

Diss. ETH No. 7914

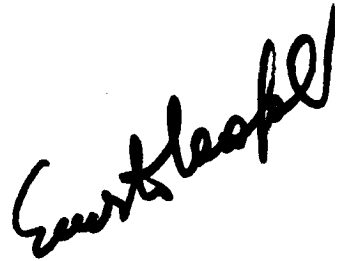
# **Calmodulin**

## **Structural Properties and Interaction with Antagonists**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY  
ZURICH

for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by  
JACQUELINE BUERKLER  
Dipl. Natw. ETH  
born 27<sup>th</sup> June 1955  
citizen of Alt St. Johann, St. Gallen



accepted on the recommendation of  
Prof. E. Carafoli, examiner  
Prof. G. Semenza, co-examiner  
Dr. J. Krebs, co-examiner

Winfried Reuper · Grafischer Betrieb

Zurich, 1985

## ZUSAMMENFASSUNG

=====

Die wichtige Rolle des Calcium Ions in biologischen Systemen hat die Aufmerksamkeit von Wissenschaftlern aller biologischer Forschungsrichtungen auf sich gezogen. Die biologische Aktivitaet des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions kommt durch eine homologe Klasse Calcium-bindender Proteine zustande. Calmodulin, der am weitesten verbreitete Vertreter, kontrolliert eine grosse Anzahl von Schluessel-Enzymen und zellulaeren Vorgaengen in allen eukaryotischen Zellen.

Calmodulin ist ein niedermolekulares, saures, hitzestabiles und phylogenetisch aeusserst konservatives  $\text{Ca}^{2+}$ -moduliertes Regulator Protein. Es bindet vier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit hoher Affinitaet ( $K_{\text{diss}}$  1-40  $\mu\text{M}$ ). Eine breite Palette Substanzen ist bekannt, die Calmodulin abhaengige Prozesse hemmen; dazu gehoeren zB Phenothiazine, Naphtalin Sulfonamide, Imidazoline sowie Melittin,  $\beta$ -Endorphin und Mastoparane. In Zusammenarbeit mit der Sandoz AG, Basel, wurde in dieser Studie eine groessere Anzahl Substanzen auf ihre Funktion als Calmodulin Hemmstoffe untersucht. Als Test-Systeme dienten 2 Calmodulin abhaengige Enzyme: Die 3':5'-cyclische Nucleotid Phosphodiesterase und die  $\text{Ca}^{2+}$ -pumpende ATPase aus Erythrozyten. Die gemessenen  $I_{50}$ -Werte der staerksten Hemmstoffe sind in der Groessenordnung der Werte der bekannten Phenothiazine. Bindungs-Stoichiometrien und Affinitaeten einiger Inhibitor-Calmodulin Komplexe wurden mit Fluoreszenz-Messungen sowie Gleichgewichts- und Fluss-Dialyse naeher untersucht. In Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  binden zwei Molekuele der Substanzen 12-114

oder 36-079 mit hoher Affinitaet an ein Molekuel Calmodulin ( $K_{diss}$ -Werte  $2\mu\text{M}$  fuer 12-114 und  $4\mu\text{M}$  fuer 36-079). Antagonist 200-737 interagiert mit Calmodulin moeglicherweise mit einer Stoechiometrie von 1:1 in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ . Untersuchungen an tryptischen Fragmenten von Calmodulin (dh an Calmodulin in zwei Haelften gespalten) zeigten, dass in jeder Haelfte von Calmodulin eine der beiden Bindungsstellen fuer Substanz 12-114 lokalisiert ist. Die Affinitaet der Droge fuer die Fragmente ist kleiner als fuer intaktes Calmodulin und betraegt  $9\mu\text{M}$  fuer die C-terminale Haelfte und  $23\mu\text{M}$  fuer den N-Terminus. Die Bindungsstelle der Substanz 200-737 liegt moeglicherweise im C-terminalen Bereich von Calmodulin, da Bindung nur an das C-terminale Fragment beobachtet wurde. Fuer Hemmstoff 36-079 konnte keine Bindung an die beiden Fragmente gefunden werden. Moeglicherweise werden dessen Bindungsstellen durch tryptische Spaltung zerstoert.

Calmodulin veraendert seine Konformation durch das Binden von  $\text{Ca}^{2+}$  derart, dass hydrophobe Regionen an der Oberflaeche exponiert werden. Diese Domaenen koennen mit dem photoreactiven, aeusserst hydrophoben Reagenz TID (3-(Trifluoromethyl)-3-(m-iodophenyl)diazirin) markiert werden. Auch Calmodulin Fragmente reagieren mit TID, sofern sie mindestens zwei benachbarte  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen enthalten. Andere Kationen mit aehnlichem Radius wie  $\text{Ca}^{2+}$  induzieren in Calmodulin ebenfalls Konformationsaenderungen, sodass TID-Bindung stattfindet. In Gegenwart von Trifluoperazin, einem Calmodulin Antagonisten, wird nur eine reduzierte TID Markierung beobachtet, was eine Konkurrenz zwischen

Trifluoperazin und TID Moleküelen vermuten lässt. Aufgrund von TID-Bindungsstudien wird bestätigt, dass die Struktur von  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin auch in hohen Konzentrationen von denaturierenden Substanzen erhalten bleibt.

Die Funktion der hydrophoben Regionen ist bis jetzt nicht geklärt. Es wird aber vermutet, dass diese Domänen für die Bindung von Hemmstoffen an Calmodulin verantwortlich sind und bei der Interaktion von Calmodulin mit den Ziel-Enzymen eine wichtige Rolle spielen.

SUMMARY

=====

The important role of calcium in biological systems has attracted the attention of scientists of all biological research lines. The activity of the  $\text{Ca}^{2+}$ -ion is mediated through a homologous class of calcium-binding proteins. Calmodulin, the most versatile member of this family, controls a large number of key-enzymes and cellular processes in all eucaryotic cells. It is a low molecular weight, acidic, heat stable and phylogenetic very conservative  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated modulator protein, which binds four  $\text{Ca}^{2+}$ -ions with high affinity ( $K_{\text{diss}}$  1-40  $\mu\text{M}$ ). Various classes of drugs inhibit calmodulin-dependent processes, among them phenothiazines, naphtalene sulfonamides, imidazolines, as well as different peptides like melittin,  $\beta$ -endorphin and mastoparanes. A great number of drugs kindly provided by Sandoz AG, Basel, have been tested during this study for possible calmodulin inhibition. Two different calmodulin-dependent enzymes - the  $\text{Ca}^{2+}$ -pumping ATPase of erythrocytes and 3':5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase - have been used as test systems. The  $I_{50}$ -values of the most potent among the inhibitors found are similar to those reported for the phenothiazines. The binding stoichiometry and the binding affinity of some inhibitor-calmodulin complexes have been studied in detail by using fluorescence spectroscopy and equilibrium and flow dialysis. Two molecules of compound 12-114 or 36-079 per molecule of calmodulin are bound with high affinity in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent way ( $K_{\text{diss}}$  2  $\mu\text{M}$  and 4  $\mu\text{M}$ , respectively), whereas drug

200-737 possibly forms a 1:1 complex with calmodulin in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . Studies with tryptic calmodulin fragments (i.e. with calmodulin split in two halves) have provided evidence that one high affinity binding site for compound 12-114 is located in each half of the protein. The affinity of the compound is reduced for both fragments if compared to native calmodulin (corresponding  $K_{\text{diss}}$ -values  $9 \mu\text{M}$  for the C-terminal fragment and  $23 \mu\text{M}$  for the N-terminus). Drug 200-737 binds only to the C-terminal fragment indicating that its putative binding site is probably located in the C-terminal half of calmodulin. Drug 36-079 by contrast does not bind to either of the calmodulin fragments. Possibly, its binding sites are destroyed by tryptic cleavage.

Calmodulin changes its conformation upon binding of  $\text{Ca}^{2+}$  resulting in the exposure of hydrophobic sites on its surface. These domains can be labeled by the photoreactive, hydrophobic probe TID (3-(trifluoromethyl)-3-(m-iodophenyl)diazirine). Tryptic fragments of calmodulin react with TID provided they contain at least two adjacent  $\text{Ca}^{2+}$ -binding sites. Cations of ionic radii similar to  $\text{Ca}^{2+}$  also induce conformational changes in calmodulin resulting in substantial TID-labeling. In the presence of trifluoperazine, a calmodulin antagonist, only reduced binding of TID to calmodulin is observed indicating a binding competition between TID and trifluoperazine. The TID labeling experiments confirm that the structural integrity of calmodulin is maintained even in the presence of high concentrations of denaturing agents.

Although the function of the hydrophobic regions in calmodulin

is not established, they are probably responsible for the binding of antagonists and play an important role in the interaction of calmodulin with target enzymes.