteome scale. *Proteomics* **3**(11): 2190-9.
- 402.** Scott, J.D., Glaccum, M.B., Zoller, M.J., Uhler, M.D., Helfman, D.M., McKnight, G.S. and Krebs, E.G. (1987). The molecular cloning of a type II regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase from rat skeletal muscle and mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**(15): 5192-6.
- 403.** Scott, J.D., Stofko, R.E., McDonald, J.R., Comer, J.D., Vitalis, E.A. and Mangili, J.A. (1990). Type II regulatory subunit dimerization determines the subcellular localization of the cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **265**(35): 21561-6.
- 404.** Sebolt-Leopold, J.S. and Herrera, R. (2004). Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer* **4**(12): 937-47.
- 405.** Selbach, M. and Mann, M. (2006). Protein interaction screening by quantitative immunoprecipitation combined with knockdown (QUICK). *Nat Methods* **3**(12): 981-3.
- 406.** Semizarov, D., Glesne, D., Laouar, A., Schiebel, K. and Huberman, E. (1998). A lineage-specific protein kinase crucial for myeloid maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(26): 15412-7.
- 407.** Shabb, J.B., Ng, L. and Corbin, J.D. (1990). One amino acid change produces a high affinity cGMP-binding site in cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **265**(27): 16031-4.
- 408.** Shabb, J.B., Buzzeo, B.D., Ng, L. and Corbin, J.D. (1991). Mutating protein kinase cAMP-binding sites into cGMP-binding sites. Mechanism of cGMP selectivity. *Journal of Biological Chemistry* **266**(36): 24320-6.
- 409.** Shabb, J.B. and Corbin, J.D. (1992). Cyclic nucleotide-binding domains in proteins having diverse functions. *Journal of Biological Chemistry* **267**(9): 5723-5726.
- 410.** Shabb, J.B. (2001). Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. *Chemical Reviews* **101**(8): 2381-411.
- 411.** Shaywitz, A.J., Dove, S.L., Greenberg, M.E. and Hochschild, A. (2002). Analysis of phosphorylation-dependent protein-protein interactions using a bacterial two-hybrid system. *Sci STKE* **2002**(142): PL11.
- 412.** Shoji, S., Parmelee, D.C., Wade, R.D., Kumar, S., Ericsson, L.H., Walsh, K.A., Neurath, H., Long, G.L., Demaille, J.G., Fischer, E.H. and Titani, K. (1981). Complete amino acid sequence of the catalytic subunit of bovine cardiac muscle cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**(2): 848-51.
- 413.** Shoji, S., Ericsson, L.H., Walsh, K.A., Fischer, E.H. and Titani, K. (1983). Amino acid sequence of the catalytic subunit of bovine type II adenosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase. *Biochemistry* **22**(15): 3702-9.
- 414.** Showers, M.O. and Maurer, R.A. (1986). A cloned bovine cDNA encodes an alternate form of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **261**(35): 16288-91.
- 415.** Sigurskjold, B.W., Berland, C.R. and Svensson, B. (1994). Thermodynamics of inhibitor binding to the catalytic site of glucoamylase from *Aspergillus niger* determined by displacement titration calorimetry. *Biochemistry* **33**(33): 10191-9.
- 416.** Sigurskjold, B.W. (2000). Exact analysis of competition ligand binding by displacement isothermal titration calorimetry. *Anal Biochem* **277**(2): 260-6.
- 417.** Sinclair, M.L., Wang, X.Y., Mattia, M., Conti, M., Buck, J., Wolgemuth, D.J. and Levin, L.R. (2000). Specific expression of soluble adenylyl cyclase in male germ cells. *Molecular Reproduction and Development* **56**(1): 6-11.
- 418.** Skälhegg, B.S. and Tasken, K. (2000). Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Frontiers in Bioscience* **5**: D678-93.
- 419.** Slepnev, V.I., Ochoa, G.C., Butler, M.H., Grabs, D. and De Camilli, P. (1998). Role of phosphorylation in regulation of the assembly of endocytic coat complexes. *Science (New York, N.Y.)* **281**(5378): 821-4.
- 420.** Smith, F.D., Langeberg, L.K. and Scott, J.D. (2006). The where's and when's of kinase anchoring. *Trends in Biochemical Sciences* **31**(6): 316-23.
- 421.** Snel, B., Lehmann, G., Bork, P. and Huynen, M.A. (2000). STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic Acids Res* **28**(18): 3442-4.
- 422.** Solberg, R., Tasken, K., Keiserud, A. and Jahnsen, T. (1991). Molecular cloning, cDNA structure and tissue-

specific expression of the human regulatory subunit RI beta of cAMP-dependent protein kinases. Biochemical and Biophysical Research Communications **176**(1): 166-72.

423. Solberg, R., Sistonen, P., Traskelin, A.L., Berube, D., Simard, J., Krajci, P., Jahnsen, T. and de la Chapelle, A. (1992). Mapping of the regulatory subunits RI beta and RII beta of cAMP-dependent protein kinase genes on human chromosome 7. Genomics **14**(1): 63-9.

424. Solberg, R., Tasken, K., Wen, W., Coghlan, V.M., Meinkoth, J.L., Scott, J.D., Jahnsen, T. and Taylor, S.S. (1994). Human regulatory subunit RI beta of cAMP-dependent protein kinases: expression, holoenzyme formation and microinjection into living cells. Experimental Cell Research **214**(2): 595-605.

425. Sorol, M.R., Pastori, R.L., Muro, A., Moreno, S. and Rossi, S. (2000). Structural and functional analysis of the cAMP binding domain from the regulatory subunit of Mucor rouxii protein kinase A. Archives of Biochemistry and Biophysics **382**(2): 173-181.

426. Sportsman, J.R., Daijo, J. and Gaudet, E.A. (2003). Fluorescence polarization assays in signal transduction discovery. Comb Chem High Throughput Screen **6**(3): 195-200.

427. Steinberg, R.A., O'Farrell, P.H., Friedrich, U. and Coffino, P. (1977). Mutations causing charge alterations in regulatory subunits of the cAMP-dependent protein kinase of cultured S49 lymphoma cells. Cell **10**(3): 381-91.

428. Steinberg, R.A., Russell, J.L., Murphy, C.S. and Yphantis, D.A. (1987a). Activation of type I cyclic AMP-dependent protein kinases with defective cyclic AMP-binding sites. Journal of Biological Chemistry **262**(6): 2664-71.

429. Steinberg, R.A., Murphy, C.S., Russell, J.L. and Gorman, K.B. (1987b). Cyclic AMP-resistant mutants of S49 mouse lymphoma cells hemizygous for expression of regulatory subunit of type I cyclic AMP-dependent protein kinase. Somatic Cell and Molecular Genetics **13**(6): 645-59.

430. Steinberg, R.A., Gorman, K.B., Øgreid, D., Døskeland, S.O. and Weber, I.T. (1991). Mutations that alter the charge of type I regulatory subunit and modify activation properties of cyclic AMP-dependent protein kinase from S49 mouse lymphoma cells. Journal of Biological Chemistry **266**(6): 3547-53.

431. Steinberg, R.A. and Gorman, K.B. (1992). Linked spontaneous CG----TA mutations at CpG sites in the gene for protein kinase regulatory subunit. Molecular and Cellular Biology **12**(2): 767-72.

432. Stelzl, U. and Wanker, E.E. (2006). The value of high quality protein-protein interaction networks for systems biology. Current Opinion in Chemical Biology **10**(6): 551-8.

433. Stoll, D., Templin, M.F., Schrenk, M., Traub, P.C., Vohringer, C.F. and Joos, T.O. (2002). Protein microarray technology. Frontiers in Bioscience **7**: c13-32.

434. Stratakis, C.A. and Cho-Chung, Y.S. (2002). Protein kinase A and human disease. Trends Endocrinol Metab **13**(2): 50-2.

435. Stryer, L. and Haugland, R.P. (1967). Energy transfer: a spectroscopic ruler. Proceedings of the National

Academy of Sciences of the United States of America **58**(2): 719-26.

436. Stryer, L. (1978). Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. Annual Review of Biochemistry **47**: 819-46.

437. Su, Y., Taylor, S.S., Dostmann, W.R., Xuong, N.H. and Varughese, K.I. (1993). Crystallization of a deletion mutant of the R-subunit of cAMP dependent protein kinase. Journal of Molecular Biology **230**(3): 1091-1093.

438. Su, Y., Dostmann, W.R., Herberg, F.W., Durick, K., Xuong, N.H., Ten Eyck, L., Taylor, S.S. and Varughese, K.I. (1995). Regulatory subunit of protein kinase A: structure of deletion mutant with cAMP binding domains. Science **269**(5225): 807-13.

439. Sutherland, E.W. (1971). Nobel Lecture: Studies on the mechanism of hormone action.

440. Sutherland, E.W. (1972). Studies on the mechanism of hormone action. Science **177**(47): 401-8.

441. Svensson, C., Teneberg, S., Nilsson, C.L., Kjellberg, A., Schwarz, F.P., Sharon, N. and Krenzel, U. (2002). High-resolution crystal structures of Erythrina cristagalli lectin in complex with lactose and 2'-alpha-L-fucosyllactose and correlation with thermodynamic binding data. Journal of Molecular Biology **321**(1): 69-83.

442. Symcox, M.M., Cauthron, R.D., Øgreid, D. and Steinberg, R.A. (1994). Arg-242 is necessary for allosteric coupling of cyclic AMP-binding sites A and B of RI subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. Journal of Biological Chemistry **269**(37): 23025-23031.

443. Szucs, K., Sagi, G. and Vereb, G. (1992). Effect of some new cAMP analogs on cAMP-dependent protein kinase isoenzymes. International Journal of Biochemistry **24**(6): 915-21.

444. Takio, K., Smith, S.B., Krebs, E.G., Walsh, K.A. and Titani, K. (1984). Amino acid sequence of the regulatory subunit of bovine type II adenosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase. Biochemistry **23**(18): 4200-6.

445. Tame, J.R.H., O'Brian, R. and Ladbury, J.E. (1998). Isothermal titration Calorimetry of Biomolecules. Biocalorimetry: Applications of Calorimetry in the Biological Science. J. E. Ladbury and B. Z. Chowdhry: 27-38.

446. Tao, M., Salas, M.L. and Lipmann, F. (1970). Mechanism of activation by adenosine 3':5'-cyclic monophosphate of a protein phosphokinase from rabbit reticulocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **67**(1): 408-14.

447. Tasken, K., Skalhegg, B.S., Solberg, R., Andersson, K.B., Taylor, S.S., Lea, T., Blomhoff, H.K., Jahnsen, T. and Hansson, V. (1993). Novel isozymes of cAMP-dependent protein kinase exist in human cells due to formation of RI alpha-RI beta heterodimeric complexes. Journal of Biological Chemistry **268**(28): 21276-83.

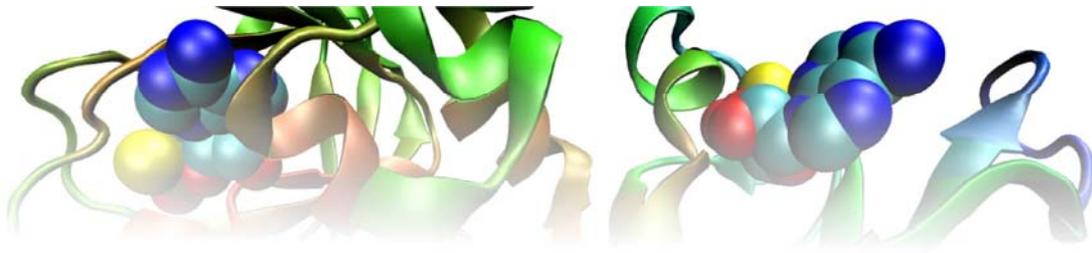
448. Tasken, K., Skalhegg, B.S., Tasken, K.A., Solberg, R., Knutsen, H.K., Levy, F.O., Sandberg, M., Orstavik, S., Larsen, T., Johansen, A.K., Vang, T., Schrader, H.P., Reinton, N.T., Torgersen, K.M., Hansson, V. and Jahnsen, T. (1997). Structure, function, and regulation of human cAMP-dependent protein kinases. Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research **31**: 191-204.

- 449.** Tasken, K., Ruppelt, A., Shabb, J. and Carlson, C.R. (2003). Physiological substrates of PKA and PKG. Handbook of cell signalling. R. A. Bradshaw and E. A. Dennis. San Diego, Academic Press. **2**: Chapter 230, 501-510.
- 450.** Tasken, K. and Aandahl, E.M. (2004). Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. Physiological Reviews **84**(1): 137-167.
- 451.** Taussig, R. and Gilman, A.G. (1995). Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. Journal of Biological Chemistry **270**(1): 1-4.
- 452.** Taylor, S.S., Yang, J., Wu, J., Haste, N.M., Radzio-Andzelm, E. and Anand, G. (2004). PKA: a portrait of protein kinase dynamics. Biochimica et Biophysica Acta **1697**(1-2): 259-269.
- 453.** Taylor, S.S., Kim, C., Vigil, D., Haste, N.M., Yang, J., Wu, J. and Anand, G.S. (2005). Dynamics of signaling by PKA. Biochimica et Biophysica Acta **1754**(1-2): 25-37.
- 454.** Taylor, S.S. and Ghosh, G. (2006). Protein kinases: Catalysis and regulation. Current Opinion in Structural Biology **16**: 665-667.
- 455.** Templin, M.F., Stoll, D., Schrenk, M., Traub, P.C., Vohringer, C.F. and Joos, T.O. (2002a). Protein microarray technology. Trends in Biotechnology **20**(4): 160-6.
- 456.** Templin, M.F., Stoll, D., Schrenk, M., Traub, P.C., Vohringer, C.F. and Joos, T.O. (2002b). Protein microarray technology. Drug Discovery Today **7**(15): 815-22.
- 457.** Templin, M.F., Stoll, D., Schwenk, J.M., Potz, O., Kramer, S. and Joos, T.O. (2003). Protein microarrays: promising tools for proteomic research. Proteomics **3**(11): 2155-66.
- 458.** Theurkauf, W.E. and Vallee, R.B. (1982). Molecular characterization of the cAMP-dependent protein kinase bound to microtubule-associated protein 2. Journal of Biological Chemistry **257**(6): 3284-90.
- 459.** Thiele, T.E., Willis, B., Stadler, J., Reynolds, J.G., Bernstein, I.L. and McKnight, G.S. (2000). High ethanol consumption and low sensitivity to ethanol-induced sedation in protein kinase A-mutant mice. Journal of Neuroscience **20**(10): RC75.
- 460.** Tholey, A., Pipkorn, R., Bossemeyer, D., Kinzel, V. and Reed, J. (2001). Influence of myristoylation, phosphorylation, and deamidation on the structural behavior of the N-terminus of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. Biochemistry **40**(1): 225-31.
- 461.** Thomis, D.C., Floyd-Smith, G. and Samuel, C.E. (1992). Mechanism of interferon action. cDNA structure and regulation of a novel splice-site variant of the catalytic subunit of human protein kinase A from interferon-treated human cells. Journal of Biological Chemistry **267**(15): 10723-8.
- 462.** Thullner, S., Gesellchen, F., Wiemann, S., Pyerin, W., Kinzel, V. and Bossemeyer, D. (2000). The protein kinase A catalytic subunit Cbeta2: molecular characterization and distribution of the splice variant. Biochemical Journal **351**(Pt 1): 123-32.
- 463.** Titani, K., Sasagawa, T., Ericsson, L.H., Kumar, S., Smith, S.B., Krebs, E.G. and Walsh, K.A. (1984). Amino acid sequence of the regulatory subunit of bovine type I adenosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase. Biochemistry **23**(18): 4193-9.
- 464.** Torreri, P., Ceccarini, M., Macioce, P. and Petrucci, T.C. (2005). Biomolecular interactions by Surface Plasmon Resonance technology. Annali dell Istituto Superiore di Sanita **41**(4): 437-41.
- 465.** Tortora, G. and Ciardiello, F. (2000). Targeting of epidermal growth factor receptor and protein kinase A: molecular basis and therapeutic applications. Annals of Oncology **11**(7): 777-83.
- 466.** Tortora, G. and Ciardiello, F. (2002). Protein kinase A type I: a target for cancer therapy. Clinical Cancer Research **8**(2): 303-4.
- 467.** Traincard, F., Giacomoni, V. and Veron, M. (2004). Specific inhibition of AGC protein kinases by antibodies against C-terminal epitopes. FEBS Letters **572**(1-3): 276-80.
- 468.** Tribl, F., Marcus, K., Bringmann, G., Meyer, H.E., Gerlach, M. and Riederer, P. (2006). Proteomics of the human brain: sub-proteomes might hold the key to handle brain complexity. Journal of Neural Transmission **113**(8): 1041-54.
- 469.** Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S. and Rothberg, J.M. (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. Nature **403**(6770): 623-7.
- 470.** Uhler, M.D., Chrivia, J.C. and McKnight, G.S. (1986a). Evidence for a second isoform of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. Journal of Biological Chemistry **261**(33): 15360-3.
- 471.** Uhler, M.D., Carmichael, D.F., Lee, D.C., Chrivia, J.C., Krebs, E.G. and McKnight, G.S. (1986b). Isolation of cDNA clones coding for the catalytic subunit of mouse cAMP-dependent protein kinase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **83**(5): 1300-4.
- 472.** Ullman, E.F., Kirakossian, H., Singh, S., Wu, Z.P., Irvin, B.R., Pease, J.S., Switchenko, A.C., Irvine, J.D., Dafforn, A. and Skold, C.N. (1994). Luminescent oxygen channeling immunoassay: measurement of particle binding kinetics by chemiluminescence. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(12): 5426-30.
- 473.** Unfricht, D.W., Colpitts, S.L., Fernandez, S.M. and Lynes, M.A. (2005). Grating-coupled surface plasmon resonance: a cell and protein microarray platform. Proteomics **5**(17): 4432-42.
- 474.** Uno, H., Meyer, R.B., Shuman, D.A., Robins, R.K., Simon, L.N. and Miller, J.P. (1976). Synthesis of some 1, 8- and 2, 8-disubstituted derivatives of adenosine cyclic 3', 5'-phosphate and their interaction with some enzymes of cAMP metabolism. Journal of Medicinal Chemistry **19**(3): 419-22.
- 475.** Uno, I., Ueda, T. and Greengard, P. (1977). Adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein

- system of neuronal membranes. II. Solubilization, purification, and some properties of an endogenous adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. Journal of Biological Chemistry **252**(14): 5164-74.
- 476.** Usui-Aoki, K., Shimada, K., Nagano, M., Kawai, M. and Koga, H. (2005). A novel approach to protein expression profiling using antibody microarrays combined with surface plasmon resonance technology. Proteomics **5**(9): 2396-401.
- 477.** Vallee, R.B., DiBartolomeis, M.J. and Theurkauf, W.E. (1981). A protein kinase bound to the projection portion of MAP 2 (microtubule-associated protein 2). Journal of Cell Biology **90**(3): 568-76.
- 478.** van Duijn, C.M., Dekker, M.C., Bonifati, V., Galjaard, R.J., Houwing-Duistermaat, J.J., Snijders, P.J., Testers, L., Breedveld, G.J., Horstink, M., Sandkuijl, L.A., van Swieten, J.C., Oostra, B.A. and Heutink, P. (2001). Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. American Journal of Human Genetics **69**(3): 629-34.
- 479.** Van Haastert, P.J., Van Driel, R., Jastorff, B., Baraniak, J., Stec, W.J. and De Wit, R.J. (1984). Competitive cAMP antagonists for cAMP-receptor proteins. Journal of Biological Chemistry **259**(16): 10020-4.
- 480.** Vandecasteele, G., Rochais, F., Abi-Gerges, A. and Fischmeister, R. (2006). Functional localization of cAMP signalling in cardiac myocytes. Biochemical Society Transactions **34**(Pt 4): 484-8.
- 481.** Velazquez Campoy, A. and Freire, E. (2005). ITC in the post-genomic era...? Priceless. Biophysical Chemistry **115**(2-3): 115-24.
- 482.** Verde, I., Pahlke, G., Salanova, M., Zhang, G., Wang, S., Coletti, D., Onuffer, J., Jin, S.L. and Conti, M. (2001). Myomegalin is a novel protein of the golgi/centrosome that interacts with a cyclic nucleotide phosphodiesterase. Journal of Biological Chemistry **276**(14): 11189-98.
- 483.** Veron, M., Radzio-Andzelm, E., Tsigelny, I., Ten Eyck, L.F. and Taylor, S.S. (1993). A conserved helix motif complements the protein kinase core. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(22): 10618-22.
- 484.** Vetter, I.R. and Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. Science **294**(5545): 1299-304.
- 485.** Vigil, D., Blumenthal, D.K., Brown, S., Taylor, S.S. and Trewella, J. (2004). Differential effects of substrate on type I and type II PKA holoenzyme dissociation. Biochemistry **43**(19): 5629-5636.
- 486.** Vigil, D., Lin, J.H., Sottriffer, C.A., Pennypacker, J.K., McCammon, J.A. and Taylor, S.S. (2006). A simple electrostatic switch important in the activation of type I protein kinase A by cyclic AMP. Protein Science **15**: 113-121.
- 487.** von Mering, C., Huynen, M., Jaeggi, D., Schmidt, S., Bork, P. and Snel, B. (2003). STRING: a database of predicted functional associations between proteins. Nucleic Acids Res **31**(1): 258-61.
- 488.** von Mering, C., Jensen, L.J., Snel, B., Hooper, S.D., Krupp, M., Foglierini, M., Jouffre, N., Huynen, M.A. and Bork, P. (2005). STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. Nucleic Acids Res **33**(Database issue): D433-7.
- 489.** von Mering, C., Jensen, L.J., Kuhn, M., Chaffron, S., Doerks, T., Kruger, B., Snel, B. and Bork, P. (2007). STRING 7--recent developments in the integration and prediction of protein interactions. Nucleic Acids Res **35**(Database issue): D358-62.
- 490.** Wales, T.E. and Engen, J.R. (2006). Hydrogen exchange mass spectrometry for the analysis of protein dynamics. Mass Spectrometry Reviews **25**(1): 158-70.
- 491.** Walsh, D.A., Ashby, C.D., Gonzalez, C., Calkins, D., Fischer, E.H. and Krebs, E.G. (1971). Purification and characterization of a protein inhibitor of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. Journal of Biological Chemistry **246**(7): 1977-85.
- 492.** Wang, L., Sunahara, R.K., Krumins, A., Perkins, G., Crochiere, M.L., Mackey, M., Bell, S., Ellisman, M.H. and Taylor, S.S. (2001). Cloning and mitochondrial localization of full-length D-AKAP2, a protein kinase A anchoring protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(6): 3220-5.
- 493.** Wang, M., Ramos, B.P., Paspalas, C.D., Shu, Y., Simen, A., Duque, A., Vijayraghavan, S., Brennan, A., Dudley, A., Nou, E., Mazer, J.A., McCormick, D.A. and Arnsten, A.F. (2007). alpha2A-Adrenoceptors Strengthen Working Memory Networks by Inhibiting cAMP-HCN Channel Signaling in Prefrontal Cortex. Cell **129**(2): 397-410.
- 494.** Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S.J. and Qin, J. (2000). BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. Genes & Development **14**(8): 927-39.
- 495.** Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins, M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L. and Humphery-Smith, I. (1995). Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. Electrophoresis **16**(7): 1090-4.
- 496.** Wassaf, D., Kuang, G., Kopacz, K., Wu, Q.L., Nguyen, Q., Toews, M., Cosic, J., Jacques, J., Wiltshire, S., Lambert, J., Pazmany, C.C., Hogan, S., Ladner, R.C., Nixon, A.E. and Sexton, D.J. (2006). High-throughput affinity ranking of antibodies using surface plasmon resonance microarrays. Analytical Biochemistry **351**(2): 241-53.
- 497.** Weber, I.T. and Steitz, T.A. (1987a). Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5 Å resolution. Journal of Molecular Biology **198**(2): 311-326.
- 498.** Weber, I.T., Steitz, T.A., Bubis, J. and Taylor, S.S. (1987b). Predicted structures of cAMP binding domains of type I and II regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinase. Biochemistry **26**(2): 343-351.
- 499.** Weber, I.T., Shabb, J.B. and Corbin, J.D. (1989). Predicted structures of the cGMP binding domains of the cGMP-dependent protein kinase: a key alanine/threonine difference in evolutionary divergence of cAMP and cGMP binding sites. Biochemistry **28**(14): 6122-7.

- 500.** Weber, P.C. and Salemme, F.R. (2003). Applications of calorimetric methods to drug discovery and the study of protein interactions. Current Opinion in Structural Biology **13**(1): 115-21.
- 501.** Wen, W., Meinkoth, J.L., Tsien, R.Y. and Taylor, S.S. (1995a). Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. Cell **82**(3): 463-73.
- 502.** Wen, W., Taylor, S.S. and Meinkoth, J.L. (1995b). The expression and intracellular distribution of the heat-stable protein kinase inhibitor is cell cycle regulated. Journal of Biological Chemistry **270**(5): 2041-6.
- 503.** Westermeier, R. and Marouga, R. (2005). Protein detection methods in proteomics research. Bioscience Reports **25**(1-2): 19-32.
- 504.** Whitesides, G.M. and Krishnamurthy, V.M. (2006). Designing ligands to bind proteins. Quarterly Reviews of Biophysics: 1-11.
- 505.** Wiemann, S., Kinzel, V. and Pyerin, W. (1991). Isoform C beta 2, an unusual form of the bovine catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. Journal of Biological Chemistry **266**(8): 5140-6.
- 506.** Wilchek, M., Salomon, Y., Lowe, M. and Selinger, Z. (1971). Conversion of protein kinase to a cyclic AMP independent form by affinity chromatography on N 6 - caproyl 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-sepharose. Biochemical and Biophysical Research Communications **45**(5): 1177-84.
- 507.** Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F. and Williams, K.L. (1996). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews **13**: 19-50.
- 508.** Winder, D.G. and Sweatt, J.D. (2001). Roles of serine/threonine phosphatases in hippocampal synaptic plasticity. Nat Rev Neurosci **2**(7): 461-74.
- 509.** Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F. and Lin, L.N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. Analytical Biochemistry **179**(1): 131-7.
- 510.** Wong, W. and Scott, J.D. (2004). AKAP signalling complexes: focal points in space and time. Nat Rev Mol Cell Biol **5**(12): 959-70.
- 511.** Woo, N.H., Duffy, S.N., Abel, T. and Nguyen, P.V. (2000). Genetic and pharmacological demonstration of differential recruitment of cAMP-dependent protein kinases by synaptic activity. Journal of Neurophysiology **84**(6): 2739-45.
- 512.** Woo, N.H., Duffy, S.N., Abel, T. and Nguyen, P.V. (2003). Temporal spacing of synaptic stimulation critically modulates the dependence of LTP on cyclic AMP-dependent protein kinase. Hippocampus **13**(2): 293-300.
- 513.** Woodford, T.A., Correll, L.A., McKnight, G.S. and Corbin, J.D. (1989). Expression and characterization of mutant forms of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. The effect of defective cAMP binding on holoenzyme activation. Journal of Biological Chemistry **264**(22): 13321-8.
- 514.** Wu, J., Jones, J.M., Xuong, N.H., Eyck, L.F. and Taylor, S.S. (2004a). Crystal structures of R1alpha subunit of cyclic adenosine 5'-monophosphate (cAMP)-dependent protein kinase complexed with (R(p))-adenosine 3',5'-cyclic monophosphothioate and (S(p))-adenosine 3',5'-cyclic monophosphothioate, the phosphothioate analogues of cAMP. Biochemistry **43**(21): 6620-6629.
- 515.** Wu, J., Brown, S., Xuong, N.H. and Taylor, S.S. (2004b). R1alpha subunit of PKA; a cAMP-free structure reveals a hydrophobic capping mechanism for docking cAMP into site B. Structure (Camb) **12**(6): 1056-1064.
- 516.** Wu, W.W., Wang, G., Baek, S.J. and Shen, R.F. (2006). Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF. J Proteome Res **5**(3): 651-8.
- 517.** Xia, Y., Yu, H., Jansen, R., Sringhaus, M., Baxter, S., Greenbaum, D., Zhao, H. and Gerstein, M. (2004). Analyzing cellular biochemistry in terms of molecular networks. Annual Review of Biochemistry **73**: 1051-87.
- 518.** Xu, R.X., Rocque, W.J., Lambert, M.H., Vanderwall, D.E., Luther, M.A. and Nolte, R.T. (2004). Crystal structures of the catalytic domain of phosphodiesterase 4B complexed with AMP, 8-Br-AMP, and rolipram. Journal of Molecular Biology **337**(2): 355-65.
- 519.** Yagura, T.S., Sigman, C.C., Sturm, P.A., Reist, E.J., Johnson, H.L. and Miller, J.P. (1980). Mapping cyclic AMP binding sites on type I and type II cyclic AMP-dependent protein kinases using 2-substituted derivatives of cyclic AMP. Biochemical and Biophysical Research Communications **92**(2): 463-7.
- 520.** Yagura, T.S. and Miller, J.P. (1981). Mapping adenosine cyclic 3',5'-phosphate binding sites on type I and type II adenosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinases using ribose ring and cyclic phosphate ring analogues of adenosine cyclic 3',5'-phosphate. Biochemistry **20**(4): 879-87.
- 521.** Yang, S., Fletcher, W.H. and Johnson, D.A. (1995). Regulation of cAMP-dependent protein kinase: enzyme activation without dissociation. Biochemistry **34**(19): 6267-71.
- 522.** Yarwood, S.J. (2005). Microtubule-associated proteins (MAPs) regulate cAMP signalling through exchange protein directly activated by cAMP (EPAC). Biochemical Society Transactions **33**(Pt 6): 1327-9.
- 523.** Yathindra, N. and Sundaralingam, M. (1974). Conformations of cyclic 3',5'-nucleotides. Effect of the base on the synanti conformer distribution. Biochemical and Biophysical Research Communications **56**(1): 119-26.
- 524.** Yun, C.H., Lamprecht, G., Forster, D.V. and Sidor, A. (1998). NHE3 kinase A regulatory protein E3KARP binds the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 and the cytoskeletal protein ezrin. Journal of Biological Chemistry **273**(40): 25856-63.
- 525.** Zaccolo, M., De Giorgi, F., Cho, C.Y., Feng, L., Knapp, T., Negulescu, P.A., Taylor, S.S., Tsien, R.Y. and Pozzan, T. (2000). A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells. Nat Cell Biol **2**(1): 25-9.
- 526.** Zaccolo, M. and Pozzan, T. (2002). Discrete microdomains with high concentration of cAMP in

- stimulated rat neonatal cardiac myocytes. Science **295**(5560): 1711-5.
- 527.** Zagotta, W.N., Olivier, N.B., Black, K.D., Young, E.C., Olson, R. and Gouaux, E. (2003). Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. Nature **425**(6954): 200-5.
- 528.** Zawadzki, K.M., Hamuro, Y., Kim, J.S., Garrod, S., Stranz, D.D., Taylor, S.S. and Woods, V.L., Jr. (2003). Dissecting interdomain communication within cAPK regulatory subunit type IIbeta using enhanced amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry (DXMS). Protein Science **12**(9): 1980-90.
- 529.** Zawadzki, K.M. and Taylor, S.S. (2004). cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit type IIbeta: active site mutations define an isoform-specific network for allosteric signaling by cAMP. Journal of Biological Chemistry **279**(8): 7029-36.
- 530.** Zeder-Lutz, G., Zuber, E., Witz, J. and Van Regenmortel, M.H. (1997). Thermodynamic analysis of antigen-antibody binding using biosensor measurements at different temperatures. Anal Biochem **246**(1): 123-32.
- 531.** Zetterqvist, O., Ragnarsson, U., Humble, E., Berglund, L. and Engstrom, L. (1976). The minimum substrate of cyclic AMP-stimulated protein kinase, as studied by synthetic peptides representing the phosphorylatable site of pyruvate kinase (type L) of rat liver. Biochemical and Biophysical Research Communications **70**(3): 696-703.
- 532.** Zhang, J., Ma, Y., Taylor, S.S. and Tsien, R.Y. (2001). Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(26): 14997-5002.
- 533.** Zhang, W., Morris, G.Z. and Beebe, S.J. (2004). Characterization of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit Cgamma expressed and purified from sf9 cells. Protein Expression and Purification **35**(1): 156-69.
- 534.** Zhang, Y.L. and Zhang, Z.Y. (1998). Low-affinity binding determined by titration calorimetry using a high-affinity coupling ligand: a thermodynamic study of ligand binding to protein tyrosine phosphatase 1B. Analytical Biochemistry **261**(2): 139-48.
- 535.** Zheng, J., Knighton, D.R., Xuong, N.H., Taylor, S.S., Sowadski, J.M. and Ten Eyck, L.F. (1993). Crystal structures of the myristylated catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase reveal open and closed conformations. Protein Science **2**(10): 1559-73.
- 536.** Zheng, J.H., Knighton, D.R., Parelo, J., Taylor, S.S. and Sowadski, J.M. (1991). Crystallization of catalytic subunit of adenosine cyclic monophosphate-dependent protein kinase. Methods in Enzymology **200**: 508-21.
- 537.** Zhu, H., Bilgin, M. and Snyder, M. (2003). Proteomics. Annual Review of Biochemistry **72**: 783-812.
- 538.** Zhuang, G., Katakura, Y., Omasa, T., Kishimoto, M. and Suga, K. (2001). Measurement of association rate constant of antibody-antigen interaction in solution based on enzyme-linked immunosorbent assay. J Biosci Bioeng **92**(4): 330-6.
- 539.** Zick, S.K. and Taylor, S.S. (1982). Interchain disulfide bonding in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase I. Journal of Biological Chemistry **257**(5): 2287-93.
- 540.** Zieske, L.R. (2006). A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies. Journal of Experimental Botany **57**(7): 1501-8.
- 541.** Zimmermann, B., Chiorini, J.A., Ma, Y., Kotin, R.M. and Herberg, F.W. (1999). PrKX is a novel catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase regulated by the regulatory subunit type I. Journal of Biological Chemistry **274**(9): 5370-8.
- 542.** Zimmermann, B., Hahnefeld, C. and Herberg, F.W. (2002). Applications of biomolecular interaction analysis in drug development. TARGETS **1**(2): 66-73.
- 543.** Zippin, J.H., Chen, Y., Nahirney, P., Kamenetsky, M., Wuttke, M.S., Fischman, D.A., Levin, L.R. and Buck, J. (2003). Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in distinct signaling microdomains. FASEB Journal **17**(1): 82-4.
- 544.** Zoller, M.J., Kerlavage, A.R. and Taylor, S.S. (1979). Structural comparisons of cAMP-dependent protein kinases I and II from porcine skeletal muscle. Journal of Biological Chemistry **254**(7): 2408-12.



9. ANHANG

9.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2-AHA-cAMP	2- (6- Aminohexylamino)-cAMP
2-AH-cGMP	N2- (6- Aminoethyl)-cGMP
2-Cl-cAMP	2- Chloro-cAMP
2-phenyl-1,N6-ε-cAMP	2-phenyl-1,N6-etheno-cAMP
6-AC-cAMP	N6-(ε-aminocaproyl)-cAMP
6-AE-cAMP	N6-(2-Aminoethylamino)-cAMP
6-AH-cAMP	N6- (6- Aminoethyl)-cAMP
6-Bnz-cAMP	N6- benzoyl-cAMP
8-AEA-cAMP	8- (2- Aminoethylamino)-cAMP
8-AET-cGMP	8- (2- Aminoethylthio)-cGMP
8-AHA-cAMP	8- (6- Aminohexylamino)-cAMP
8-Br-cAMP	8- Bromo-cAMP
8-Fluo-cAMP	8- [[2-[(Fluoresceinylthio)amino]ethyl]thio]-cAMP
8-N ₃ -cAMP	8- Azido-cAMP
8-pCPT-2'-O-Me-cAMP	8- (4- Chlorophenylthio)- 2'- O- methyl-cAMP
8-Pharos-cAMP	8- [Pharos-575]-cAMP
8-PIP-cAMP	N6- Phenyladenosine-cAMP
8-pMeOPT-2'-O-Me-cAMP	8- (4- Methoxyphenylthio)- 2'- O- methyl-cAMP
AC	Adenylylzyklase
AD	Transkriptionsaktivierungsdomäne eines Transkriptionsfaktors bei der Yeast two hybrid Methode
ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	<i>acquired immunity deficiency syndrome</i> = erworbene Immunschwäche
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>
AKAP	A-Kinase Ankerproteine
AKAP1	Synonym: PRKA1, S-AKAP84, D-AKAP1, AKAP100, AKAP121, AKAP149, AKAP84, SAKAP84
AKAP10	Synonym: PRKA10, D-AKAP2, <i>dual specificity A-kinase anchoring protein 2</i>
AKAP11	Synonym: PRKA11, AKAP220, hAKAP220
AKAP12	Synonym: PRKA12, Gravin, AKAP250, <i>Myasthenia gravis autoantigen gravin</i> , SSeCKS, <i>Src suppressed C kinase substrate</i>
AKAP13	Synonym: PRKA13, AKAP-Lbc, Ht31, Rt31, <i>breast cancer nuclear receptor-binding auxiliary protein</i> , BRX, c-lbc, FLJ11952, <i>guanine nucleotide exchange factor Lbc</i> , LBC, <i>lymphoid blast crisis on PROTO-LB</i> , PROTO-LBC
AKAP2	Synonym: PRKA2, AKAP-KL, AKAI AKAP-KL, PRKAL, PALM2, KIAA0920
AKAP3	Synonym: PRKA3, AKAP110, AKAI Akap3, FSP95, SOB1
AKAP4	Synonym: PRKA4, hAKAP82, FSC1, 75kDa <i>fibrous sheath protein</i> , PRKA4, HI, P82, p82 Fsc1
AKAP5	Synonym: PRKA5, AKAP75 (bovine), AKAP79 (human), AKAP150 (rat/mouse)
AKAP6	Synonym: PRKA6, mAKAP, AKAPprotein A, AKAPprotein B, ADAP100, AKAP100, Akapalpha, Akapbeta, KIAA0311
AKAP7	Synonym: PRKA7, AKAP15, AKAP 18 α, β, γ, δ
AKAP8	Synonym: PRKA8, AKAP95
AKAP9	Synonym: PRKA9, AKAP120, AKAP450, AKAP350, Yotiao, CG-NAP, Hyperion
AKIP	A-Kinase Interaktionsprotein
ATP	Adenosintriphosphat
BIA	biomolekulare Interaktionsanalyse
BIG2	<i>brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2</i>
BIND	<i>Biomolecular Interaction Network Database</i>
BOND	<i>Biomolecular Object Network Databank</i> , http://bind.ca
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosine- 3', 5'-monophosphat

CAP	<i>catabolite activator protein</i> = Katabolit-Aktivatorprotein, siehe auch CRP
cAR	extrazelluläres cAMP-Rezeptorprotein
cGMP	zyklisches Guanosin- 3', 5'-monophosphat
CNB	<i>cyclic nucleotide-binding domain</i> = zyklonukleotid Bindungsdomäne
CNB	<i>cyclic nucleotide-binding domain</i> , zyklische Nukleotidbindungsdomäne
CNB-A	<i>cyclic nucleotide-binding domain-A</i> , Amonoterminaler gelegene CNB der R-Untereinheit von PKA
CNB-B	<i>cyclic nucleotide-binding domain-B</i> , Carboxyterminaler gelegene CNB der R-Untereinheit von PKA
CNC	Carney complex
CNG	<i>cyclic nucleotide gated ion channel</i>
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	CRE-Bindeprotein
CRP	cAMP-Rezeptorprotein, siehe auch CAP
C-Untereinheit	katalytische Untereinheit der PKA
DBD	DNA-Bindedomäne eines Transkriptionsfaktors bei der Yeast two hybrid Methode
DD	<i>dimerization and docking domain</i> = Dimerisierungsdomäne
DEAE-	Diethylaminoethyl-
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
Epac	<i>exchange protein directly activated by cAMP</i> = zyklonukleotidregulierte Guaninnukleotid-Austauschfaktor
Ezrin	Synonym: AKAP78, CVL, Cytovillin, p81, Vil2, Villin2
FP	Fluoreszenzpolarisation
GDP	Guaninnukleotiddiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i> = grün fluoreszierendes Protein
GPCR	<i>G-protein coupled receptors</i> = G-Protein-gekoppelten Rezeptor
GTP	Guaninnukleotidtriphosphat
HCN	<i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated channel</i>
HIV	human immunodeficiency virus
HTS	<i>high-throughput screening</i> = Hochdurchsatzverfahren
ICAT	<i>isotope coded affinity tag</i> =
ITC	<i>isothermal titration calorimetry</i> = isothermale Titrationskalorimetrie
iTRAQ™	<i>isobaric Tagging for Relative and Absolute Protein Quantification</i>
MAP2	Synonym: MAP2B, Microtubule-associated protein 2, Mtap-2, Mtap2
MS	Massenspektrometrie
PDE	Phosphodiesterase
PDE	Phosphodiesterase
PKA	cAMP abhängige Proteinkinase, Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase, Proteinkinase G
PKI	hitze stabiler Proteinkinaseinhibitor
PTM	posttranslationale Modifikation
Rho-Kinase	<i>Rho-associated protein kinase 2</i> , ROK α , ROCK2
RIA	<i>radioimmunoassay</i> = Radioimmunoassay
Rp-8-AEA-cAMPS	8- (6-Aminoethylamino)-cAMPS, Rp-Isomer
Rp-8-AHA-cAMPS	8- (6-Aminohexylamino)-cAMPS, Rp-Isomer
Rp-cAMPS	zyklisches Adenosin- 3', 5'- cyclic monophosphorothioat, Rp- Isomer
RU	response Units
R-Untereinheit	regulatorische Untereinheit der PKA
SD	<i>standard deviation</i> = Standardabweichung
SEM	<i>standard error of the mean</i> = Standardfehler
SILAC	<i>stable isotope labelling by amino acids in cell culture</i> = stabile Isotopenlabelling mit ² H- oder ¹³ C-modifizierten Aminosäuren
Sp-2-AEA-cAMPS	2- (6-Aminoethylamino)-cAMPS, Sp-Isomer
Sp-2-AHA-cAMPS	2- (6-Aminohexylamino)-cAMPS, Sp-Isomer
Sp-8-AEA-cAMPS	8- (2-Aminoethylamino)-cAMPS, Sp-Isomer
Sp-8-AHA-cAMPS	8- (6-Aminohexylamino)-cAMPS, Sp-Isomer
Sp-cAMPS	zyklisches Adenosin- 3', 5'-monophosphorothioat, Sp-Isomer
SPR	<i>surface plasmon resonance</i> = Oberflächenplasmonresonanz
WAVE-1	Synonym: <i>Wiskott-Aldrich verprolin-homolgy protein-1</i> , Scar
YTH	<i>Yeast two hybrid</i> = Hefedihibridsystem
z.T.	zum Teil

9.2 ZYKLONUKLEOTID-STRUKTUREN

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die folgenden Strukturen alle in der syn-Konformation dargestellt.

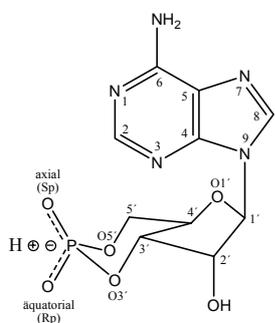


Abbildung 9.1 **cAMP**
zyklisches Adenosine- 3', 5'-monophosphat

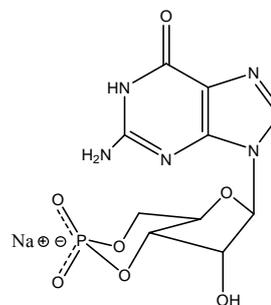


Abbildung 9.2 **cGMP**
zyklisches Guanosin- 3', 5'-monophosphat

An der Position 2 des Adeninringes modifizierte Zyklonukleotid-Analoga

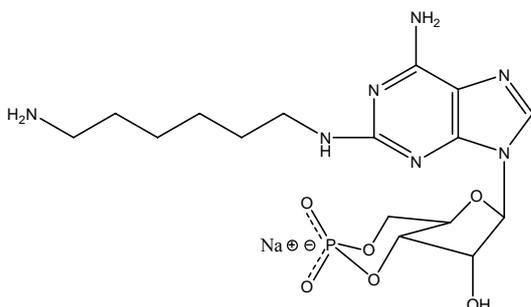


Abbildung 9.3 **2-AHA-cAMP**
2- (6- Aminohexylamino)-cAMP

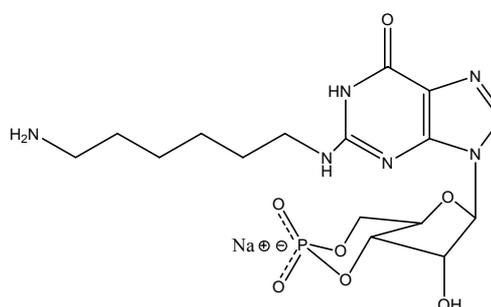


Abbildung 9.4 **2-AH-cGMP**
N2- (6- Aminohexyl)-cGMP

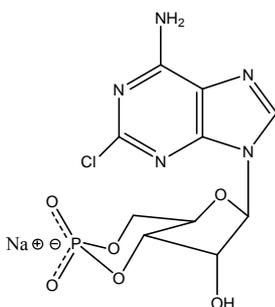


Abbildung 9.5 **2-Cl-cAMP**
2- Chloro-cAMP

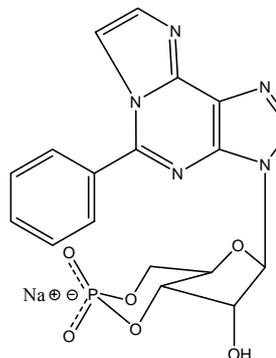


Abbildung 9.6 **2-phenyl-1,N6-e-cAMP**
2-phenyl-1,N6-etheno-cAMP

An der Position 4 des Adeninringes modifizierte Zyclonukleotid-Analoga

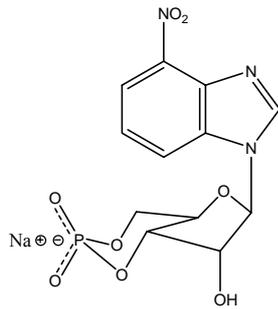


Abbildung 9.7
4-nitro-1,β-D-ribofuranosyl-benzimidazol-3'5'-
zyklisches Monophosphat

An der Position 6 des Adeninringes modifizierte Zyclonukleotid-Analoga

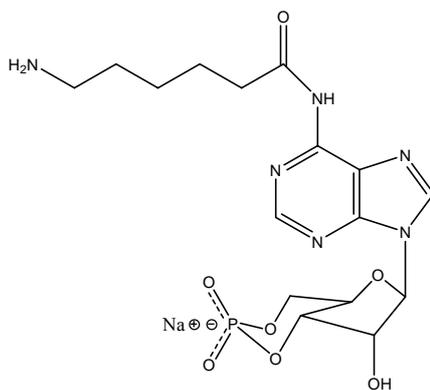


Abbildung 9.8 **6-AC-cAMP**
N6-(e-aminocaproyl)-cAMP

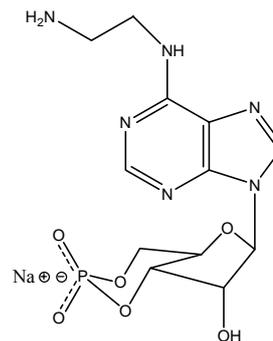


Abbildung 9.9 **6-AE-cAMP**
N6-(2-Aminoethylamino)-cAMP

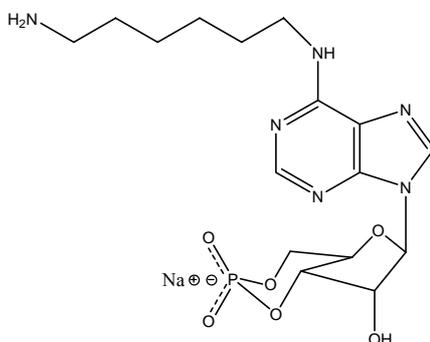


Abbildung 9.10 **6-AH-cAMP**
N6-(6-Aminoethyl)-cAMP

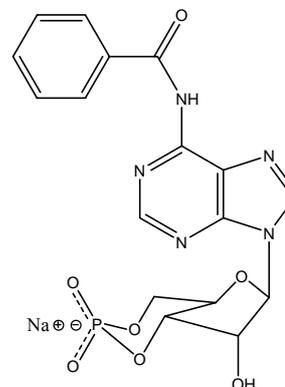


Abbildung 9.11 **6-Bnz-cAMP**
N6-benzoyl-cAMP

An der Position 8 des Adeninringes modifizierte Zyklonukleotid-Analoga

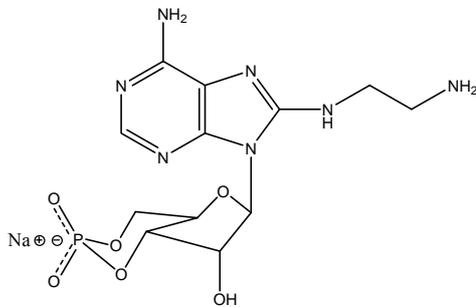


Abbildung 9.12 **8-AEA-cAMP**
8- (2- Aminoethylamino)-cAMP

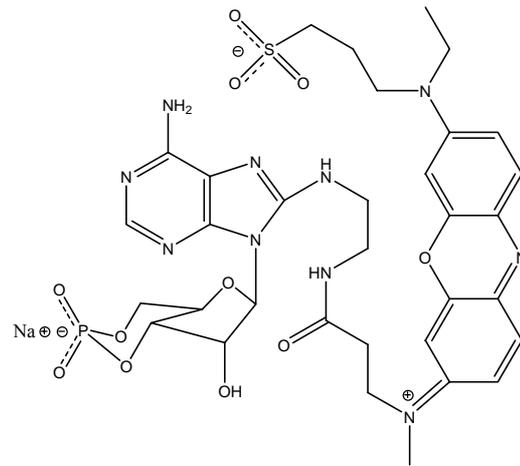


Abbildung 9.13 **8-AEA-EVOblue-cAMP**
8- (2- Aminoethylamino)-EVOblue³⁰-cAMP

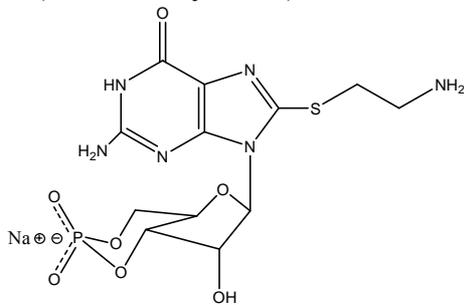


Abbildung 9.14 **8-AET-cGMP**
8- (2- Aminoethylthio)-cGMP

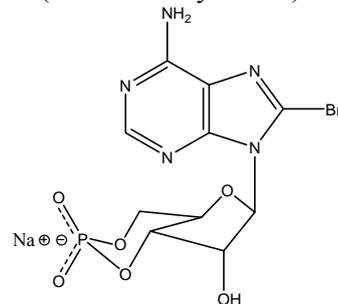


Abbildung 9.15 **8-Br-cAMP**
8- Bromo-cAMP

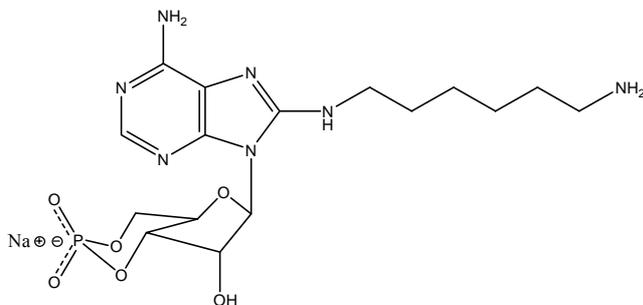


Abbildung 9.16 **8-AHA-cAMP**
8- (6- Aminohexylamino)-cAMP

An der Position 8 des Adeninringes modifizierte Zyklonukleotid-Analoga (Fortsetzung)

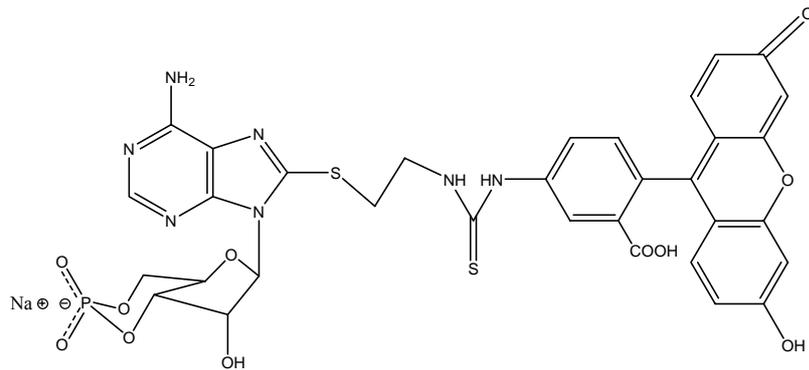


Abbildung 9.17 **8-Fluo-cAMP**

8- [[2-[(Fluoresceinylthioureido)amino]ethyl]thio]-cAMP

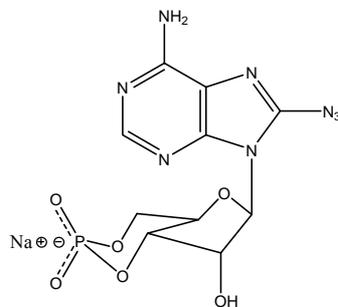


Abbildung 9.18 **8-N₃-cAMP**

8- Azido-cAMP

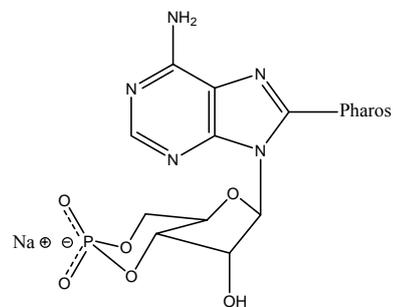


Abbildung 9.19 **8-[φ-575]-cAMP**

8- [Pharos-575]-cAMP

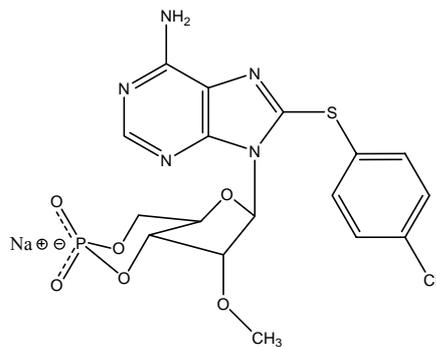


Abbildung 9.20 **8-pCPT-2'-O-Me-cAMP**

8- (4- Chlorophenylthio)- 2'- O- methyl-cAMP

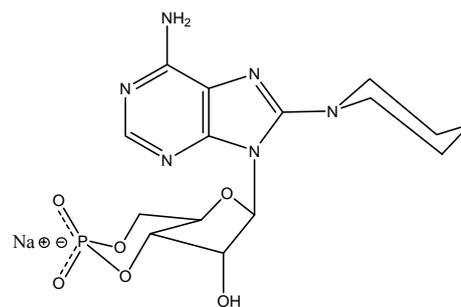


Abbildung 9.21 **8-PIP-cAMP**

N6- Phenyladenosine-cAMP

An der Position 8 des Adeninringes modifizierte Zyklonukleotid-Analoga (Fortsetzung)

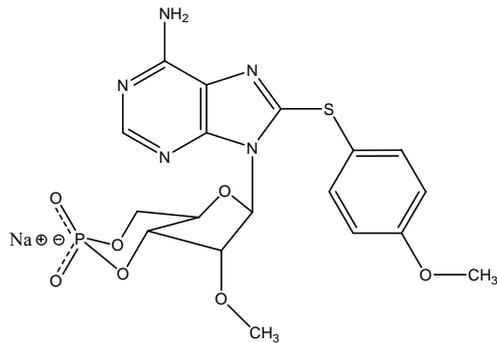


Abbildung 9.22 **8-pMeOPT-2'-O-Me-cAMP**
8-(4-Methoxyphenylthio)-2'-O-methyl-cAMP

Am Phosphodiester modifizierte Zyklonukleotid-Analoga

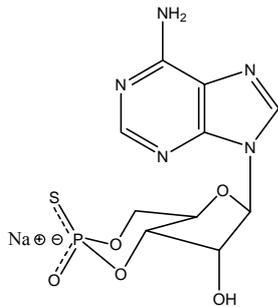


Abbildung 9.23 **Sp-cAMPS**
zyklisches Adenosin- 3', 5'-monophosphorothioat,
Sp-Isomer

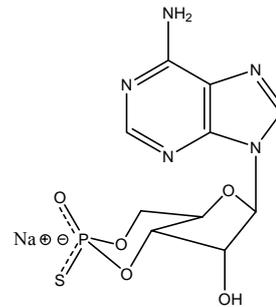


Abbildung 9.24 **Rp-cAMPS**
zyklisches Adenosin- 3', 5'-monophosphorothioat,
Rp-Isomer

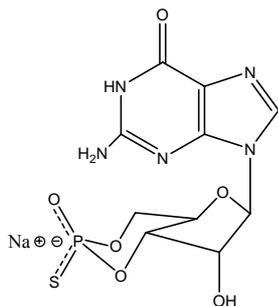


Abbildung 9.25 **Rp-cGMPS**
zyklisches Guanodin- 3', 5'- cyclic
monophosphorothioat, Rp-Isomer

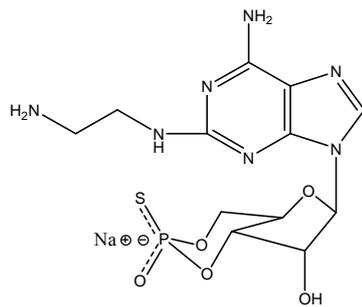
Am Phosphodiester modifizierte Zyclonucleotid-Analoga (Fortsetzung)

Abbildung 9.26 **Sp-2-AEA-cAMPS**
2- (6-Aminoethylamino)-cAMPS, Sp-Isomer

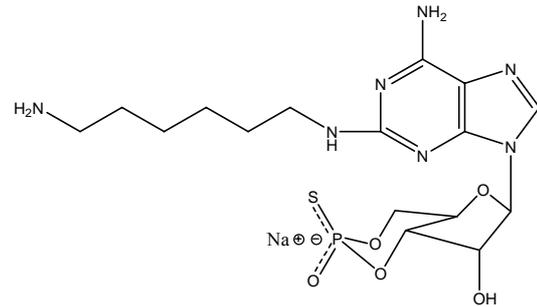


Abbildung 9.27 **Sp-2-AHA-cAMPS**
2- (6-Aminohexylamino)-cAMPS, Sp-Isomer

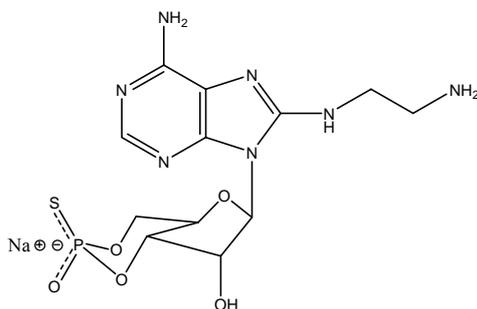


Abbildung 9.28 **Sp-8-AEA-cAMPS**
8- (2-Aminoethylamino)-cAMPS, Sp-Isomer

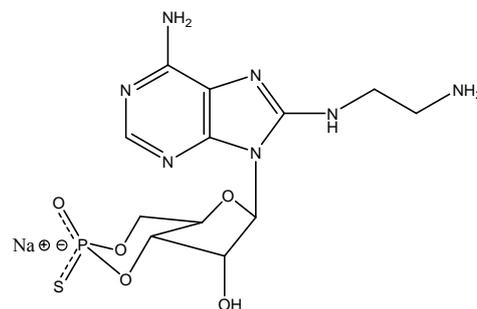


Abbildung 9.29 **Rp-8-AEA-cAMPS**
8- (6-Aminoethylamino)-cAMPS, Rp-Isomer

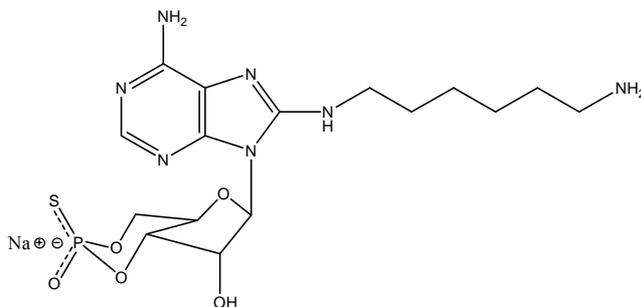


Abbildung 9.30 **Sp-8-AHA-cAMPS**
8- (6-Aminohexylamino)-cAMPS, Sp-Isomer

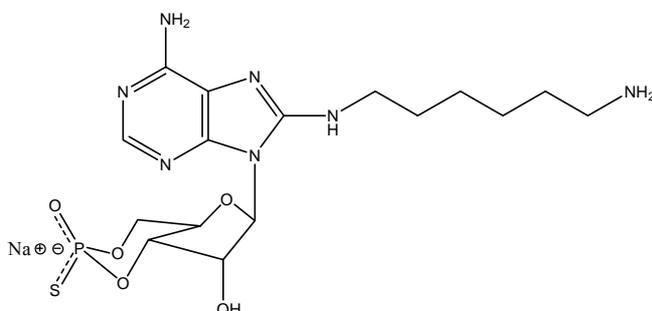


Abbildung 9.31 **Rp-8-AHA-cAMPS**
8- (6-Aminohexylamino)-cAMPS, Rp-Isomer

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und andere als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Kein Teil dieser Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Kassel, den 21.05.2007