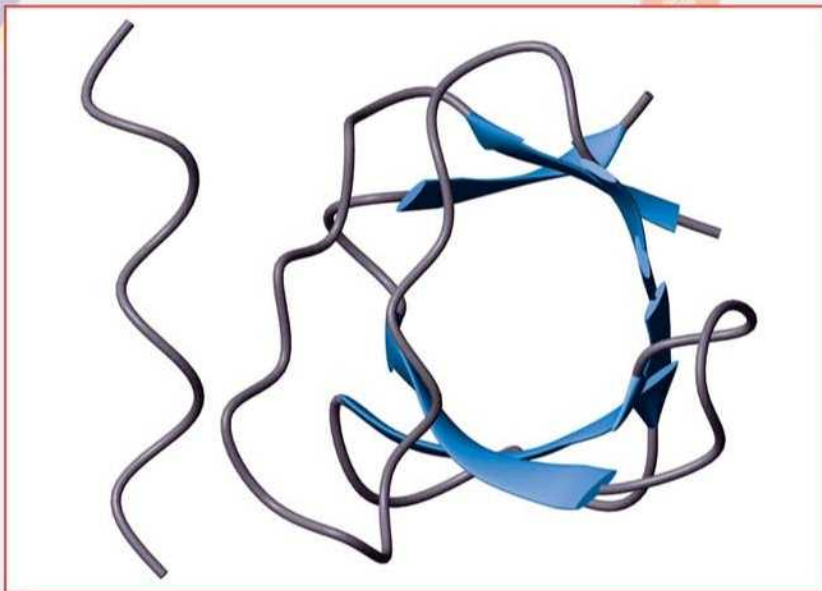


Analyse der Bindungsspezifität der humanen Lck-SH3-Domäne anhand artifizieller und physiologischer Peptid-Liganden und strukturelle Charakterisierung dieser Peptide im Komplex mit SH3-Domänen

Thi Tuyen Tran



Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Biologische Informationsverarbeitung 2

Analyse der Bindungsspezifität der humanen Lck-SH3-Domäne anhand artifizieller und physiologischer Peptid-Liganden und strukturelle Charakterisierung dieser Peptide im Komplex mit SH3-Domänen

Thi Tuyen Tran

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences

Band/Volume 20

ISSN 1433-5549

ISBN 3-89336-412-9

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek
Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten sind im Internet
über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

Herausgeber Forschungszentrum Jülich GmbH
und Vertrieb: Zentralbibliothek
 52425 Jülich
 Telefon: 02461 61-5368 · Telefax: 02461 61-6103
 e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de
 Internet: <http://www.fz-juelich.de/zb>

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2005

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences Band/Volume 20

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2005)

ISSN 1433-5549
ISBN 3-89336-412-9

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder
in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder
unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Summary

Lck is a lymphoid-specific cytosolic protein tyrosine kinase, which plays a key role in the immune response and is essential for T-cell development and function. Upon antigen stimulation, Lck transduces the receptor signal to other kinases and intracellular signal transduction components. Because of its important role in T-cell signalling and activation, Lck is a target of viral effector molecules. Understanding the mode of their interaction provides not only an insight into general principles of protein-protein interaction. It also may serve as a basis for the development of new drugs capable of modifying Lck activity.

The objective of the presented work was to identify the binding specificity of the Lck-SH3 domain. By employing a phage display selection procedure artificial peptide ligands for Lck-SH3 domain could be identified and subsequently a consensus sequence for Lck-SH3 ligands was deduced. For the first time, it was shown, that *in vitro* Lck SH3 binds preferentially to class I' ligands. All known physiological binding partners however bind to Lck-SH3 in a class II orientation. Histidin at position P₆ within the peptide PD1-R was identified to be essential for Lck-SH3 binding. For the first time, the Lck-SH3 binding regions of the physiological Lck-SH3 binding partners c-Cbl, Cbl-b, Sam68 und FasL were identified.

Employing NMR titration studies, interactions of the new peptide ligands PD1 and PD1-R to Lck-SH3 were confirmed, and their binding regions on the surface of Lck-SH3 were mapped. Moreover, HIV-1 Nef could be competitively displaced from Lck-SH3 by the peptide PD1-R.

Furthermore, it was shown that the peptides PD1 and PD1-R bind to the SH3 domain of the haematopoietic cell kinase Hck with a dissociation constant of a few hundred nanomolar. The PD1:Hck-SH3 interaction thus is the tightest SH3:peptid interaction known to date. Even the tight binding of HIV-1 Nef to Hck-SH3 ($K_D=0.25 \mu\text{M}$) could be inhibited by PD1. This was demonstrated by a NMR competition experiment.

In addition, conditions for the complex of Lck-SH3 with PD1-R and Hck-SH3 with PD1 were defined, which paved the way for high resolution structures of both complexes. They will be the first complex structures of Lck-SH3 and Hck-SH3 with a peptide ligand.

Zusammenfassung

Die Lymphocytenspezifische Kinase Lck ist eine Protein-Tyrosin-Kinase, die eine wichtige Rolle bei der Immunantwort innerhalb der T-Zelle einnimmt. Sie ist essentiell für die Proliferation und Differenzierung der T-Zellen. Durch die Weitergabe des Rezeptorsignals nach Antigen-Stimulierung ist sie an der Aktivierung anderer Kinasen und damit an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt. Aufgrund dessen stellt sie auch einen Angriffspunkt für virale Effektormoleküle dar. Das Verständnis der Interaktion von Lck mit ihren Liganden bringt nicht nur weite Einblicke in allgemeine Prinzipien der Protein-Protein-Wechselwirkungen. Sie kann auch als Basis für die Entwicklung neuer Medikamente dienen, um in die Aktivität der Lck einzugreifen und die Immunantwort zu beeinflussen und somit auch virale Infektionen bekämpfen zu können.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Liganden-Spezifität der Lck-SH3-Domäne. Mittels Phagendisplay-Selektion ist es erstmals gelungen, artifizielle Peptid-Liganden für die humane Lck-SH3-Domäne zu identifizieren und daraus eine Konsensus-Sequenz für die Lck-SH3-Erkennung von Peptiden abzuleiten. Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass Lck-SH3 *in vitro* bevorzugt an Klasse-I'-Liganden binden. Alle bekannten physiologischen Bindungspartner der Lck-SH3 jedoch binden in Klasse-II-Orientierung. Für das Peptid PD1-R konnte das Histidin an der Position P₆ als essentiell für eine Lck-SH3-Bindung identifiziert werden. Weiterhin konnten erstmals für die nativen Lck-SH3-Bindungspartner c-Cbl, Cbl-b, Sam68 und FasL die dazugehörigen Lck-SH3-Bindungsregionen innerhalb dieser Proteine identifiziert werden.

Mit Hilfe von NMR-Titrationsexperimenten konnten die Wechselwirkungen der neuen Peptid-Liganden PD1 und PD1-R bestätigt und auf der Oberfläche von Lck-SH3 kartiert werden. Weiterhin ist es in dieser Arbeit gelungen, HIV-1-Nef von der Lck-SH3-Domäne durch das Peptid PD1-R kompetitiv zu verdrängen.

Im weiteren Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Peptide PD1 und PD1-R mit einer Dissoziationskonstante von wenigen hundert nanomolar an die SH3-Domäne der hämatopoetischen Kinase Hck binden. Die Bindung zwischen Hck-SH3 und PD1 ist derzeit die affinste bekannte SH3:Peptid-Interaktion. Selbst die hochaffine Bindung von HIV-1-Nef an die Hck-SH3 ($K_D=0,25 \mu\text{M}$) konnte durch das Peptid PD1 verhindert werden. Dies wurde durch ein NMR-Kompetitionsexperiment nachgewiesen.

Ferner wurden in dieser Arbeit Bedingungen definiert, die eine hochauflösende, dreidimensionale Strukturbestimmung der Komplexe Lck-SH3:PD1-R und Hck-SH3:PD1 ermöglichen. Die dreidimensionalen Strukturen werden die ersten Komplexstrukturen von Lck-SH3 und Hck-SH3 mit einem Peptid-Liganden sein.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn **Prof. Dr. Dieter Willbold**, Leiter der NMR-Abteilung im Institut für Biologische Strukturforschung im Forschungszentrum Jülich für die Überlassung des interessanten Themas, für die Betreuung der Arbeit und für die Schaffung sehr guter Arbeitsbedingungen. Weiterhin sei ihm gedankt für sein allzeit „offenes Ohr“ bei wissenschaftlichen Fragen sowie allen anderen Themen.

Bei Herrn **Prof. Dr. Georg Büldt**, Leiter des Instituts für Biologische Strukturforschung möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe in der ersten Zeit meiner Promotionsarbeit bedanken.

Besonders möchte ich mich bei Frau **Dr. Silke Hoffmann** für ihre ständige Hilfsbereitschaft bedanken. Die vielen Diskussionen, die guten Ratschläge und die wertvollen Anregungen haben einen wesentlichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet.

Frau **Dr. Katja Wiesehan** danke ich für die Vorarbeiten dieser Arbeit und ihre Unterstützung bei der Durchführung der Phagendisplay-Selektion sowie für ihre gute Laune.

Ganz großer Dank gilt Herrn **Dr. Thomas Stangler** für seine vielen aufschlussreichen Diskussionen. Vor allem danke ich ihn für seine Unterstützung bei der NMR-Messung, bei der Einführung in die Auswertung der NMR-Spektren sowie für die Beantwortung aller Fragen rund um die NMR.

Für die Einführung in die Varian-NMR-Messtechnik möchte ich mich bei Herrn **Juniorprof. Dr. Matthias Stoldt** bedanken. Mein Dank geht an Herrn **Dr. Bernd König** für die Einführung in die Bruker-NMR-Messtechnik.

Frau **Esther Jonas** danke ich für die Präparation des HIV-1-Nef-Proteins. Herrn **Holger Schmidt** danke ich für die Überlassung der Zuordnungsdaten für die freie Hck-SH3-Domäne.

Bei Frau **Dr. Karen Hänel** und Frau **Nina Mohrlüder** möchte ich mich für die nette und lustige Zeit in unserem Büro und für ihre Freundschaft bedanken.

Mein Dank gilt **allen Mitarbeitern** der Arbeitsgruppe für das gute Klima, die nette und entspannte Arbeitsatmosphäre sowie für die vielen Abende beim Grillen, im Kino und in den verschiedenen Cafes/Restaurants.

Ein großer Dank gilt meinen **Eltern** für die uneingeschränkte Unterstützung während meines gesamten Lebensweges.

Ganz besonders danke ich Herrn **Robert Bujnicki** für die vielen Diskussionen, für sein Verständnis, seine Ablenkungen und für seine Unterstützung in allen Problemstellungen.

Inhaltsverzeichnis

<i>Summary</i>	<i>i</i>
<i>Zusammenfassung</i>	<i>ii</i>
<i>Danksagung</i>	<i>iii</i>
<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>iv</i>
1 Einleitung	1
1.1 Das spezifische Immunsystem	1
1.1.1 Der T-Zell-Rezeptor-Komplex	2
1.2 Src-Typ Protein-Tyrosin-Kinasen	4
1.3 Die Lymphocyten-spezifische Kinase Lck	5
1.4 Struktur der Src-Homologie 3-Domäne (SH3-Domäne)	7
1.4.1 SH3-Liganden und das xPxxP-Bindungsmotiv	8
1.5 HIV-1-Nef: Ein viraler SH3-Ligand	11
1.6 Methodischer Hintergrund	14
1.6.1 In vitro-Selektion mittels Phagendisplay	14
1.6.2 Bindungstest an immobilisierten Peptiden (PepSpot)	16
1.6.3 ¹ H-Kernresonanz-Spektroskopie (1H-NMR)	16
Charakterisierung von Protein:Ligand-Interaktionen	17
1.7 Ziele der Arbeit	19
2 Materialien	21
2.1 Bakterienstämme	21
2.2 Phagendisplay-Peptid-Bibliothek	21
2.3 IMAGE-cDNA-Klone	22
2.4 Oligonukleotide	22
2.5 Peptide und PepSpot-Membran	23
2.6 Plasmide	23
2.7 Größenmarker	24
2.8 Enzyme, Proteine und Antikörper	24
2.9 Biochemikalien, Chemikalien und Kits	25
2.10 Sonstige Materialien	26
2.11 Datenbanken und Informationen zu DNA- und Aminosäuresequenzen sowie Strukturen von Proteinen	26
3 Methoden	27
3.1 Isolierung von DNA	27
3.1.1 Plasmidpräparation aus Escherichia coli (E. coli)	27
3.1.2 Isolierung von Einzelstrang-DNA aus M13-Phagen	27

3.2	Konzentrationsbestimmung von DNA	27
3.3	Gelelektrophorese von DNA	28
3.4	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	29
3.5	Klonierungstechniken	29
3.5.1	Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme	29
3.5.2	Dephosphorylierung	29
3.5.3	Ligation von DNA	30
3.6	Bakterienkultur	30
3.6.1	Kultivierung und Konservierung von E. coli-Stämmen	30
3.6.2	Herstellung kompetenter Zellen	30
3.6.3	Transformation von E. coli	31
3.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
3.7.1	Amplifikation von DNA	32
3.7.2	Kolonie-PCR mit E. coli	32
3.8	Sequenzierung von DNA	33
3.9	Klonierung und Transformation der SH3-Konstrukte	34
3.10	SDS-PAGE nach Laemmli	35
3.10.1	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	37
3.11	Bestimmung der Protein- und Peptidkonzentration	37
3.11.1	Konzentrationsbestimmung mittels UV/VIS-Spektrometer	37
3.11.2	Konzentrationsbestimmung nach Bradford	37
3.11.3	Bestimmung der Peptidkonzentration mit dem BCA-Kit	38
3.12	Expression von rekombinanten Proteinen	38
3.13	Zellaufschluss	39
3.14	Proteinreinigung	40
3.14.1	Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose	40
3.14.2	Abspaltung des Fusionspartners mit Thrombin bzw. mit PreScission	41
3.14.3	Größenausschlusschromatographie zur Trennung der Spaltprodukte	41
3.15	Phagendisplay	42
3.16	Anti-Phagen-ELISA - Bestimmung der relativen Lck-SH3-Bindungsaktivität einzelner Phagenklone	44
3.17	PepSpot-Membran-Technologie	44
3.17.1	Inkubation der PepSpot-Membran	45
3.17.2	Regeneration der PepSpot-Membran	45
3.18	Fluoreszenzspektroskopische Messung	46
3.18.1	Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D) aus den Fluoreszenzdaten	47
3.19	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie	48
3.20	NMR-Spektroskopie	49
3.20.1	Probenvorbereitung für die NMR-Messung	49
3.20.2	NMR-Messbedingungen und Spektrenauswertung	49
3.20.3	Bestimmung der Differenz der chemischen Verschiebung bei Peptid-Bindung	50
3.20.4	Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D) aus NMR-Kompetitionsexperimenten	50

4	Ergebnisse	52
4.1	Klonierung der Glutathion-S-Transferase-SH3-Fusionsproteine	52
4.2	Expression und Reinigung der SH3-Domänen	53
4.3	Identifizierung von Peptiden mit Lck-SH3-Bindungseigenschaften	55
4.4	Bindungsanalyse der Phagendisplay-Peptide (PD-Pptide) und deren Varianten mittels der PepSpot-Membran	57
4.4.1	Bindung der Lck-SH3-Domäne an PepSpots der Phagendisplay-Peptide und deren Varianten	59
4.4.2	Untersuchung der Bindungsspezifität der PD-Peptide und deren Varianten	60
4.4.3	Optimierung der Bindungsaffinität des Peptides PD1-R an die Lck-SH3	62
4.5	Bestimmung der Ligandenspezifität aus Sequenzen von physiologischen Interaktionspartnern der Lck-SH3-Domäne	64
4.5.1	Gemeinsame Sequenzelemente der physiologischen Lck-SH3-Interaktionspartner	68
4.6	Lck-SH3-Bindung an bekannten in vitro selektierten Konsensus-Peptiden	70
4.7	Bestimmung der Bindungsaffinität der Phagendisplay-Peptide PD1 und PD1-R an die Lck-SH3-Domäne	71
4.8	Untersuchung der Konformation der Phagendisplay-Peptide PD1 und PD1-R und der Peptid-SH3-Komplexe	74
4.9	NMR-Spektroskopische Untersuchungen der SH3:Peptid-Interaktionen	77
4.9.1	Strukturelle Charakterisierung der Bindung von PD1 und PD1-R an die Lck-SH3-Domäne	77
4.9.2	Strukturelle Charakterisierung der Bindung von PD1 und PD1-R an die Hck-SH3-Domäne	82
4.9.3	Untersuchung der Stabilität der SH3-Peptid-Komplexe	87
4.9.4	Bindung von HIV-1 Nef an die Lck- und Hck-SH3-Domäne	89
4.9.5	Kompetition von HIV-1-Nef und PD1-R um die Lck-SH3-Bindung	90
4.9.6	Kompetition von HIV-1-Nef und PD1 um die Hck-SH3-Bindung	92
4.9.7	Bestimmung des K_D -Wertes für den HIV-1-Nef-Hck-SH3-Komplex aus den NMR-Kompetitionsexperimenten	93
5	Diskussion	96
5.1	Die Klonierung, Expression und Reinigung der SH3-Domänen von Lck, Hck, Fyn, Src, PI3K und Abl verlief erfolgreich	96
5.2	Phagendisplay führt zur Identifizierung von vier neuen Klasse-I-Liganden der Lck-SH3-Domäne	97
5.2.1	Die Peptide PD1, PD2 und PD4 sowie die Variante PD1-R gehören zu einer speziellen Gruppe von Klasse-I-Liganden, den Lig-I ⁺ -Peptiden	99
5.3	Die Analyse der „PD-Peptide“ und deren Varianten in Form immobilisierter PepSpots erlaubt einen Einblick in die Bindungsspezifität der Lck-SH3-Domäne	101
5.3.2	Alle PD-Peptid-Varianten mit Arginin-Substitution an Position P-3 zeigen eine stärkere Bindung an die Lck-SH3 als die Ausgangs-peptide	101
5.3.3	Histidin an Position P-6 der PD-Peptide ist essentiell für die Lck-SH3-Bindung und trägt zur Spezifität der Bindung bei	102
5.3.4	Die Substitutionsanalyse von PD-1-R identifiziert Peptide mit verbesserten Lck-SH3-Bindungseigenschaften	104

5.4	Die PepSpot-Analyse natürlicher Lck-SH3-Bindungspartner erlaubt die Identifizierung ihrer potenziellen Lck-SH3-Bindungsregionen	105
5.4.1	Lck-SH3 interagiert mit der Aminosäureregion 816 bis 830 von c-Cbl und bevorzugt mit drei Regionen von Cbl-b	106
5.4.2	Lck-SH3 bindet an die Aminosäureregion 34 bis 48 von Sam68, einem RNA-Bindungsprotein	107
5.4.3	Lck-SH3 interagiert mit der Aminosäureregion 62 bis 76 des menschlichen Fas-Liganden, jedoch nicht mit der entsprechenden Region von FasL aus Maus	108
5.5	Alle untersuchten nativen Lck-SH3-Bindungspartner können als Klasse II-Liganden eingestuft werden und binden in entgegen gesetzter Orientierung wie die PD-Peptide	109
5.5.1	In vitro werden Klasse-I-Liganden selektiert, in vivo kommen nur Klasse-II-Liganden vor	110
5.6	PD-Peptide PD1 und PD1-R interagieren mit den SH3-Domänen	113
5.6.1	PD1 und PD1-R bilden schon als freie Peptide eine PPII-Helix aus	113
5.6.2	PD1 und PD1-R binden neben Lck-SH3 auch die SH3-Domänen anderer Src-Typ-Kinasen	114
5.6.3	PD1 und PD1-R binden an die für SH3-Liganden typischen Regionen auf der Lck-SH3-Domäne	116
5.6.4	PD1 und PD1-R binden im oberen nanomolaren Bereich an die Hck-SH3-Domäne	118
5.7	Die Strukturbestimmung der SH3:PD-Komplexe ist möglich	120
5.8	HIV-1-Nef interagiert mit den SH3-Domänen von Lck und Hck	122
5.8.1	PD1 und PD1-R verdrängen HIV-1-Nef aus bestehenden Lck-SH3:Nef- und Hck-SH3:Nef-Komplexen	123
5.9	Ausblick	126
6	Literatur	128
7	Anhang	139
7.1	Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	139
7.2	Abbildungsverzeichnis	142
7.3	Tabellenverzeichnis	144
7.4	DNA- und Proteinsequenzen	145
7.4.1	Abl-SH3	145
7.4.2	Fyn-SH3	145
7.4.3	Hck-SH3	145
7.4.4	Lck-SH3	146
7.4.5	PI3K-SH3	146
7.4.6	Src-SH3	146

1 Einleitung

1.1 Das spezifische Immunsystem

Das Funktionsprinzip des erworbenen Immunsystems ist das spezifische Erkennen eines Antigens und die Fähigkeit zwischen körpereigenen und körperfremden Substanzen zu unterscheiden. Verantwortliche Zellen dafür sind Lymphocyten, die aus im Knochenmark angesiedelten Stammzellen entstehen. Lymphocyten werden in B- und T-Zellen eingeteilt.

Die B-Zellen vermitteln die humorale Immunantwort. Diese Immunantwort richtet sich gegen freie Antigene. Die Vielfalt vorhandener B-Zellen erklärt sich durch die zahlreiche Kombination einiger weniger Gensegmente für die variable Region des B-Zell-Rezeptors (BCR). Erkennt eine B-Zelle ihr Antigen über den spezifischen BCR, der dieselbe Spezifität wie der Antikörper aufweist, so wird das Antigen aufgenommen und in Peptidfragmente zerlegt. Die Peptidfragmente werden anschließend mit den Haupthistokompatibilitäts-Komplex (MHC) Klasse-II-Molekülen auf ihrer Oberfläche den CD4-T-Zellen präsentiert. Nach der spezifischen Erkennung durch die CD4-T-Zellen wird die B-Zelle wiederum von der CD4-T-Zelle aktiviert. Die B-Zelle proliferiert zur Plasmazelle und produziert schließlich Antikörper.

Die T-Zellen vermitteln die zelluläre Immunantwort. Diese Immunantwort richtet sich gegen zellgebundene Antigenfragmente. Die Reifung der T-Zellen findet im Thymus statt, wobei als Folge CD4- oder CD8-T-Zellen entstehen. Während der Reifung findet eine positive Selektion statt, wobei nur diejenigen Lymphocyten erhalten werden, die in der Lage sind, an körpereigene MHC-Proteine zu binden. Autoreaktive Zellen, die eine Reaktion gegen körpereigene Antigene entwickeln könnten, werden negativ selektiert.

Die Erkennung der Antigenfragmente erfolgt über den spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) (Kapitel 1.1.1). Für die Erkennung ist es notwendig, dass das Antigen von körpereigenen MHC-Proteinen präsentiert wird. Es gibt dabei zwei Klassen von MHC-Proteinen: die MHC-I- und die MHC-II-Moleküle. CD4-T-Zellen erkennen nur die über Klasse-II-MHC-Moleküle präsentierten Antigene. Diese Moleküle befinden sich u. a. auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen. CD8-T-Zellen hingegen können nur durch

Klasse-I-MHC-Moleküle präsentierte Antigene erkennen. MHC-I-Moleküle werden unterschiedlich stark auf der Zelloberfläche von kernhaltigen Zellen exprimiert.

CD4- und CD8-Moleküle werden aufgrund ihrer Funktion und ihrer Assoziation mit dem TCR auf der T-Zell-Oberfläche während der Antigenerkennung auch als Corezeptoren bezeichnet. Für eine Zellaktivierung braucht die T-Zelle ein zweites, costimulierendes Signal. Dieses zweite Signal muss von derselben APC geliefert werden, auf der die T-Zelle ihr spezifisches Antigen erkennt. Als costimulierende Moleküle auf den APC kommen vor allem die Glykoproteine B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) vor. Der Rezeptor für diese Moleküle auf den T-Zellen ist das Molekül CD28. Erkennt eine T-Zelle ihr spezifisches Antigen über den TCR und seinen Corezeptor CD4 bzw. CD8, wird durch die zusätzliche Bindung der B7-Moleküle an CD28 das Signal zur Proliferation und Differenzierung der T-Zellen gegeben.

Nach der Aktivierung durch APCs differenzieren die CD8-T-Zellen zu cytotoxischen Zellen. Cytotoxische Zellen können Zellen direkt zerstören, die von Krankheitserregern befallen sind. Die CD4-T-Zellen entwickeln sich entweder zu T_H1 -Zellen oder zu T_H2 -Zellen (T-Helferzelle). T_H1 -Zellen können Makrophagen aktivieren. T-Helferzellen regen die B-Zellen zur Antikörperproduktion an (Janeway et al. 1995).

1.1.1 Der T-Zell-Rezeptor-Komplex

Die Spezifität der Antigenerkennung bei T-Zellen wird durch den TCR-Komplex vermittelt. Der TCR-Komplex ist ein Proteinkomplex, der aus einem Heterodimer, einer α - und β -Kette, besteht, die über eine Disulfidbrücke kovalent verbunden sind (Abbildung 1-1). Jede der Ketten besteht aus einer hypervariablen V-Region, die die Kontaktstelle für den MHC-Peptid-Komplex bildet, und einer konstanten C-Region, die die TCR-Ketten in der Membran verankern. Die Vielfalt der Zellen erfolgt wie bei den B-Zellen durch eine zufällige Neuordnung weniger Gensegmente für die variable Region des TCRs.

Neben den Proteinketten des TCR und den Corezeptoren CD4 bzw. CD8 bildet der mehrkettige CD3-Komplex einen weiteren Bestandteil des Rezeptorkomplexes. Der CD3-Komplex besteht aus den Untereinheiten CD3 γ , CD3 δ und CD3 ϵ . Der CD3-Komplex besitzt einige ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motif), die potenzielle Tyrosin-Phosphorylierungsstellen darstellen. Darüber hinaus ist ein viertes Molekül, die so genannte ζ -Kette, mit dem Rezeptor assoziiert.

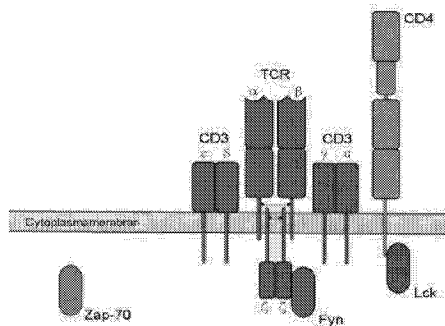


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung des T-Zell-Rezeptor (TCR)-Komplexes einer CD4-T-Zelle (verändert nach Janeway et al. 1995).

Der TCR-Komplex besteht aus dem TCR (α - und β -Kette), dem CD3-Komplex (γ -, δ -, ϵ - und ζ -Kette) und dem Corezeptor CD4. Bei Antigenerkennung wird die ζ -Kette durch die Tyrosin-Kinasen Lck und Fyn phosphoryliert, woraufhin eine Assoziation von ZAP-70 an die ζ -Kette erfolgt. Nach Phosphorylierung von ZAP-70 durch Lck und Fyn, wird eine Kaskade von Signalen eingeleitet.

Um eine T-Zelle über den TCR zu aktivieren, ist eine Präsentation des Antigens zusammen mit dem MHC-Komplex erforderlich. Weiterhin notwendig für die Aktivierung des TCRs ist die Erkennung der MHC-Moleküle durch die Corezeptoren CD4 bzw. CD8 und die Co-Stimulierung durch die B7-Moleküle. Dabei wird eine Signalkaskade in das Zellinnere ausgelöst. Da keine der Komponenten des TCR-Komplexes eine eigene Enzymaktivität besitzt, werden Protein-Tyrosin-Kinasen an den Rezeptor rekrutiert. Diese Protein-Tyrosin-Kinasen übertragen das Aktivierungssignal ins Zellinnere. Im ersten Schritt der Signalübertragung werden die Protein-Tyrosin-Kinasen Lck (auch p56lck) und Fyn (auch p59fyn) durch die Rezeptor-Tyrosin-Phosphatase CD45 aktiviert. Lck ist konstitutiv mit der cytoplasmatischen Domäne der Corezeptoren CD4 und CD8 assoziiert. Fyn befindet sich im Cytoplasma und lagert sich nach Antigenerkennung an die cytoplasmatischen Domänen der CD3 ζ - und CD3 ϵ -Kette an. Sowohl Lck als auch Fyn phosphorylieren dann die ITAMs der CD3 ζ - und CD3 ϵ -Ketten, die dann eine zweite cytosolische Protein-Tyrosin-Kinase, das 70 kDa große ζ -assoziiertes Protein (ZAP-70) binden kann. Durch die anschließende Phosphorylierung von ZAP-70 durch Lck und Fyn wird die Signalkaskade weitergeleitet, die am Ende eine Freisetzung von Effektormolekülen bewirkt. Bei den Effektormolekülen handelt es sich u. a. um Cytotoxine und Cytokine. Cytotoxine werden von CD8-T-Zellen freigesetzt. Cytokine werden von CD4-T-Zellen sezerniert. CD4-T-Helferzellen sezernieren u. a. Interleukin-2, das einerseits B-Zellen zur Antikörperproduktion stimuliert und andererseits die Proliferation der T-Zelle bewirkt.

1.2 Src-Typ Protein-Tyrosin-Kinasen

Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) übernehmen als wichtige Elemente der Signaltransduktion die Übertragung der Information des aktivierten Rezeptors in das Zellinnere. Auf diese Weise sind sie an der Regulation von Zellantwort, Zellwachstum und Differenzierung beteiligt. Sie verfügen über einen gemeinsamen enzymatischen Mechanismus der Übertragung von Phosphatgruppen auf Tyrosinreste von Proteinen. Durch die Phosphorylierung werden die Proteine im Sinne einer Weitergabe des Signals aktiviert (Krauss 1997).

PTK können in zwei Hauptgruppen unterteilt werden. In der ersten Gruppe werden Kinasen mit eigener Rezeptorstruktur zusammengefasst (Rezeptor-Tyrosin-Kinasen). Sie besitzen einen durch die Zellmembran reichenden, transmembranen Anteil, an den ein extrazellulärer Ligand direkt binden kann. Die zweite Gruppe umfasst Protein-Tyrosin-Kinasen, die nicht integraler Bestandteil von Transmembranrezeptoren sind. Diese „Nicht-Rezeptor“-Tyrosin-Kinasen sind zumindest zeitweise cytoplasmatisch lokalisiert oder sind auf der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran mit Transmembranrezeptoren assoziiert. Sie werden auch als cytoplasmatische Tyrosin-Kinasen bezeichnet. Zu diesen PTKs gehört die Familie der Src-Typ Kinasen, die neun gut charakterisierte Mitglieder umfasst: Src, Lyn, Fyn, Yes, Yrk, Hck, Fgr, Blk und Lck (Perlmutter et al. 1988). Aktuell wurde diese Familie mit Brk und Frk um zwei weitere Mitglieder erweitert (Roskoski 2004).

Src-Typ Kinasen bestehen aus mehreren strukturellen Domänen (Abbildung 1-2). Am aminoterminalen Ende befindet sich die so genannte „unique-Domäne“. Diese unique-Domäne ist aufgrund fehlender Sequenzhomologien für jede Kinase einzigartig. Durch posttranslationale Myristoylierung der unique-Domäne erfolgt die Assoziation der Kinase an die Zellmembran. An die unique-Domäne schließen sich bei den Src-Kinasen zwei konservierte Abschnitte an, die Src-Homologie 3- (SH3) und Src-Homologie 2- (SH2) Domänen. Diese Domänen haben regulatorischen Aufgaben und fungieren u. a. als Proteinmodule, um die Kinase-Domäne in die Nähe ihrer Zielmoleküle zu bringen. SH3-Domänen binden Liganden mit prolinreichen Motiven, die eine PPII-Helix-Konformation annehmen können (Yu et al. 1994; Feng et al. 1995; Kuriyan et al. 1997). SH2-Domänen interagieren mit Liganden mit phosphorylierten Tyrosinresten (Eck et al. 1994). Am carboxyterminalen Teil der Kinase befindet sich die Kinase-Domäne, die die Kinaseaktivität vermittelt. Sie besteht aus zwei Einheiten, die als „Lappen“ bezeichnet werden.

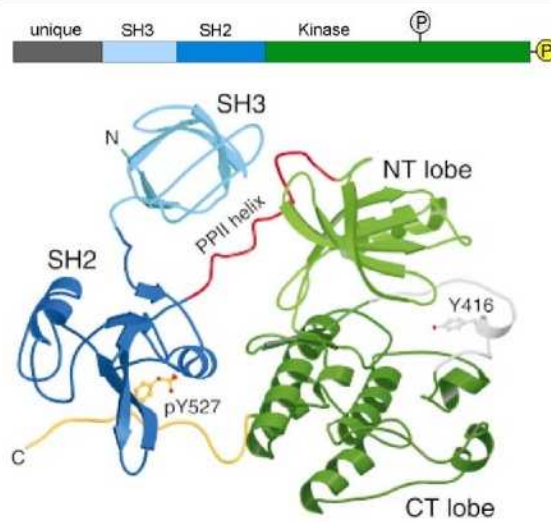


Abbildung 1–2: Kristallstruktur der Src-Typ Tyrosin-Kinase im inaktiven Zustand (aus Xu et al. 1997).

Die SH3-Domäne ist hellblau und die SH2-Domäne blau dargestellt. Die Kinase-Domäne ist grün markiert. Die Linkerregion zwischen der SH2-Domäne und der Kinase-Domäne (rot) bindet in Form einer PPII-Helix an die SH3-Domäne. Der phosphorylierte Tyrosinrest 527 am Carboxy-Terminus (gelb) bindet an die SH2-Domäne. Der Tyrosinrest 416 in dem Aktivierungs-Loop (grau) ist nicht phosphoryliert.

Die Kristallstrukturen von Src (Xu et al. 1997) und Hck (Sicheri et al. 1997) im inaktiven Zustand wurden bestimmt (Abbildung 1–2), wobei die unique-Domäne deletiert war. In beiden Fällen war der carboxyterminale Tyrosinrest (Y522 bei Hck, Y527 bei Src) phosphoryliert. Der Tyrosinrest im Aktivierungs-Loop (Y411 bei Hck, Y416 bei Src) dagegen war nicht phosphoryliert. Es scheint, dass die Regulation der Kinaseaktivität von Src und Hck sowohl durch diese beiden Tyrosin-Phosphorylierungsstellen als auch durch die SH2- und SH3-Domäne erfolgt. Die Phosphorylierung von Y522 bei Hck bzw. von Y527 bei Src führt dazu, dass dieser phosphorylierte Tyrosinrest mit der SH2-Domäne interagiert. Dies führt zur Inaktivierung der Kinase („geschlossene Form“). Die geschlossene Form der Kinase wird durch die Bindung der SH3-Domäne an die SH2-Kinase-Linkerregion, die eine PPII-Helixstruktur ausbildet, unterstützt. Diese Linkerregion ist zwischen der SH2-Domäne und der Kinase-Domäne lokalisiert. In dieser Form sind die SH2- und SH3-Domäne an die Kinase-Domäne angelagert und bewirken eine Konformationsänderung der Kinase-Domäne, so dass das aktive Zentrum nicht zugänglich ist (Roskoski 2004). Liegt die Kinase in der „offenen Form“ vor, so wird durch die Phosphorylierung des Tyrosinrestes im Aktivierungs-Loop (Y411 bei Hck, Y416 bei Src) die Kinase aktiviert (Sicheri et al. 1997; Roskoski 2004).

1.3 Die Lymphocyten-spezifische Kinase Lck

Die erste nachweisbare Veränderung innerhalb der T-Zelle nachdem ein Antigen an den TCR gebunden hat, ist die Phosphorylierung von Tyrosinresten (June et al. 1990). Diese

Phosphorylierung durch Protein-Tyrosin-Kinasen startet die Signalkaskade in das Innere der Zelle. Von besonderer Bedeutung für die Weiterleitung ist die Assoziation der Lymphocyten-spezifischen Kinase Lck an die cytoplasmatische Domäne der Corezeptoren CD4 bzw. CD8 (Rudd et al. 1988; Veillette et al. 1988; Rudd et al. 1989; Shaw et al. 1989; Shaw et al. 1990), durch die eine optimale Antigenstimulation möglich ist (Glaichenhaus et al. 1991; Sefton 1991; Straus et al. 1992; Isakov 1998). Da die Lck-Corezeptor-Interaktion am Anfang der Signalübertragung steht, nimmt sie eine Schlüsselrolle ein. Durch die Weitergabe des Rezeptorsignals ist die Lck an der Aktivierung anderer Kinasen und Adaptormoleküle der Signalkaskade und damit an der Koordination der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt. Wird die Aktivität der Kinasen inhibiert, verhindert das die Aktivierung der Zelle, weil das Signal den Zellkern nicht erreicht (June et al. 1990). So konnten *lck*-defiziente Jurkat-T-Zellen beispielsweise nicht mehr über den TCR stimuliert werden (Straus et al. 1992). Eine erhöhte Lck-Kinaseaktivität hat ebenfalls negative Auswirkungen auf den Organismus. So wurden erhöhte Lck-Konzentrationen und Mutationen des *lck*-Gens bei T-Zell-Leukämie und Lymphomen sowie bei T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen festgestellt (Lawrence et al. 1998).

Die Assoziation von Lck an CD4 wird durch Cysteinreste in der unique-Domäne der Lck (C20 und C23) und Cysteinreste in der cytoplasmatischen Domäne von CD4 (C420 und C422) vermittelt und durch ein Zn^{2+} -Atom koordiniert (Huse et al. 1998; Lin et al. 1998; Kim et al. 2003). Strukturelle Daten über die SH3-Domäne (Hiroaki et al. 1996; Briese et al. 2001; Briese et al. 2003), das SH3-SH2-Domänenpaar (Eck et al. 1994) sowie über die Kinase-Domäne der Lck (Yamaguchi et al. 1996) sind vorhanden (Abbildung 1-3). Es konnte gezeigt werden, dass die unique-Domäne in löslichem, ungebundenen Zustand unstrukturiert vorliegt (Briese et al. 2003) und nach Bindung an CD4 und CD8 strukturiert wird (Kim et al. 2003).

Für die Lck sind Interaktionen mit vielen Proteinen beobachtet worden. Neben den Interaktionspartnern für die Lck-SH2-Domäne (Amrein et al. 1992; Couture et al. 1996) oder für andere Bereiche der Lck (Hatakeyama et al. 1991; Stefanova et al. 1991) sind auch zahlreiche zelluläre SH3-Bindungspartner gefunden worden. Dazu gehören die Proteine c-Cbl (Reedquist et al. 1994; Hawash et al. 2002), CD28 (Holdorf et al. 1999), PI3K (Prasad et al. 1993), HS1/LckBP1 (Takemoto et al. 1995), SLP-76 (Sanzenbacher et al. 1999), CD2 (Bell et al. 1996) sowie Sos (Park et al. 1998), ADAM15 (Poghosyan et al. 2002), MAP-Kinase (August et al. 1996), hDlg (Hanada et al. 1997) und Sam-68 (Fusaki et al. 1997). Die Bindungsregion für Lck ist nur bei einigen dieser Proteine (ADAM15, CD2, CD28, HS1, SLP-76 und Sos) bekannt. Für die rest-

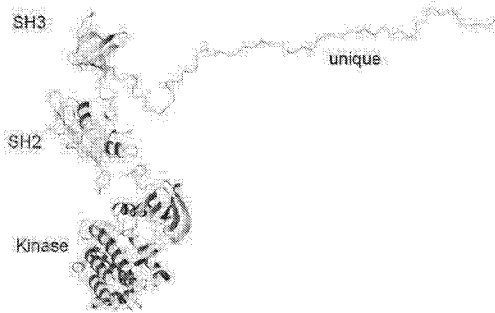


Abbildung 1–3: Struktur der Lck.

Aminoterminal befindet sich die unstrukturierte unique-Domäne, gefolgt von der SH3- und der SH2-Domäne. Carboxyterminal liegt die Kinase-Domäne. In der Abbildung ist für die unique-Domäne nur eine von nahezu unbegrenzt vielen möglichen Konformationen zu sehen. Die Abbildung der Struktur ist der Arbeit von Bries (2002) entnommen. Die Bestimmung der Struktur für die SH3- und unique-Domäne wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Lars Bries (2002) durchgeführt (1KIK.PDB). Die Struktur für die SH2- und Kinase-Domäne sind der Protein-Databank entnommen (1LCK.PDB & 1QPC.PDB).

lichen Interaktionspartner sind bis dato keine Daten über die Bindungsregionen vorhanden. Auch Interaktionen von Lck-SH3 an die viralen Proteine Nef (Collette et al. 1996; Greenway et al. 1996), Tio (Albrecht et al. 1999), Tip (Biesinger et al. 1995; Schweimer et al. 2002) und NS5A (Macdonald et al. 2004) sind beobachtet worden. In diesen Fällen ist die Lck-SH3-Bindungsregion bekannt.

1.4 Struktur der Src-Homologie 3-Domäne (SH3-Domäne)

SH3-Domänen sind kleine, aus 55 bis 70 Aminosäuren bestehende, nichtkatalytische Proteinmodule, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Sie wurden in einer Vielzahl von Proteinen gefunden, die in die Regulation dynamischer Prozesse eingreifen, wie z. B. die Organisation des Cytoskeletts, die Internalisierung von Membranrezeptoren und die Transduktion von extrazellulären Signalen (Pawson et al. 1993; Musacchio 2003). Häufig sind diese Proteine mit der Plasmamembran assoziiert. Ein Strukturvergleich (Kristall- und Lösungsstruktur) von verschiedenen SH3-Domänen weist für alle SH3-Domänen eine konservierte Faltung auf, wobei Variationen in der Länge der Sekundärstruktur zu finden sind (Musacchio et al. 1994; Dalgarno et al. 1997; Musacchio 2003). SH3-Domänen bestehen aus einem β -barrel, das durch zwei jeweils dreisträngige anti-parallele β -Faltblätter gebildet wird (Abbildung 1.3). Das kleinere β -Faltblatt wird durch die Stränge β_a , einem Teil von β_b sowie β_e geformt. Das größere β -Faltblatt wird durch den Rest des Stranges β_b sowie β_c und β_d gebildet. Die β -Stränge sind durch den RT-Loop, den n-Src-Loop, den Distal-Loop und die 3_{10} -Helix verbunden. Der RT(Arg-Thr)-Loop verbindet die Stränge β_a und β_b . Der n-Src (neuronal Src)-

Loop verbindet die Stränge βb und βc und enthält in der neuronalen Form der Src SH3-Domäne eine zusätzliche Insertion innerhalb des Loops. Der Distal-Loop verbindet die Stränge βc und βd . Anstelle der 3_{10} -Helix, die die Stränge βd und βe verbindet, ist häufig ein helikaler Turn zu finden (wie im Fall der Lck-SH3-Domäne; Abbildung 1.4). Die Ligandenbindungsregion der SH3-Domäne wird durch Aminosäurereste geformt, die im RT-Loop, im n-Src-Loop und im helikalen Turn liegen. Diese konservierten Reste bilden eine hydrophobe Region, in der die aromatischen Seitenketten zusammengelagert vorliegen.

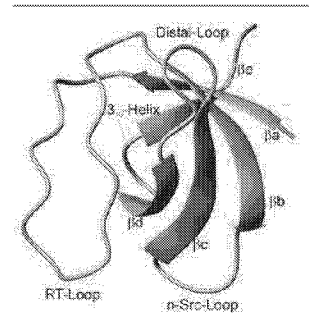


Abbildung 1-4: Struktur der Lck-SH3-Domäne (1KIK.PDB).

1.4.1 SH3-Liganden und das xPxxP-Bindungsmotiv

Der erste Beweis für die Erkennung von prolinreichen Liganden durch die SH3-Domäne wurde von Baltimore und seinen Kollegen erbracht. Sie konnten zwei Proteine (3BP1 und 3BP2) als Liganden für die Abl-SH3-Domäne identifizieren (Cicchetti et al. 1992; Ren et al. 1993). Aus weiteren Untersuchungen wurde deutlich, dass SH3-Liganden als Bindungsmotiv das Motiv xPxxP enthalten (P = invariantes Prolin, x = beliebige Aminosäure). Die ersten dreidimensionalen Strukturen von Komplexen von SH3-Domänen mit prolinreichen Liganden zeigen, dass das „Kern“-Motiv xPxxP der SH3-Liganden die Konformation einer linksgängigen Polyprolin-Helix vom Typ II (PPII) aufweist (Feng et al. 1994; Lim et al. 1994; Musacchio et al. 1994; Yu et al. 1994). Die PPII-Helix ist durch eine perfekte dreifache Rotations-Symmetrie charakterisiert, so dass die Reste i und $i+3$ auf derselben Seite der Helix anzutreffen sind (Abbildung 1-5).

Prolinreiche SH3-Peptid-Liganden werden anhand ihrer Sequenz in zwei Klassen unterteilt. Klasse-I-Liganden haben die Konsensus-Sequenz +pxPpP und Klasse-II-Liganden die Sequenz xPpPp+ (P = konserviertes Prolin, p = ist in den meisten Fällen von einem Prolin besetzt, + = basische Aminosäure, meist Arginin, x = aliphatische Aminosäure) (Feng et al. 1994; Lim et al. 1994; Musacchio et al. 1994; Yu et al. 1994; Agrawal et al. 2002). Aufgrund ihrer Pseudosymmetrie können die Klasse-I- und Klasse-II-Liganden in gegensätzlicher Orientierung an die SH3-Domänen binden. So binden Klasse-I-Liganden mit ihrem Aminoterminal und

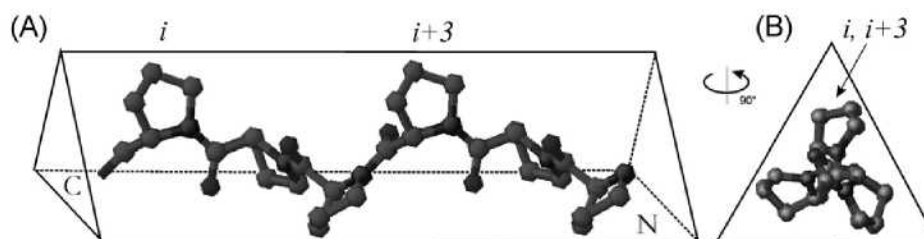


Abbildung 1-5: Struktur einer PPII-Helix bestehend aus Prolinen.

(A) Durch eine dreifache Rotations-Symmetrie bilden jeweils drei Aminosäurereste eine Windung, so dass die Aminosäurereste i und $i+3$ immer auf derselben Seite zu finden sind. (B) Seitenansicht der Helix um 90° gedreht. Die Aminosäurereste i und $i+3$ kommen zur Deckung.

Klasse-II-Liganden mit ihrem Carboxyterminus an den RT-Loop. Die wichtigsten Kontakte zwischen dem Ligand und der SH3-Domäne werden von den beiden xP-Dipeptiden des Liganden (Position P_{-1} und P_0 sowie P_2 und P_3) zur SH3-Domäne geknüpft (für die Positionszuordnung siehe Abbildung 1-6 B). Weiterhin wird die Bindung vom basischen Rest (+) des Liganden an Position P_3 beeinflusst. Die Orientierung des Liganden wird durch die Lage dieses basischen Restes relativ zum xPxxP Kern-Motiv (amino- oder carboxyterminal), der in den meisten Fällen von einem Arginin besetzt ist, bestimmt. Im Komplex wird zwischen dem basischen Rest des Liganden und einer konservierten Carboxylgruppe einer negativ-geladenen Aminosäure der SH3-Domäne eine Salzbrücke gebildet. Aufgrund der Konformation der PPII-Helix, die durch drei Reste pro Windung charakterisiert ist, sind die beiden Proline in dem xP-Dipeptid auf der gleichen Seite der Helix lokalisiert (Abbildung 1-6). Aus dem gleichen Grund sind die beiden x-Aminosäuren im xP-Motiv auf einer anderen Seite der Helix zu finden. Wie aus der Abbildung 1-6 ersichtlich, sind diese beiden Seiten der PPII-Helix der SH3-Domäne zugewandt und bilden die Kontaktfläche zur SH3-Domäne. Die Reste an den Positionen P_2 und P_1 dagegen zeigen von der SH3-Oberfläche weg. Proline an diesen Stellen tragen zur Stabilisierung der PPII-Helix bei. Meist wird die Position P_1 , die sich zwischen den beiden xP-Dipeptiden befindet und die Distanz zwischen den beiden Bindungstaschen überbrückt, von einem Prolin besetzt. Sie wird dann auch als „Gerüstrest“ bezeichnet (Feng et al. 1995). Im Fall der Klasse-I-Liganden sind die beiden konservierten Proline an den Positionen P_0 und P_3 und bei den Klasse-II-Liganden an den Position P_{-1} und P_2 lokalisiert. Der basische Rest geht in beiden Fällen eine Bindung mit demselben negativen Rest der SH3-Domäne ein, so dass er immer an der Position P_3 zu finden ist, und somit, wie schon erwähnt, die Orientierung des Liganden beeinflusst.

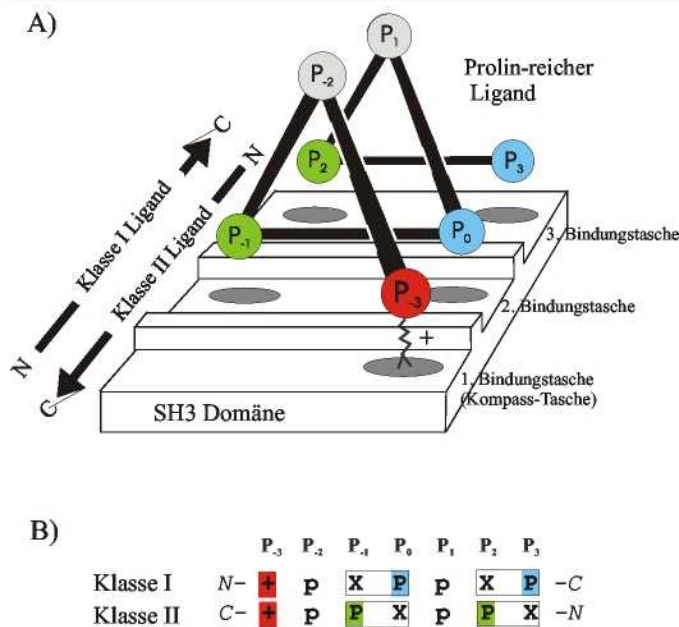


Abbildung 1-6: Schematische Darstellung der Bindung der PPII-Helix an die SH3-Domäne (A) und Konsensus-Sequenz der Klasse-I- und Klasse-II-Liganden in Bezug auf die Aminosäure-Position (B).

In (A) ist die PPII-Helix relativ zur SH3-Bindungsregion schematisch dargestellt. Zwei Seiten der Helix sind der SH3-Domäne zugewandt und bilden die Kontaktstellen zur SH3-Domäne. Die Reste auf der dritten Seite können keine Kontakte mit der SH3-Domäne knüpfen. Ihre Rolle ist es, die PPII Helix zu stabilisieren. Die Pfeile markieren die Orientierung

der SH3-Liganden in Bezug auf die SH3-Domäne je nach Klassenzuordnung. Klasse-I-Liganden binden mit dem Aminoterminal an die 1. Bindungstasche und Klasse-II-Liganden umgekehrt mit dem Carboxyterminus. In (B) ist die Konsensus-Sequenz der Klasse-I- und Klasse-II-Liganden mit der jeweiligen Positionsbezeichnung zu sehen. Diese erfolgte nach Lim et al. (1994). In beiden Abbildungen ist der basische Rest rot markiert. Die beiden Reste, die eingerahmt sind, kennzeichnen die XP-Dipeptide, die mit der zweiten und dritten Bindungstasche der SH3-Domäne interagieren. Bei den Klasse-I-Liganden sind die beiden konservierten Proline (blau) an den Positionen P₀ und P₃ zu finden. Im Fall der Klasse-II-Liganden liegen die konservierten Proline (grün) an den Positionen P₁ und P₂.

Trotz dieser Gemeinsamkeiten der SH3-Liganden können sie eine Spezifität aufweisen und mit unterschiedlicher Affinität an verschiedene SH3-Domänen binden. Die Spezifität und die unterschiedliche Affinität der Interaktionen sind auf zusätzliche Reste zurückzuführen, die sich amino- und carboxyterminal vom xPxxP-Motiv befinden (Feng et al. 1995; Musacchio 2003).

Die Liganden-Bindungsregion der SH3-Domänen ist durch zwei xP-Bindungstaschen und durch die Kompass-Bindungstasche charakterisiert, die vom RT- und n-Src-Loop (Feng et al. 1994; Yu et al. 1994) umgeben sind. Die xP-Bindungstaschen binden jeweils ein xP-Dipeptid (Position P₁ und P₀ sowie P₂ und P₃) über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den konservierten Aromaten des Proteins und den aliphatischen Seitenketten des Liganden. Die Kompass-Bindungstasche enthält meistens einen negativen Rest, durch die eine Interaktion mit dem basischen Rest des Liganden über eine Salzbrücke erfolgt. Dieser negative Rest ist verantwortlich

für die Präferenz von Arginin in den SH3-Liganden. Eine Ausnahme bildet die Abl-SH3, die anstelle des negativen Restes einen neutralen Rest enthält, und somit Präferenzen für Liganden mit einem aromatischen Rest an der und P₃-Position aufweist (Musacchio et al. 1994; Pisabarro et al. 1998).

1.5 HIV-1-Nef: Ein viraler SH3-Ligand

Die Krankheit des erworbenen Immunschwäche-Syndroms (AIDS) ist gekennzeichnet durch eine Immunodefizienz, das mit schweren opportunistischen Infektionen, neurologischen Ausfällen, dem Auftreten maligner Tumore sowie einer stetigen Abnahme der CD4⁺-T-Zellen assoziiert ist (Raulin 2002). Auslöser von AIDS ist das humane Immundefizienzvirus (HIV), das zur Familie der Retroviren gehört. Alle Retroviren enthalten in ihrem Genom die Strukturgene *gag*, *pol* und *env*, die für die Vermehrung des Virus erforderlich sind. HIV verfügt zusätzlich über sechs weitere, teilweise überlappend organisierte Leserahmen, die für die akzessorischen Proteine kodieren. Unter anderem werden die regulatorischen Proteine Rev und Tat exprimiert. Weiterhin werden die akzessorischen Proteine Vif, Vpr und Vpu (in HIV-1) bzw. Vpx (in HIV-2) sowie Nef gebildet (Frankel et al. 1998).

Das *nef*-Gen ist innerhalb der Immundefizienzviren des Menschen (HIV) und der Primaten (SIV) hoch konserviert. Das HIV-1-Nef-Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von AIDS. HIV-1-Nef wurde ursprünglich zu den „nichtessentiellen“ Proteinen zugeordnet und hat seinen irreführenden Namen „**N**egativ **F**aktor“ daher, dass anfangs über eine Funktion der Herabregulierung der Virusvermehrung berichtet wurde (Luciw et al. 1987). Diese Hypothese wurde aber später durch verschiedene Untersuchungen widerlegt.

Das HIV1-Nef-Protein ist ein 27 kDa großes Protein, das aufgrund seiner Myristoylierung am aminoterminalen Ende mit der Plasmamembran assoziieren kann. Nef besitzt eine Vielzahl an scheinbar unabhängigen Funktionen *in vitro* und ist absolut notwendig für die virale Pathogenität *in vivo*. Es wurde gezeigt, dass ein funktionales *nef*-Gen wichtig für die Entwicklung von AIDS in SIV-infizierten Rhesus-Affen ist (Kestler et al. 1991). Affen, die mit einer abgeschwächten Virusform, die Deletionen im *nef*-Gen besaßen, infiziert worden waren, wiesen eine geringe Viruslast auf und zeigten keine AIDS-typischen Symptome. Sie entwickelten sogar eine Resistenz gegenüber dem pathogenen SIV-Wildtyp (Daniel et al. 1992). Die kritische Rolle von Nef bei der

Entwicklung von AIDS im Menschen wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass einige Langzeitüberlebende mit einem Virus infiziert waren, in dem eine natürliche Deletion im *nef*-Gen vorhanden war (Deacon et al. 1995; Kirchhoff et al. 1995). Diese Personen zeigten keine klinischen oder immunologischen Zeichen von Immunschwäche, obwohl sie über ein Jahrzehnt lang HIV seropositiv waren. Hanna et al. (1998) konnten zeigen, dass in transgenen Mäusen die Expression von Nef alleine in den CD4⁺-T-Zellen ausreichend war, um AIDS-ähnliche Symptome hervorzurufen.

Über 40 mutmaßliche Nef-Bindungspartner wurden gefunden, deren Funktionen in zwei Gruppen geteilt werden können: Proteine, die an der Zielsteuerung von Oberflächenrezeptoren involviert sind, und Proteine, die als Signalmoleküle in der TCR-Umgebung fungieren (Arold et al. 2001). Die Bindungsregionen innerhalb von Nef sind für einige dieser Proteine bestimmt worden (Abbildung 1-7). Zur Zeit können Nef drei mutmaßliche Hauptfunktionen zugeordnet werden: der Abbau von Zelloberflächen-Rezeptoren, die Erhöhung der viralen Infektiosität und der viralen Produktion sowie die Störung der Signaltransduktion (Marsh 1999). Die molekularen Mechanismen der meisten dieser Effekte sind noch nicht ganz verstanden.

Nef führt zur Internalisierung der CD4- und MHC-I-Moleküle von der Zelloberfläche und die anschließende Degradation dieser Moleküle (Garcia et al. 1992; Goldsmith et al. 1995; Salghetti et al. 1995). CD4-Moleküle dienen dem Virus bei der Infektion als Hauptrezeptor zum Eintritt in die Zelle, wobei eine Interaktion von CD4 mit dem viralen Hüllprotein gp120 stattfindet. Der Abbau der CD4-Moleküle von der Zelloberfläche soll vermutlich eine Superinfektion durch weitere Viruspartikeln verhindern (Benson et al. 1993), was zum Tod der Zelle führen würde. Weiterhin soll verhindert werden, dass die gp120-Hüllproteine an der Oberfläche von neu gebildeten Viruspartikeln beim Austritt aus der Zelle mit den CD4-Molekülen an der Zelloberfläche interagieren und sie an der Membran zurückhalten. Die Herabregulierung der MHC-I-Moleküle führt dazu, dass infizierte Zellen weniger effizient vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden.

In vielen Arbeiten wurde eine Erhöhung der viralen Infektiosität durch Nef gefunden (Miller et al. 1994; Aiken et al. 1995; Pandori et al. 1996). HIV-1-Partikel, die in der Anwesenheit von Nef produziert werden, können bis zu zehn Mal infektiöser sein, als in der Abwesenheit von Nef (Miller et al. 1995). Die wichtige Bedeutung von Nef wird durch die Tatsache unterstützt, dass Nef eines der ersten HIV-Proteine ist, das in infizierten Zellen auf hohem Niveau produziert wird (Piguet et al. 1999).

Obwohl die molekularen Mechanismen noch unzureichend verstanden sind, scheint Nef drastisch in Signaltransduktionen von T-Zellen einzugreifen (Luria et al. 1991; Baur et al. 1994; Greenway et al. 1995; Marsh 1999). Da Nef selbst keine enzymatische Aktivität besitzt, wird vermutet, dass es seine Funktion durch Wechselwirkungen mit zellulären Signaltransduktionsproteinen erfüllt. Durch Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass Nef über eine prolinreiche Region in der Kern-Domäne an eine Reihe von Signalmolekülen binden kann. Durch sein P72xxP75-Motiv erfolgt die Interaktion von Nef mit den SH3-Domänen verschiedener Src-Typ Tyrosin-Kinasen (Goldsmith et al. 1995; Saksela et al. 1995; Wiskerchen et al. 1996; Iafrate et al. 1997). Dabei bindet Nef u. a. mit hoher Affinität an Hck und Lyn und mit geringerer Affinität an Lck, Fyn und Src (Arold et al. 1998). Weiterhin wird vermutet, dass die Interaktion von Nef mit den SH3-Domänen der Src-Typ-Kinasen zur Erhöhung der viralen Replikation und Infektiosität beitragen (Saksela et al. 1995).

Mittels NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie wurde Nef strukturell charakterisiert. Die Kristallstruktur der Kern-Domäne von Nef ($\Delta 2 - 57$) im Komplex mit der SH3-Domäne von Fyn (Wildtyp und R96I-Mutante) wurde gelöst (Lee et al. 1996; Arold et al. 1997). Diese Untersuchungen zeigen, dass die prolinreiche Region (As 70 - 77) von Nef in Form einer PPII-Helix an die SH3-Domäne bindet. Die Lösungsstruktur von Nef allein ($\Delta 2 - 39$, $\Delta 150 - 173$) und im Komplex mit einem Peptid aus der cytoplasmatischen Domäne von CD4 wurde mittels NMR-Spektroskopie bestimmt (Grzesiek et al. 1996; Grzesiek et al. 1997). Dabei konnte die

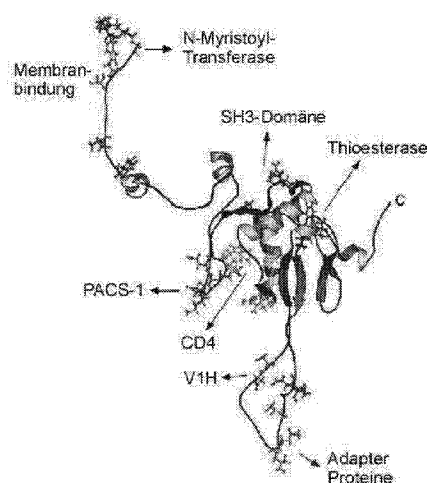


Abbildung 1-7: Struktur von HIV-1-Nef (aus Geyer et al. 2001).

Die 70 Reste am aminoterminalen Ende sind flexibel. Die Kern-Domäne von ca. 120 Resten besteht u. a. aus zwei α -Helices und einem antiparallelen β -Faltblatt aus vier β -Strängen. Innerhalb der Kern-Domäne ist noch ein flexibler Loop vorhanden. Bekannte Binde-Motive von Nef mit verschiedenen Interaktionspartnern sind gekennzeichnet.

Bindungsregion an CD4 lokalisiert werden (Abbildung 1-7). Nef besitzt aminoterminal einen strukturell flexiblen Arm von ca. 70 Resten, gefolgt von der hoch konservierten und gefalteten Kern-Domäne von ca. 120 Resten. Nur diese Kern-Domäne weist bei Nef eine stabile Faltung auf. Neben dem flexiblen, aminoterminalen Arm besitzt Nef noch einen flexiblen Loop von 30 Resten, die aus der Kern-Domäne herausragt. Somit liegt 50 % der Polypeptidkette von Nef flexibel vor. Vermutlich wird es Nef dadurch ermöglicht, gleichzeitig mit verschiedenen Proteinen zu interagieren. Innerhalb dieses Multiprotein-Komplexes könnten die flexiblen Regionen als Spacer fungieren, um die Bindungsmotive von Nef in die richtigen Positionen zu platzieren (Arold et al. 2001). Die Bindung der unterschiedlichen zellulären Partner an Nef erfolgt über eine Vielzahl von Motiven, die sowohl in den beiden Loops als auch in der Kern-Domäne liegen.

1.6 Methodischer Hintergrund

1.6.1 *In vitro*-Selektion mittels Phagendisplay

Ein Weg zur Identifizierung von Interaktionspartnern *in vitro* basiert auf der Methode des Phagendisplays. Phagendisplay ist eine Technik, die es ermöglicht, Peptid-Bibliotheken mit randomisierten Aminosäuresequenzen nach Liganden für ein bestimmtes Zielmolekül zu durchsuchen. Bei der Herstellung der Bibliothek wird ein Peptid oder Protein in Fusion mit einem Hüllprotein des M13-Bakteriophagen exprimiert. Das fusionierte Protein wird auf der Oberfläche des Phagenpartikels präsentiert („phage display“), während die DNA, welche für die Fusion kodiert, im Inneren des Virions verbleibt. Die Diversität der präsentierten Peptide wird durch die Insertion einer kombinatorisch mutierten DNA als Peptid-kodierender Teil des Fusionsgens erreicht. Auf diese Weise wird eine extrem große Zahl von Phagen erzeugt, wobei jeder Phage ein anderes Peptid präsentiert. Dies erlaubt die rasche Identifizierung von Peptid-Liganden für eine Vielzahl von Zielmolekülen (Antikörper, Enzyme, Rezeptoren, etc.) durch einen Biopanning genannten *in vitro*-Selektionsprozess (Abbildung 1-8). Durch eine Selektionsprozedur über mehrere Selektionsrunden unter definierten Versuchsbedingungen werden die Variationen selektiert, die aufgrund ihrer speziellen Sequenzzusammensetzung und Struktur Interaktionen mit dem Zielmolekül eingehen können.

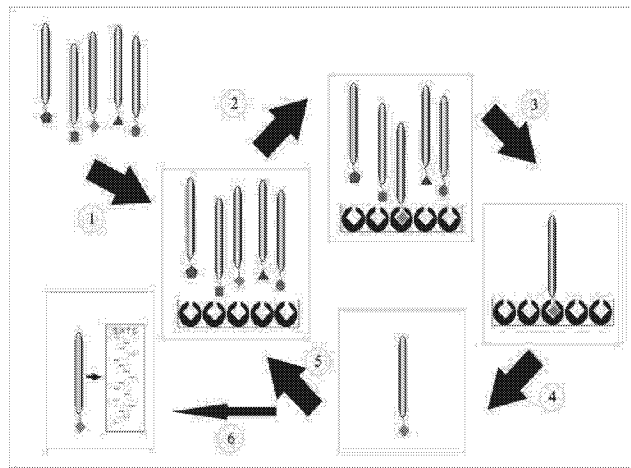


Abbildung 1-8: Prinzip des Phagendisplays (aus Wiesehan 2003).

(1) Als ersten Schritt erfolgt die Inkubation der „phage displayed“ Peptid-Bibliothek auf einer mit dem Zielprotein immobilisierten Platte. Nach Waschen der ungebundenen Phagen (2 & 3) werden die spezifisch gebundenen Phagen eluiert (4). (5) Eluierte Phagen werden amplifiziert und für weitere Biopanning- und Amplifikationsrunden eingesetzt. (6) Nach 3 - 4 Runden werden individuelle Klone mittels DNA-Sequenzierung analysiert.

In der Vergangenheit wurden mit dieser Methode Liganden für verschiedene SH3-Domänen selektiert und dadurch ihre Liganden-Präferenz beschrieben (Rickles et al. 1994; Sparks et al. 1994; Sparks et al. 1995; Sparks et al. 1998).

Zum Phagendisplay werden unterschiedliche Phagenspezies eingesetzt. Der in dieser Arbeit verwendete filamentöse M13-Phage ist ein einzelsträngiger DNA-Phage, der nur *E. coli*-Stämme infizieren kann, welche den F-Faktor enthalten (Smith 1985). Diese Phagen lysieren ihre Wirtsbakterien nicht, sondern verlassen die Bakterien, ohne diese dabei zu zerstören. Hierzu ist es erforderlich, dass die aminoterminal an Hüllproteine fusionierten Peptide durch die Plasmamembran der Wirtsbakterien geschleust werden können. Filamentöse Phagen sind bei niedrigem pH kurzzeitig stabil. Dies erlaubt die saure Elution von gebundenen Phagen beim Biopanning. Als Träger der Peptid-Bibliothek wird das Hüllprotein III (gp3) standardmäßig verwendet (Abbildung 1-9), welches an einem Ende der Phagen sitzt und in 5 Kopien vorkommt.

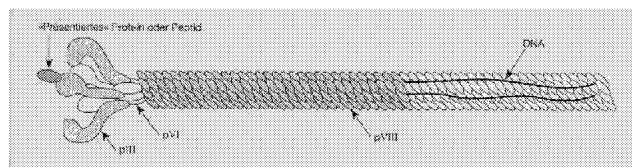


Abbildung 1-9: Schematische Darstellung eines M13-Phagen mit dem fusionierten Peptid am Hüllprotein III (von NEB-Homepage).

1.6.2 Bindungstest an immobilisierten Peptiden (PepSpot)

Eine qualitative Methode, die es ermöglicht, gleichzeitig eine Vielzahl an Protein-Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen, ist die Verwendung der PepSpot-Membran. Hunderte verschiedener Peptide werden hierbei als so genannte „PepSpots“ auf speziellen Membranen (Frank et al. 1996) vollautomatisch synthetisiert. Die Peptide sind am Carboxyterminus kovalent mit der Membran verknüpft. Nach der Inkubation der Membran mit einem beliebigen Zielprotein, dessen Wechselwirkung mit den immobilisierten Peptiden analysiert werden soll, können anhand der Spotfärbung diejenigen Peptide identifiziert werden, die eine Interaktion mit dem Testproteins eingehen. Die Stärke der Spotintensitäten ist ein Maß für die Stärke der Bindung.

Die Benutzung der Spotmembran führte bereits zur erfolgreichen Kartierung und funktionellen Charakterisierung von linearen (Korth et al. 1997) oder diskontinuierlichen Interaktionsstellen (Reineke et al. 1999). Zusätzlich erwies sich diese Technik als nützlich beim Kartieren von Rezeptor-Ligand-Kontaktstellen und intrazellulären Protein-Protein-Interaktionsstellen (Rudiger et al., 1997) (Bsp. Abbildung 1-10). Eine zusammenfassende Übersicht findet sich bei (Reinecke et al. 2001; Emili et al. 2000)

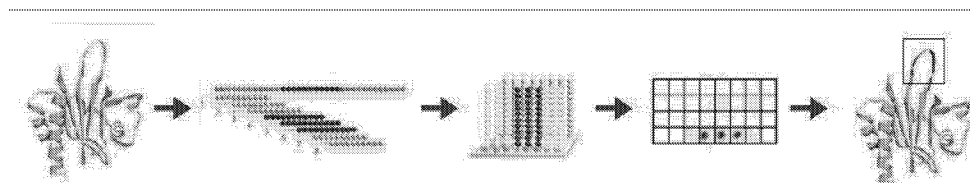


Abbildung 1–10: Kartierung einer Bindungsregion mittels Spotmembran (von Jerini-Homepage).

(1- 2) Peptide mit überlappenden Sequenzen des zu untersuchenden Proteins werden auf die PepSpot-Membran immobilisiert. Rot markiert sind Peptide, die die Interaktionsstelle bedecken. (3) Nach Inkubation mit dem Liganden zeigen die gefärbten PepSpots eine Bindung des Liganden an die entsprechenden Peptide an (4). Anhand der Spotfärbung wird die Bindungsregion des Liganden lokalisiert.

1.6.3 ^1H -Kernresonanz-Spektroskopie (^1H -NMR)

Kernresonanz-Spektroskopie (NMR) und Röntgenkristallographie sind die beiden etablierten Methoden zur Aufklärung von Proteinstrukturen mit atomarer Auflösung. Im Gegensatz zur Röntgenkristallographie, wo nur kristallisierte Festkörper analysiert werden können, arbeitet die NMR-Spektroskopie mit wässrigen Proteinlösungen, die den physiologischen Bedingungen näher

kommen. Deshalb liegen Vorteile der NMR u. a. in der Untersuchung der Dynamikeigenschaften von Molekülen und Molekülteilen, der Beobachtung intermolekularer Wechselwirkungen sowie der schnellen und einfachen Identifikation von Interaktionspartnern (SAR und STD NMR, Wang et al. 2004). Ein großer Fortschritt in der NMR-Spektroskopie war die Anwendung von ^{13}C - und ^{15}N -isotopenmarkierten Biomolekülen durch bakterielle Überproduktion der Proteine (Lemaster 1994), die eine Entwicklung von höherdimensionalen (3D/ 4D) NMR-Experimenten ermöglichten.

Charakterisierung von Protein:Ligand-Interaktionen

Neben der Bestimmung der Struktur und Dynamik von Proteinen und Protein-Ligand-Komplexen, kann mittels NMR-Spektroskopie die Interaktionen zwischen einem Protein und seinem Liganden identifiziert und charakterisiert werden.

Das NMR-Titrationsexperiment ist eine weit verbreitete und sensitive NMR-Methode, um Protein:Protein- bzw. Protein:Ligand-Interaktionen strukturell zu untersuchen und ihre Kontaktstellen zu kartieren (Otting et al. 1990; Gorlach et al. 1992; Zuiderweg 2002). Mit dieser Methode können Protein:Protein-Interaktionen mit geringerer Affinität beobachtet und charakterisiert werden. Meistens wird dafür ein Heteronukleares Einquantenkohärenz (^1H - ^{15}N -HSQC) Spektrum aufgenommen. Dafür muss das Protein ^{15}N -isotopenmarkiert sein. Ein ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum weist für jede Amidgruppe des Protein-Rückgrats ein Signal (Resonanz) auf, wobei die Lage ihrer chemischen Verschiebung von der chemischen Umgebung der jeweiligen Amidgruppe abhängt. Eine Änderung der chemischen Umgebung der Amidgruppen durch z. B. Bindung eines Liganden kann direkt als eine Verschiebung der Resonanzen im ^1H - ^{15}N -HSQC beobachtet werden (Abbildung 1-3). Für die Charakterisierung der Interaktionen werden meistens mehrere ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren des ^{15}N -markierten Proteins unter Titration eines unmarkierten Interaktionspartners aufgenommen. Vom nicht-markierten Liganden werden dabei keine Signale detektiert. Wie schon erwähnt, bewirkt die Protein:Ligand-Interaktion eine Änderung der chemischen Umgebung

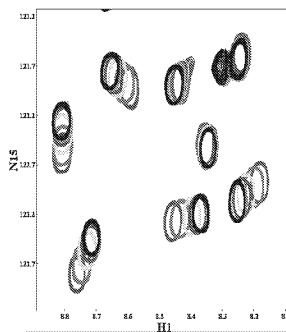


Abbildung 1-3: NMR-Titration.

Dargestellt ist ein Ausschnitt einer Überlagerung von ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren. Die Änderung der Resonanzen des Proteins bei Zugabe des Liganden (rot bis schwarz) zeigen intermolekulare Wechselwirkungen dieser beiden Partner an.

und somit eine Änderung der chemischen Verschiebung derjenigen Amidgruppe des Protein-Rückgrats, das durch die Bindung des Liganden betroffen ist. Anhand der Stärke der Änderungen kann die Bindungsregion lokalisiert werden. NMR-Titrationsexperimente erlauben in einigen Fällen neben der Kartierung der Bindungsstellen eine gute Abschätzung der Affinität und der Kinetik der Komplexe.

Eine weitere NMR-Methode zur Charakterisierung von Protein:Protein- bzw. Protein:Ligand-Interaktionen bedient sich des intermolekularen Kern-Overhauser-Effekts (NOE) (Otting et al. 1990; Grlach et al. 1992; Zuiderweg 2002). Der NOE basiert auf der dipolaren Wechselwirkung der Kernspins, die durch den Raum wirken und deren Stärke in erster Näherung proportional zu $1/r^6$ ist, wobei r der Abstand der beteiligten Kerne ist. Im NOE-Spektrum wird zwischen Protonen nur ein Signal detektiert, wenn deren Abstand nicht größer als 5 Å ist. Um die NOEs zwischen zwei Interaktionspartnern detektieren zu können, muss der Komplex langlebig genug sein. In der Regel ist die benötigte Dissoziationskonstante (K_D) kleiner als 10 μM . Entscheidend aber ist die Dissoziationsrate der beiden Interaktionspartner. Als Methode eignet sich die Aufnahme eines isotypen-gefilterten/editierten-NOESYs (Zwahlen 1997), auch als Filterexperiment bezeichnet, die es ermöglicht, nur NOEs zwischen den Interaktionspartnern zu detektieren. Dafür muss ein Partner eine Isotopenmarkierung, wie z. B. ^{15}N und ^{13}C , aufweisen.

1.7 Ziele der Arbeit

Die Lymphocytenspezifische Kinase Lck nimmt bei der Immunantwort eine besondere Stellung ein. Sie steht nach der Antigen-Stimulierung innerhalb der T-Zelle am Anfang der Signalkaskade und ist essentiell für deren Entwicklung und Differenzierung. Das Verständnis über die Interaktionen von Lck, insbesondere der SH3-Domäne der Lck mit ihren Liganden, kann als Basis für die Entwicklung neuer Medikamente dienen, um in die Aktivität der Lck einzugreifen. Bei einigen Erkrankungen wie der T-Zell-Leukämie und Lymphomen sowie bei T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen wurde eine erhöhte Lck-Konzentration festgestellt. Ein Lck-SH3-Ligand mit hemmender Wirkung könnte die Aktivität der T-Zelle herabsetzen. Dieser Ligand könnte bei einer Transplantation die Immunantwort unterbinden bzw. beeinflussen und so die Abstoßung von Fremd-Organen verhindern oder zumindest reduzieren. Eine Inhibition der Lck-Aktivität könnte sich auch bei der Therapie von Autoimmunkrankheiten wie z.B. Multiple Sklerose oder insulinabhängiger Diabetes mellitus als sinnvoller Ansatz erweisen. Bei Lck-SH3-Liganden, für die sich eine aktivierende Wirkung herausstellen sollte, wäre zudem ein Einsatz zur Stärkung des Immunsystems denkbar, wie es bei vielen Krankheiten sowie schweren bakteriellen und viralen Infektionen sinnvoll wäre.

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Bindungsspezifität der Lck-SH3-Domäne. Mittels Phagendisplay sollen neue Liganden für die Lck-SH3-Domäne identifiziert werden. Die Ergebnisse aus der Phagendisplay-Selektion sollen mit den Ergebnissen aus der Analyse physiologischer Lck-SH3-Bindungspartner verglichen werden. Die Bindung der mittels Phagendisplay selektierten Liganden zur Lck-SH3-Domäne soll quantitativ bestimmt werden. Durch Untersuchung dieser Liganden sollen Aussagen zu ihrer Spezifität getroffen werden. Von den affinsten Liganden soll die Interaktion mit der Lck-SH3-Domäne mittels NMR-Spektroskopie strukturell untersucht werden. Weiterhin soll die Affinität dieser Liganden in Bezug auf die Lck-SH3-Bindung optimiert werden.

Aufgrund der Funktion von Lck in der Signaltransduktion von T-Zellen gibt es viele virale Moleküle, die mit der Lck interagieren. Durch die Bindung an Lck wird eine geregelte Immunantwort verhindert und so z. B. die eigene Vermehrung des Virus gewährleistet. Das HIV-1-Nef-Protein bindet dabei über seine prolinreiche Region an die Lck-SH3-Domäne. Eine Unterbindung der Interaktion von Nef oder anderer viraler Effektormoleküle mit der SH3-Domäne von Lck könnte sich als möglicher neuer Therapieansatz erweisen, um die Pathogenität dieser Viren zu reduzieren. Deshalb sollen in dieser Arbeit die mittels Phagendisplay

identifizierten Lck-SH3-Liganden auch auf ihr Potenzial hin untersucht werden, in die Wechselwirkung des Nef-Proteins mit der Lck-SH3 einzugreifen.

2 Materialien

2.1 Bakterienstämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme sind in Tabelle 2-1 aufgeführt.

Tabelle 2–1: Name, Genotyp und Referenz aller in dieser Arbeit verwendeten Stämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	F [−] , φ 80d <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA</i> -argF)U169, <i>deoR</i> , <i>recA</i> 1, <i>endA</i> 1, <i>hsdR</i> 17 (<i>r</i> _s [−] , <i>m</i> _s ⁺), <i>pbaA</i> , <i>supE</i> 44, λ -, <i>thi</i> -1, <i>gyrA</i> 96, <i>relA</i> 1	(Jessee 1986)
<i>E. coli</i> BL21	F [−] , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> , (<i>r</i> _B [−] , <i>m</i> _B [−]), <i>dcm</i> , <i>gal</i>	(Grodberg et al. 1988)
<i>E. coli</i> ER2738	F ⁺ , <i>proA</i> ⁺ B ⁺ , <i>lacI</i> ^q , Δ(<i>lacZ</i>)M15zzf::Tn10(Tet ^R), <i>fhuA</i> 2, <i>glnV</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>), <i>thi</i> -1, Δ(<i>hsdS-mcrB</i>)5	New England Biolabs, Frankfurt

2.2 Phagendisplay-Peptid-Bibliothek

Für die Identifizierung von Peptid-Liganden wurde die kommerzielle Phagenbibliothek Ph.D.-12TM Phage Display Library Kit der Firma New England Biolabs (Frankfurt) verwendet. Diese Bibliothek erlaubt die Präsentation von 12 randomisierten Aminosäuren. Hier ist an das Phagenhüllprotein kodierende gpIII-Gen nach der Signalsequenz aminoterminal die Bibliothek inseriert (Abbildung 2-1). Die Phagenbibliothek besteht aus 1,9 x 10⁹ verschiedenen Sequenzen, wobei in 10 µl durchschnittlich jede Sequenz in 10 Kopien vorliegt.

gpIII leader sequence

Kpn I

5'...TTA TTC GCA ATT CCT TTA GTG GTA CCT TTC TAT TCT CAC TCT
3'...AAT AAG CGT TAA GGA AAT CAC CAT GGA AAG ATA AGA GTG AGA
...Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser His Ser

Start of mature 12-mer peptide-gpIII fusion

↓

NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK GGT GGA GGT
NNM NNM NNM NNM NNM NNM NNM NNM NNM NNM NNM NNM LCA CCT CCA
XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX Gly Gly Gly

Eag I

TGA GGT GAA ACT GTT GAA
AGC GGG CTT TGA CAA CTT
Ser Ala Gly Thr Val Gly

Abbildung 2–1: Sequenz der randomisierten Bibliothek.

Die randomisierte Sequenz ist mit einem Kästchen markiert.

2.3 IMAGE-cDNA-Klone

Für die Konstruktion von Genen für die SH3-Domänen von Abl, Fyn, Hck, PI3K und Src wurde die DNA aus IMAGE-cDNA-Klonen von RZPD (Berlin) benutzt. Die verwendeten IMAGE-Klone sind in der Tabelle 2–2 aufgeführt.

Tabelle 2–2: Name der Konstrukte und zugehöriger IMAGE-cDNA-Klon.

Konstrukt	IMAGE-cDNA-Klon
Abl-SH3	DKFZp762G244Q
Fyn-SH3	IMAGp998C136535
Hck-SH3	IMAGp958H201705
PI3K SH3	IMAGp998J21580
Src-SH3	IMAGp998N195197

2.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide zur Amplifizierung der SH3-Domänen und zur Sequenzierung des pGEX-Vektors sowie der Einzelstrang-DNA aus M13-Phagen sind in der Tabelle 2-3 aufgeführt. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma BioTeZ (Berlin) bezogen.

Tabelle 2–3: Name und DNA-Sequenz der verwendeten Oligonukleotide.

Name	DNA-Sequenz (5'-3')
Abl_SH3_5'	gga gga gga tcc agt gaa aat gac ccg aac ctt
Abl_SH3_3'	gga gga ctc gag tta gga gtg ttt ctc cag ac
Fyn_SH3_5'	gga gga gga tcc ggt ggt aca gga gtg aca ctc
Fyn_SH3_3'	gga gga ctc gag tta cgc ctg aat gct gtc aac tgg agc cac ata att gc
Hck_SH3_5'	gga gga gga tcc ccg ggg cct aat agc cac
Hck_SH3_3'	gga gga ctc gag tta tgt ctc cag aga gtc aac g
PI3K_SH3-5'	gga gga gga tcc atg agt gct gag ggg tac c
PI3K_SH3_3'	gga gga ctc gag tta cga gat ttt ttt cct tcc
Src_SH3_5'	gga gga gga tcc gcg ggt ccg ctg gcc ggt gga gtg acc acc ttt gtg g
Src_SH3_3'	gga gga ctc gag tta ctc ctc agc ctg gat gga g
pGEX_5'	ggg ctg gca agc cac gtt tgg
pGEX_3'	ccg gga gct gca tgt gtc ag
gp3_96	ccc tca tag tta gcg taa cg

2.5 Peptide und PepSpot-Membran

Die freien Peptide und die Peptide, gebunden an der Whatman 50 Zellulose-Membran (PepSpot-Membran) wurden von der Firma Jerini BioTools GmbH (Berlin) synthetisiert. Die freien Peptide sind aminoterminal amidiert und carboxyterminal acetyliert. Die Aminosäuresequenz der verwendeten freien Peptide sind in der Tabelle 2–4 angegeben. Die Peptide sind über den Carboxyterminus kovalent mit der PepSpot-Membran verknüpft und aminoterminal acetyliert. Pro Spot sind ca. 5 pmol Peptid gebunden. Die Sequenzen der Peptide auf den PepSpot-Membranen sind in der Tabelle 2–1 (Kapitel 4.4) und der Tabelle 4–2 (Kapitel 4.6) im Ergebnisteil angegeben.

Tabelle 2–4: Name und Aminosäuresequenz der verwendeten Peptide.

Name	Aminosäure-Sequenz (N-C)
PD1	HSKYLPPLPSL
PD1-R	HSKRPLPPLPSL

2.6 Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten und konstruierten Plasmide sind in Tabelle 2–5 aufgeführt.

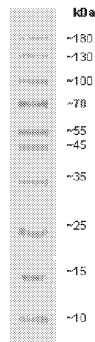
Tabelle 2–5: Name, Resistenz, Eigenschaften und Quelle der verwendeten und konstruierten Plasmide.

Plasmidname	Resistenz	Eigenschaft	Quelle
pGEX-6P2	Ampicillin	Expressionsvektor	Amersham Bioscience
pGEX-4T2-LckSH3	Ampicillin	mit integrierten <i>lck</i> -Gen (60-120) kodierend für Lck-SH3	(Schweimer et al. 2002)
pGEX-6P2-AblSH3	Ampicillin	mit integrierten <i>abl</i> -Gen (59-126) kodierend für Abl-SH3	diese Arbeit
pGEX-6P2-FynSH3	Ampicillin	mit integrierten <i>fyn</i> -Gen (80-146) kodierend für Fyn-SH3	diese Arbeit
pGEX-6P2-HckSH3	Ampicillin	mit integrierten <i>hck</i> -Gen (61-141) kodierend für Hck-SH3	diese Arbeit
pGEX-6P2-PI3KSH3	Ampicillin	mit integrierten <i>pi3k</i> -Gen (1-83) kodierend für PI3K-SH3	diese Arbeit
pGEX-6P2-SrcSH3	Ampicillin	mit integrierten <i>src</i> -Gen (79-150) kodierend für Src-SH3	diese Arbeit
pUbi-Nef		mit integrierten <i>nef</i> -Gen (2-210) kodierend für HIV-1-Nef	In der Arbeitsgruppe

2.7 Größenmarker

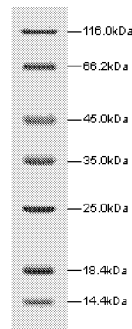
Prestained Protein Ladder

(New England Biolabs)



Protein Molecular Weight Marker

(MBI Fermentas)



2.8 Enzyme, Proteine und Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme, Proteine und Antikörper sind in der Tabelle 2-6 aufgeführt.

Tabelle 2-6: Enzyme, Proteine und Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Enzym	Firma
- BamHI, NotI	MBI Fermentas, Leon-Rot
- Taq-Polymerase	MBI Fermentas, Leon-Rot
- Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	MBI Fermentas, Leon-Rot
- T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, Leon-Rot
- Lysozym	AppliChem, Darmstadt
- DNase A	AppliChem, Darmstadt
- Vent-Polymerase	New England Biolabs Frankfurt am Main
- Thrombin-Protease	Roth, Karlsruhe
- PreScission-Protease	Amersham Bioscience
- Anti-M13-HRP-konjugiert	Amersham Bioscience
- Anti-GST-HRP-konjugiert	Novus Biologicals, Littleton, USA

2.9 Biochemikalien, Chemikalien und Kits

Die folgende Auflistung beinhaltet die Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten Biochemikalien, Chemikalien und Kits.

- ABI PRISM® FS Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer
- Acrylamid 4 K Lösung (30%) (Mix 29:1)	AppliChem,
- Agarose NuSieve	Fluka, Neu-Ulm
- Agarose SeaKem	Fluka, Neu-Ulm
- Ammoniumchlorid [¹⁵ N]	Euriso-top, Saint-Aubin Cedex, Frankreich
- Bis-Tris	Roth, Karlsruhe
- Complete-Protease-Inhibitor-Tablette	Roth, Karlsruhe
- dNTPs (desoxy-Nukleosid-Triphosphate)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
- Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco/BRL, Eggenstein
- Formamid	Sigma, München
- Glukose [¹³ C]	Euriso-top, Saint-Aubin Cedex, Frankreich
- Glutathion, reduziert	Sigma, München
- Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Biosciences, Freiburg
- Isopropyl-β-D-Thiogalactosid (IPTG)	Boehringer, Mannheim, BRD
- β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
- Midi Nucleobond AX 20und AX100 Kit	Machery-Nagel, Düren
- Nucleo Spin Kit	Machery-Nagel, Düren
- Phosphat-Citrat-Puffer mit Natrium-Perborat (Kapseln)	Sigma, München
- Polyethylenglycol-8000	Sigma, München
- QIAprep 96 M13 Kit	Qiagen, Hilden
- 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	Sigma, München
- Tyrosinamid	Sigma, München

Alle anderen hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in p.a. oder vergleichbarer Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma (München) bezogen.

2.10 Sonstige Materialien

- Spectra/Por-Dialyseschlauch (MWCO: 1000 und 3500 Da)	Roth, Karlsruhe
- Minisart Sterilfilter (0,22 µm)	Sartorius, Göttingen
- Mikrotiterplatten Polysorp 96F	Nunc, Wiesbaden
- Ultrafiltrations-Konzentratoren (MWCO: 3000 Da)	Amicon, Beverly, USA

Alle restlichen Verbrauchsmaterialien wurden von der Firmen VWR-International (Darmstadt), Eppendorf (Wesseling-Berzdorf) und Sartorius (Göttingen) bezogen.

2.11 Datenbanken und Informationen zu DNA- und Aminosäuresequenzen sowie Strukturen von Proteinen

Für Informationen zu DNA- und Aminosäuresequenzen von Proteinen wurde die NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) benutzt. Für die Analyse von Proteinsequenzen (z. B. Ermittlung des Extinktionskoeffizienten, der Molekularmasse und des isoelektrischen Punktes) wurde das ProtParam-Tool (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) verwendet. Die Recherche von vorhandenen Proteinstrukturen wurde innerhalb der PDB-Datenbank durchgeführt (<http://www.rcsb.org/pdb>).

3 Methoden

3.1 Isolierung von DNA

3.1.1 Plasmidpräparation aus *Escherichia coli* (*E. coli*)

Die Reinigung von kleineren Mengen an Plasmid-DNA (10 -30 µg) für die PCR, zur präparativen Gewinnung von DNA-Fragmenten und für die DNA-Sequenzierung erfolgte mit dem Nucleo Spin Kit (Machery-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers basierend auf der Methode der alkalischen Lyse nach Ish-Horowicz und Burke (1981). Dabei wurden 5 - 10 ml einer *E.coli*-Übernightkultur verwendet.

Größere Mengen von Plasmid-DNA (ca. 100 µg) wurden mit Hilfe des Midi Nucleobond AX100-Kits (Machery-Nagel, Düren) nach dem Protokoll des Herstellers gewonnen. Je nach Bedarf wurden 50 - 200 ml einer *E.coli*-Übernightkultur in LB-Medium verwendet.

3.1.2 Isolierung von Einzelstrang-DNA aus M13-Phagen

Für die Präparation von Phagen-Einzelstrang-DNA (ssDNA) für die Sequenzierung wurde der QIAprep 96 M13 Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die DNA-Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte gemäß Sambrook et al. (1989) durch photometrisches Vermessen der Lösung bei einer optischen Dichte von 260 nm (OD_{260}), wobei eine OD_{260} von eins etwa einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht.

3.3 Gelelektrophorese von DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der kontinuierlichen Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe, sowie zur Reinigung und Identifizierung von DNA-Fragmenten.

Das Prinzip der Elektrophorese beruht auf der Wanderung von in Flüssigkeit dispergierten oder kolloidal gelösten geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld (Dechwer et al. 1999). Dabei bewegen sich die Partikel mit positiver Ladung zur Kathode, die negativ geladenen zur Anode. Maßgebend für die Trennschärfe der Elektrophorese ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen. Diese wiederum ist abhängig von der Form und Größe der Teilchen, ihrer Ladung, des pH-Wertes, der Temperatur sowie der Viskosität des Agarosegels und der Feldstärke. Kleinere DNA-Fragmente legen deshalb im elektrischen Feld eine größere Strecke zurück als größere Fragmente.

Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte in Horizontalelektrophorese-Apparaturen (Amersham Biosciences). Je nach Größe des zu analysierenden Fragmentes wird eine 0,8- bis 2,5-%ige Agaroselösung in 1x TAE-Puffer mit 1 mg/l Ethidiumbromid (EtBr) hergestellt (Sambrook et al., 1989). Für die analytische Auftrennung wurde die MP-Agarose (AppliChem) verwendet. Bei der präparativen Agarosegel-Elektrophorese (niedrigere Spannung und größere Probentaschen als bei analytischen Gelen) wurden für Fragmente mit Molekülgrößen <1 kb die NuSieve GTG-Agarose (Cambrex Bioscience, Rockland, USA) und für größere Fragmente die Seakem GTG-Agarose (BMA, Rockland, USA) benutzt. Vor dem Auftragen der DNA-Probe wurde diese mit etwa 1/5 Volumen (Vol.) 5x-DNA-Auftragspuffer versetzt und je nach Elektrophorese-Apparatur bei einer konstanten Stromspannung von 80 - 110 V getrennt. Die Detektion der DNA erfolgte im UV-Licht. Die Ergebnisse einer Elektrophorese wurden auf dem Geldokumentationssystem mit UV-Durchlicht und Thermodrucker der Fa. Bio-Rad („GelDoc 2000“ mit „Quantity One“-Software, Version 5.01, München) festgehalten.

Agaroselösung	TAE-Puffer	5x-DNA-Auftragspuffer
0,8- 2,5% (w/v) Agarose	40 mM Tris-Acetat	50 mM EDTA
in TAE-Puffer	1 mM EDTA	50% (v/v) Glycerin
1mg·l ⁻¹ EtBr	pH 8,0	0,15 % (w/v) Bromphenolblau
		0,15 % (w/v) Xylencyanol

3.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Auftrennung der DNA-Fragmente mit Hilfe eines präparativen Agarosegels wurde das gewünschte DNA-Fragment unter UV-Licht aus dem Gel isoliert. Die weitere Reinigung erfolgte unter Verwendung des QIAEXII-Kits (Qiagen, Hilden) nach der Anleitung des Herstellers. Die Elution erfolgte stets in Wasser.

Diese Methode wurde für die Reinigung von PCR-Ansätzen und von verdauten Vektoren verwendet.

3.5 Klonierungstechniken

3.5.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

Für die Linearisierung von Plasmiden und für die Klonierung von PCR-DNA-Fragmenten wurden diese mit Restriktionsenzymen verdaut.

Die käuflich erworbenen Restriktionsenzyme und die dazu gelieferten Reaktionspuffer wurden nach den Angaben der Hersteller verwendet. Für die Spaltung von DNA wurden in der Regel 1 U Restriktionsenzym pro μg DNA eingesetzt. Ein Reaktionsansatz enthielt etwa 1 - 10 μg DNA in einem Volumen von 20 - 50 μl . Dieser wurde 1 - 2 h bei geeigneter Temperatur mit einer Enzymaktivität von 1 - 3 U/ μg eingesetzter DNA inkubiert. Danach wurde ein Aliquot des Ansatzes parallel zu einem DNA-Größenmarker auf einem Agarosegel aufgetrennt und die entstandenen DNA-Fragmente auf ihre Richtigkeit überprüft (Kapitel 3.3)

3.5.2 Dephosphorylierung

Um die Re-Ligation der Vektorenden von gespaltenen DNA-Molekülen zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatgruppen mit Hilfe der "Shrimp Alkaline Phosphatase" (SAP) entfernt. Dazu wurde ca. 1 μg DNA mit 16 μl ddH₂O und 2 μl 10x SAP-Puffer versetzt. Nach Zugabe des Enzyms (1 μl = 1 U) wurde der Reaktionsansatz eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Durch 15-minütige Inkubation bei 65 °C wird das Enzym inaktiviert. Anschließend konnte die DNA direkt für die Ligation eingesetzt werden.

3.5.3 Ligation von DNA

Für die Insertion eines DNA-Fragmentes in ein zuvor linearisiertes Plasmid (Kapitel 3.5.1) wurde die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 (T4-DNA-Ligase) verwendet.

Für die Ligation wurden ca. 200 ng Plasmidvektor und ein zwei- bis zehnfacher molarer Überschuss an Insert-DNA mit 1 mM ATP und 1 U T4-DNA-Ligase (Pharmacia) 2 h bei Raumtemperatur oder 14 h bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurden *E. coli* DH5 α -Zellen üblicherweise mit 1/5 – 1/2 (max. 10 μ l) des Ligationsansatzes transformiert (Kapitel 3.5.3).

3.6 Bakterienkultur

3.6.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Stämmen

Zur Klonierung von Genkonstrukten wurden sowohl *E. coli*-Stamm DH5 α als auch *E. coli* Top 10 verwendet. Die Proteinexpression erfolgte mit dem Stamm *E. coli* BL21. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in LB-Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin unter Schütteln (200 rpm) bzw. auf LB-Agarplatten über Nacht. Die Kulturen wurden jeweils mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte oder aus Glycerinkulturen angeimpft. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm. Dabei entspricht eine OD₆₀₀ von 1,0 einer Dichte von ca. 10⁹ Zellen/ml Kultur. Für die Langzeitkonservierung wurden 700 μ l einer Übernachts-Bakterienkultur mit 300 μ l sterilem 70%igem Glycerin gemischt und bei -80 °C gelagert.

3.6.2 Herstellung kompetenter Zellen

Von einer frischen SOB-Platte wurden 2 – 3 große *E. coli* Kolonien in 1 ml SOB-Medium resuspendiert und diese anschließend in 300 ml SOB-Medium überführt. Nach Inkubation im Schüttler (Unitron, Infors-HT, Einsbach) bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 – 0,4 wurden die Zellen in 6 mal 50 ml Aliquots aufgeteilt und für 15 min auf Eis abgekühlt. Nach Zentrifugation (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) für 15 min bei 3500 rpm und 4 °C wurden die Bakterienpellets in 6 mal 10 ml eisgekühltem TFBII-Puffer aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 3500 rpm und 4 °C wurden die Bakterienpellets in 6 mal 2 ml kaltem TFBII-Puffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Für den späteren

Gebrauch wurden Aliquots von 200 µl in Mikroreaktionsgefäßen im flüssigen Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert.

SOB-Medium	TFBI-Lösung	TFBII-Lösung
20 g·l ⁻¹ Trypton	30 mM Natriumacetat	10 mM MOPS
5 g·l ⁻¹ Hefeextrakt	50 mM Magnesiumchlorid	75 mM Calciumchlorid
8,5 mM Natriumchlorid	100 mM Natriumchlorid	10 mM Natriumchlorid
2,5 mM Kaliumchlorid	10 mM Calciumchlorid	15% Glycerin
	15% Glycerin	pH 7,0
	pH 6,0	

Die Transformationsrate und damit Güte der kompetenten Bakterien wurde mit verschiedenen Plasmidkonzentrationen getestet und lag bei ca. 1×10^6 Kolonien pro µg eingesetzter DNA.

3.6.3 Transformation von *E. coli*

Die bei –80 °C gelagerten kompetenten Bakterien wurden für ca. 10 min auf Eis aufgetaut. Zur Transformation wurden 200 µl Bakterienlösung vorsichtig mit dem Ligationsansatz (Kapitel 3.5.3) bzw. mit 200 ng Plasmid-DNA versetzt und zunächst 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte für 1 min eine Hitzeaktivierung bei 42 °C und nach Zugabe von 800 µl LB-Medium eine Inkubation bei 37 °C für 1h. Danach wurden im Allgemeinen 100 µl und 900 µl der Bakteriensuspension auf je eine Ampicillin-haltige LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Nur Bakterien, die das Ampicillin-Resistenzgen im eingesetzten Plasmid enthalten, können sich vermehren und sichtbare Kolonien bilden. Diese Transformanten wurden durch Kolonie-PCR (Kapitel 3.7.2) weiter untersucht.

3.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (polymerase chain reaction) (Mullis et al. 1987) ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge und definierter Sequenz aus einem Nukleinsäure-Gemisch. Dabei können die Moleküle in kürzester Zeit um Faktoren 10^6 bis 10^8 vermehrt werden. Bei diesem Verfahren lässt man das Nukleinsäure-Gemisch mit zwei chemisch synthetisierten Oligonukleotiden (Primer), deren Sequenzen komplementär zu den Anfangs- und Endsequenzen der zu amplifizierenden DNA sind, reagieren. Bei Wiederholung der

Reaktionsfolgen aus DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Auffüllreaktion kommt es nach jedem Reaktionsschritt zu einer Verdopplung der DNA und somit in einer Kettenreaktion zur exponentiellen Anreicherung der zu amplifizierenden DNA-Sequenz.

Die PCR diene sowohl analytisch zum spezifischen Nachweis bestimmter Nukleinsäuren, als auch präparativ zur Herstellung rekombinanter Gene.

3.7.1 Amplifikation von DNA

Zur Amplifikation von (rekombinanter) DNA wurden PCR-Ansätze in einem Volumen von 50 µl oder 100 µl mit 1x PCR-Puffer, 100 µM dNTPs, 1 µM 5'-Primer, 1 µM 3'-Primer und 1 - 2 U Vent-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main) angesetzt. Als Template wurden 10 - 50 ng gereinigte (Plasmid-) DNA benutzt.

Entsprechend der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Stücks wurden die Einzelschritte der Reaktion den jeweiligen Erfordernissen angepasst. Allen Reaktionen gemeinsam war jedoch eine anfängliche Denaturierung der DNA für 1 min bei 95 °C, gefolgt von einem variablen, zyklischen Drei-Temperaturprogramm für 30 Zyklen (Denaturierung bei 95 °C für 1 min, Anlagerung der Primer bei 50 – 60 °C für 40 sec, Kettenverlängerung bei 72 °C für 1 min) und einer abschließenden Kettenverlängerung für 7 min bei 72 °C. Die PCR-Reaktionen wurden in dem Thermocycler Biozym PTC-200 (Oldendorf) durchgeführt.

Bei der präparativen Amplifikation von DNA wurde nach Beendigung der Synthese der ganze PCR-Ansatz über Gelelektrophorese auf Amplifikation überprüft (Kapitel 3.3). Die gewünschten PCR-Fragmente wurden wie unter Kapitel 3.4 beschrieben aufgereinigt und standen danach für weitere molekularbiologische Methoden zur Verfügung.

3.7.2 Kolonie-PCR mit *E. coli*

Die Kolonie-PCR ermöglichte das Auffinden von transformierten *E. coli*-Klonen mit Vektoren, die das gewünschte Insert-DNA-Fragment inseriert haben (Kapitel 3.6.3), ohne dass die DNA vorher isoliert werden muss. Dabei wurde eine *E. coli*-Kolonie von einer Kulturplatte in 20 µl TE-Puffer, pH 8,0, 1 % (v/v) Nonidet P40 überführt, resuspendiert und durch fünfminütiges Erhitzen auf 95 °C lysiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur (RT) und Zentrifugation (1 min,

10000 rpm) wurden dann 5 µl des Überstandes für eine PCR (Ansatzgröße 20 µl) mit 25 Zyklen eingesetzt. Es wurden die Primer pGEX5' und pGEX3' verwendet, die flankierend zu der Multiplen Cloning Site (MCS) sind. Nach Beendigung der Synthese wurde ein Aliquot des Ansatzes über Gelelektrophorese auf Amplifikation überprüft. Wenn kein Insert vorhanden war, entstanden PCR-Produkte mit einer Fragmentgröße von 305 Basenpaaren. Alle anderen PCR-Produkte, deren Sequenzen größer waren, wiesen auf ein Insert hin. Positive Klone wurden in 5 - 10 ml LB-Medium angezogen (Kapitel 3.6.1), die DNA isoliert (Kapitel 3.1) und anschließend mittels Sequenzierung (Kapitel 3.8) auf die Richtigkeit des DNA-Inserts überprüft.

3.8 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde gemäß der enzymatischen Didesoxy-Methode von Sanger et al. (1977) durchgeführt. Jedes Reaktionsgefäß enthält dabei jeweils nur einen 5'- oder 3'-Primer, da die Sequenzreaktion eine Art „Einzelstrang-PCR“ darstellt. Im Terminator-Mix sind neben den dNTPs auch ddNTPs enthalten, an denen keine Strangverlängerung mehr erfolgen kann. Während des Elongationsschrittes erfolgt somit ein Kettenabbruch, der statistisch an jeder Position im zu sequenzierenden Molekül erfolgen kann. Die so markierten DNA-Fragmente verschiedener Länge können später bei ihrer Auftrennung auf Polyacrylamidgelen mittels eines Laserstrahls erkannt und unterschieden werden. Als Starterpunkt dienen die eingesetzten 3'- und 5'-Primer.

Für die Reaktion wurde der „ABI PRISM FS Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) verwendet. Für die Sequenzierung von pGEX-Vektor-DNA wurden als Primer pGEX3' und pGEX5' benutzt. Für die Sequenzierung der Einzelstrang-DNA der M13-Phagen wurde der Primer gp3_96 verwendet. Es wurden Reaktionen in einem Volumen von 10 µl angesetzt. Jeder Ansatz enthielt 3 µl Big Dye-Mix, 0,5 - 1 µg DNA und 5 pmol/µl Primer. Die Reaktionen wurden im Thermocycler PTC-200 (Biozym, Oldendorf) mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt: 5 s bei 95 °C und 25 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 96°C, 10 s Anlagerung der Primer bei 55°C und 4 min Kettenverlängerung bei 60 °C.

Anschließend wurde eine Ethanol-Fällung durchgeführt. Dafür wurde zu den PCR-Ansätzen je 120 µl des Fällmix gegeben und 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach

Zentrifugation bei 3300 rpm für 1 h bei 4 °C wurde das Pellet zweimal mit 120 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 3300 rpm für 15 min bei 4 °C wurde das DNA-Pellet bei 80 °C getrocknet und für den Gellauf bei -20 °C gelagert. Für den Lauf wurden die Proben in 2 – 3 µl Formamid-Ladepuffer resuspendiert, kurz vorher 2 min auf 90 °C erhitzt und dann auf Eis aufbewahrt. Zur Auftrennung wurde ein 5%iges Acrylamidgel verwendet. Die Auswertung erfolgte mit dem Computer unter Verwendung der ABI-Software.

Fällmix	Formamid-Ladepuffer	5%-Acrylamidgel	10x-TBE-Puffer
1 Teil (v/v) 7,5 M Ammoniumacetat pH 5,2 6 Teile (v/v) Ethanol	20 mM EDTA, pH 8,8 6 mg·ml ⁻¹ Blue Dextran in deionisiertem Formamid	18 g Harnstoff 5 ml Long Ranger Gel Solution (50%) 5 ml 10x-TBE-Puffer ad 50 ml H ₂ O 25 µl TEMED 250 µl 10% APS	0,9 M Tris 0,9 M Borsäure 20 mM EDTA pH 8,2 - 8,3

Einige Sequenzierungen wurden auch von der Firma Seqlab (Berlin) durchgeführt. Die Auswertung dieser Sequenzen erfolgte über frei verfügbaren Programmen via WWW-Zugang (<http://www.bcmsearchlauncher.com>).

3.9 Klonierung und Transformation der SH3-Konstrukte

Für die Präparation der DNA-Fragmente der Abl-, Fyn-, Hck-, PI3K- und Src-SH3-Domänen wurde die PCR-Technik (Kapitel 3.7) angewendet. Als erstes wurde die DNA aus den IMAGE-cDNA-Klonen (Kapitel 2.3) isoliert (Kapitel 3.1.1). Diese dienten bei der PCR als Template-DNA zur Amplifizierung der Gene für die SH3-Domänen. Die bei der PCR verwendete Template-DNA und die dazugehörigen Primer sind in der Tabelle 3–1 aufgelistet.

Tabelle 3–1: Klonierung der SH3-Domänen. Bei der PCR verwendete Template-DNA und Primer.

Protein	Template	Primer
Abl-SH3 (As 59-126)	DKFZp762G244Q	Abl_SH3_5' & Abl_SH3_3'
Fyn-SH3 (As 80-146)	IMAGp998C136535	Fyn_SH3_5' & Fyn_SH3_3'
Hck-SH3 (As 61-141)	IMAGp958H201705	Hck_SH3_5' & Hck_SH3_3'
PI3K-SH3 (as 1-83)	IMAGp998J21580	PI3K_SH3_5' & PI3K_SH3_3'
Src-SH3 (As 79-150)	IMAGp998N195197	Src_SH3_5' & Src_SH3_3'

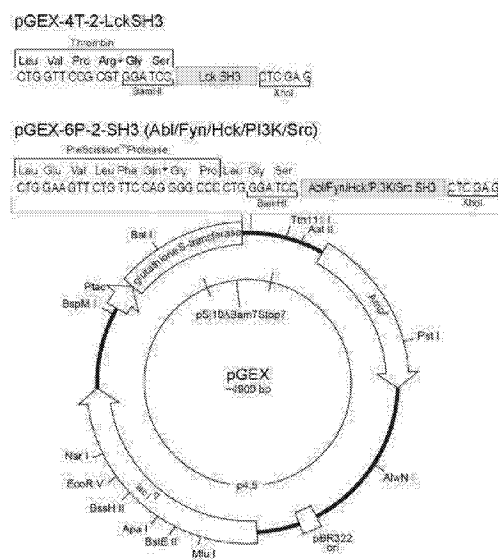


Abbildung 3–1: Genkarte der konstruierten und verwendeten SH3-Konstrukte.

Der pGEX-4T-2-LckSH3 stand schon zur Verfügung. Die SH3-DNA von Abl, Fyn, Hck, PI3K und Src wurden in den pGEX-6P-2 Vektor zwischen den Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xho*I eingebracht. Die Pfeile markieren die Schnittstellen für die Proteasen Thrombin bzw. PreScission. Bei der Thrombin-Protease blieb ein GS-Überhang übrig, bei der PreScission-Protease ein Überhang mit GPLGS.

Nach der PCR-Reaktion erfolgte die Reinigung der PCR-Ansätze mittels Gelelektrophorese (Kapitel 3.3) und Gelextraktion (Kapitel 3.4). Als Vektor für die Klonierung der SH3-Genen wurde das Plasmid pGEX-6P-2 (Amersham Bioscience; Abbildung 3–1) verwendet. Die SH3-PCR-Fragmente und die Vektor-DNA wurden durch die Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xho*I verdaut. Die anschließende Reinigung erfolgte mittels Gelelektrophorese (Kapitel 3.3) und Gelextraktion (Kapitel 3.4). Vor der Ligation wurde die Vektor-DNA dephosphoryliert (Kapitel 3.5.2) Nach Ligation (Kapitel 3.5.3) der Vektor-DNA und der gereinigten SH3-PCR-Fragmente erfolgte die Transformation in den Klonierungstamm *E. coli* DH5 α (Kapitel 3.6.3).

3.10 SDS-PAGE nach Laemmli

Zur Auftrennung und Analyse von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gelelektrophorese) bestehend aus einem Sammel- und Trenngel nach Laemmli angewandt (Laemmli 1970). Die SDS-Elektrophorese trennt ausschließlich nach Molekülgröße auf. Durch Behandlung mit dem im Probenpuffer enthaltenen anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat werden die Eigenladungen von Proteinen überdeckt; es entstehen anionische Micellen. Das SDS verbindet sich dabei mit dem Protein, so dass die

spezifische Ladung, d.h. Ladung pro Masse, zum entscheidenden Parameter für die Auftrennung wird. Das zugesetzte β -Mercaptoethanol hat die Aufgabe, Schwefelbrücken, die zwischen Cysteinen gebildet werden können, reduktiv aufzuspalten.

Im Sammelgel sind die Poren so groß, dass sie für die Trennung oder Konzentrierung der Proteine keine Rolle spielen. Der Konzentrierungseffekt wird vielmehr dadurch erreicht, dass sich im Gel andere Ionen (Leitionen) als im Elektrodengefäß (Folgeionen) befinden. Dabei wandert das Leition am schnellsten und zieht die Proteine nach sich, während das Folgeion am langsamsten wandert und die Proteine in entsprechender Weise vor sich herschiebt. So werden die Proteine zu einer schmalen, scharf begrenzten Zone hoher Konzentration gesammelt. Diese Zone bewegt sich in Richtung Anode, bis sie an die Grenzschicht des engporigen Trenngels gelangt. Die Proteine erfahren plötzlich einen hohen Reibungswiderstand, so dass ein Stau entsteht, der zu einer weiteren Zonenschärfung führt. Das niedermolekulare Leition ist davon nicht betroffen und überholt die Proteine.

Die Gele hatten eine Größe von 10 cm x 10,5 cm bei einer Dicke von 0,75 cm. Der Gellauf wurde vertikalen Plattenelektrophoresekammern (Mighty Small II, Hoefer/ Amersham Bioscience, Freiburg) durchgeführt.

5%-Sammelgel	12%-Trenngel	Laufpuffer	4x-Probenpuffer
16,8 % (v/v) Acrylamid 30%	20 % (v/v) Acrylamid 30%	50 mM Tris-HCl	40 % (v/v) Glycerin
125 mM Tris/ HCl	375 mM Tris/ HCl	385 mM Glycin	8 % (w/v) SDS
0,1 % (w/v) SDS	0,1 % (w/v) SDS	0,1 % (w/v) SDS	8 % (v/v) β -Mercaptoethanol
pH 6,8	pH 8,8	pH 8,3	200 mM Tris pH 6,8
0,1 % (v/v) APS 10 %	0,1 % (v/v) APS 10 %		3 g $\cdot$ l ⁻¹ Bromphenolblau
0,1 % TEMED	0,04 % (v/v) TEMED		

Die Proben wurden vor dem Lauf im Verhältnis 1:4 mit einem 4x-Probenpuffer nach Laemmli versetzt. Wurde die Gesamtproteinmenge von Bakterienzellen untersucht, so wurde das Bakterienpellet von einer Bakteriensuspension mit einer OD₆₀₀ von 1,0 mit 50 μ l 1x Probenpuffer versetzt. Vor dem Lauf wurden die Proben für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 30 - 40 mA/Gel für ca. 1 h. Im Anschluss daran wurden die Gele mit Coomassie gefärbt.

3.10.1 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Die Färbung von SDS-Gelen erfolgte mit Coomassie. Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel in ca. 100 ml Coomassie-Färbelösung für 1 h unter Schütteln inkubiert. Zur schnelleren Färbung wurde die Gel-Färbelösung für ca. 2 min in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde das Gel in H₂O bis zum gewünschten Grad entfärbt. Auch hier konnte der Vorgang durch Erhitzen in der Mikrowelle beschleunigt werden. Die Dokumentation erfolgte auf dem Gerät Gel Doc 2000 (Bio-Rad, München).

Coomassie -Färbelösung	Entfärber
25 % Isopropanol	10 % Essigsäure
10 % Essigsäure	
0,5 g·l ⁻¹ Coomassie Brilliant Blue R-250	

3.11 Bestimmung der Protein- und Peptidkonzentration

3.11.1 Konzentrationsbestimmung mittels UV/VIS-Spektrometer

Die Konzentration von Proteinen bzw. Peptiden wurde mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Demnach gilt folgender Zusammenhang zwischen der Extinktion E und der Konzentration c:

$$E = d \cdot c \cdot \epsilon \quad (\text{Gleichung 3.1})$$

Dabei steht ϵ für den molaren Extinktionskoeffizienten und d für die Schichtdicke der Küvette. Die Extinktionskoeffizienten der Proteine bzw. Peptide wurden anhand der Zusammensetzung der aromatischen Aminosäuren ermittelt (Gill et al. 1989).

3.11.2 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur weiteren Konzentrationsbestimmung von Proteinen im Bereich von 0,1 - 1,0 mg/ml wurde der Standard Bradford-Assay angewandt. Als Standard diente eine Konzentrationsreihe von BSA. Als Nullwert diente der reine Puffer. Für alle Ansätze wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Je 10 µl, Probe, Standard oder Puffer wurden mit 200 µl 20 % Bradford-Reagenz

(Bio-Rad) versetzt. Die Ansätze wurden vermischt, 5 - 60 min inkubiert und im UV-VIS-Spektrometer (Firma) bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch gemessen.

3.11.3 Bestimmung der Peptidkonzentration mit dem BCA-Kit

Für die Bestimmung der Peptidkonzentration wurde der QuantiPro BCA Assay Kit (Sigma-Aldrich, München) verwendet. Diese Methode beruht auf der Cu^{2+} -Protein Komplexbildung und die anschließende Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch verschiedene Reste des Proteins (Cystein, Tryptophan, Tyrosin) sowie durch die Peptidbindung. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.12 Expression von rekombinanten Proteinen

Nach Überprüfung der Richtigkeit der DNA-Sequenz erfolgte eine Transformation der Plasmid-DNA in *E. coli* BL21 Zellen. Die Zellanzucht wurde in mit Schikanen versehenen Erlenmeyerkolben bei 37 °C und 200 rpm (Unitron, Infors-HT, Einsbach) durchgeführt. Für die Herstellung einer Vorkultur wurden 50 ml LB-Flüssigmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum (100 µM Ampicillin) versetzt und mit einer Kolonie von einer LB-Platte oder mit einer Glycerinkultur inokuliert und über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Vorkultur zentrifugiert (2 min, 5000 rpm, RT; Eppendorf-Zentrifuge.), das Pellet in frischem LB-Medium resuspendiert und damit die Expression auf eine OD_{600} von ca. 0,1 eingestellt. Die Kultivierung der Expression erfolgte bei 37 °C in einem Schüttelinkubator solange, bis die Bakterien eine Dichte von OD_{600} 0,6 - 0,8 erreicht hatten (2 - 3 h). Die Proteinexpression wurde durch die Induktion mit 1 mM IPTG gestartet und noch 5 h unter denselben Bedingungen weiter inkubiert. Danach wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 10 min bei 6000 rpm (Centrifuge 5810, Eppendorf, 4 °C) geerntet. Nach einmaligem Waschen des Bakterienpellets in PBS-Puffer wurde dieses zur Lagerung bei -20 °C eingefroren.

Für die Überprüfung der Überexpression des gewünschten Proteins wurden vor der Induktion und zu verschiedenen Zeitpunkten der Expression Aliquots entnommen und mittels SDS-PAGE (Kapitel 0) analysiert.

LB-Medium (II)

10 g Trypton
5 g Hefextrakt
10 g NaCl

LB-Platte

2 % (w/v) Agar
in LB-Medium

Sollten die Proteine für die NMR-Messung verwendet werden, so wurde statt dem LB-Medium isotopenmarkiertes M9-Minimalmedium benutzt.

M9-Minimalmedium

9,1 g·l⁻¹ NaH₂PO₄ · 2 H₂O
3 g·l⁻¹ KH₂PO₄ · 2 H₂O
0,5 g·l⁻¹ NaCl
0,5 g·l⁻¹ ¹⁵NH₄Cl
100 µM CaCl₂ (aus einer 1 M Stammlösung)
2 mM MgSO₄ (aus einer 1 M Stammlösung)
10 µM Fe(III)citrat (aus einer 10 mM Stammlösung)
4 g·l⁻¹ Glukose oder 2 g·l⁻¹ [¹³C]-Glukose
0,2 % (v/v) TS2 (Spurenelemente)
Vitamin-Cocktail

Spurenelemente:

30 mg·l⁻¹ MnCl₂ · 4 H₂O
58,8 mg·l⁻¹ ZnSO₄ · H₂O
300 mg·l⁻¹ H₃BO₃
200 mg·l⁻¹ CoCl₂ · 6 H₂O
20 mg·l⁻¹ NiCl₂ · 6 H₂O
10 mg·l⁻¹ CuCl₂ · 2 H₂O
900 mg·l⁻¹ Na₂MoO₄ · 2 H₂O
20 mg·l⁻¹ Na₂SeO₃

Vitamin-Cocktail:

1 mg·l⁻¹ d-Biotin
1 mg·l⁻¹ Cholinchlorid
1 mg·l⁻¹ Folsäure
1 mg·l⁻¹ Nicotinamid
1 mg·l⁻¹ Natrium-D-panthothemat
1 mg·l⁻¹ Pyridoxalhydrochlorid
0,1 mg·l⁻¹ Riboflavin
extra: 5 mg·l⁻¹ Thiaminhydrochlorid

3.13 Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss wurden die Zellpellets pro Gramm Nasszellgewicht in 4 ml GST-Lysispuffer aufgenommen und auf Eis resuspendiert. Nach dreimaliger Sonifizierung der Zelllösung für 30 s mittels eines Ultraschallstabes (Branson Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, USA) im Eis-Wasser-Bad, wurden sie anschließend unter Rühren auf Eis für 30 min inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut 3 mal 30 s sonifiziert. Nach dem Abtrennen nicht aufgeschlossener Zellen und der Zellwandbestandteile durch Zentrifugation (1 h, 50000 g, 4 °C) wurde der zellfreie Rohextrakt abgezogen und für die weitere Reinigung verwendet.

PBS-Puffer

140 mM NaCl
2,7 mM KCl
10 mM Na₂HPO₄
1,8 mM KH₂PO₄
pH 7,3

GST-Lysispuffer

1 x PBS, pH 7,3
0,5 % Triton X-100
5 mM DTT
1 Complete-Protease-Inhibitor-Tablette
20 µg/ml DNase A
20 µg/ml Lysozym

3.14 Proteinreinigungen

3.14.1 Affinitätschromatographie an Glutathion-Sephарose

Die Reinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte an Glutathion-Sephарose 4B (GSH-Sephарose) (Amersham Bioscience). Hierbei beruht das Prinzip auf der Bindung der Glutathion-S-Transferase (GST) an den Liganden Glutathion, der kovalent an die Sepharose gekoppelt ist, und der anschließenden Elution der GST-Fusionsproteine durch reduziertes Glutathion.

Zur Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wurde zuerst eine leere Chromatographiesäule (Amersham Bioscience) mit 1,5 ml GSH-Sephарose pro Gramm Zellsnassgewicht befüllt, mit 5 Säulenvolumen H₂O gespült und mit 5 Säulenvolumen Bindungspuffer äquilibriert. Nach dem Auftrag des zellfreien Rohextraktes wurde die Säule mit 20 Säulenvolumen kaltem Bindungspuffer gewaschen. Eluiert wurde mit 25 ml Elutionspuffer in 5 ml-Fractionen.

Anschließend wurden die Fractionen in Dialyseschläuche mit einer Molekulargewichtsausschlussgrenze (MWCO) von 3500 Da (Spectra/Por-Dialyseschlauch, Roth, Karlsruhe) überführt und dreimal gegen jeweils 3 l Dialysepuffer für je mindestens 3 h Dauer dialysiert. Nach der Gefriertrocknung im Lyophilisator Alpha 1-4 (Christ, Osterode am Harz) wurden die Proben bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

Zur Kontrolle wurden 30 µl aus allen Elutions-Fractionen entnommen und mit 10 µl 4fach-Probenpuffer versetzt. Anschließend wurden alle Proben mit SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert.

Bindungspuffer	Elutionspuffer	Dialysepuffer
1 x PBS, pH 7.3	50 mM Tris-HCl, pH 8.0	1 mM Kaliumphosphat
0,1% Triton X-100	10 mM reduziertes Glutathion	0,5 mM NaCl
5 mM DTT		pH 6,4

3.14.2 Abspaltung des Fusionspartners mit Thrombin bzw. mit PreScission

Das GST-Lck-SH3-Fusionsprotein aus dem pGEX-4P-2-Vektor enthält eine Erkennungssequenz für die Thrombin-Protease. Damit wurde eine Trennung des aminoterminalen Affinitätstags Glutathion-S-Transferase vom gewünschten Lck-SH3-Protein ermöglicht. Für die Spaltung wurde das lyophilisierte Fusionsprotein in Thrombin-Spaltpuffer aufgenommen (1 ml/ 2 – 4 mg Protein) und nach Zugabe von 2 U Thrombin/mg für 2 – 3 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde sofort eine Größenausschlusschromatographie zur Trennung der Spaltprodukte durchgeführt.

Die GST-SH3-Fusionsproteine aus dem pGEX-6P-2-Vektor enthalten eine Erkennungssequenz für die PreScission-Protease. Damit konnte eine Abtrennung des aminoterminalen Glutathion-S-Transferase-Affinitätstags durchgeführt werden. Hierbei wurde für die Spaltung zu pro mg lyophilisiertes Fusionsproteins 0,2 – 0,5 ml PreScission-Spaltpuffer zugegeben und resuspendiert. Nach Zugabe von 5 U PreScission pro mg Protein erfolgte die Inkubation für 2 – 3 h bei 4 °C. Im Anschluss daran wurde sofort eine Größenausschlusschromatographie zur Trennung der Spaltprodukte durchgeführt.

Thrombin-Spaltpuffer	PreScission-Spaltpuffer
1 x PBS, pH 7,4	50 mM Tris-HCl, pH 7.0
1 mM DTT	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1 mM DTT

3.14.3 Größenausschlusschromatographie zur Trennung der Spaltprodukte

Für die Trennung der Spaltprodukte wurde die Größenausschlusschromatographie mit Superdex75-Säule der Firma Amersham Bioscience (HiLoad 26/60 Superdex 75 pg) durchgeführt. Die Ausschlusschromatographie trennt gelöste Moleküle nach ihrem

Molekulargewicht und ihrer Form und basiert auf der unterschiedlichen Permeation der Analyten in ein poröses Trägermaterial mit kontrollierter Porengröße. Dabei können Moleküle ab einer bestimmten Größe nicht in die Poren des Trenngels eindringen und werden zuerst eluiert. Kleinere Moleküle dagegen können in die Poren eindringen, erfahren dadurch eine Verzögerung und werden später eluiert.

Für die Trennung der Spaltprodukte wurde die Säule zuerst mit 1,5 Säulenvolumen Spaltpuffer äquilibriert. Nach dem Auftragen der Spaltprodukte erfolgte der Lauf mit einem Fluss von 1,5 ml/min mit einem Gesamtvolumen von 500 ml. Es wurden Fraktionen von 4,5 ml Volumen gesammelt. Zur Kontrolle wurden alle proteinhaltigen Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert. Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden vereinigt, in Dialyseschläuche mit einer MWCO von 1000 Da (Spectra/Por-Dialyseschlauch, Roth, Karlsruhe) überführt und dreimal gegen jeweils 2 l Dialysepuffer für je mindestens 3 h Dauer dialysiert. Nach der Gefriertrocknung im Lyophilisator (Alpha 1-4, Christ, Osterode am Harz) wurden die Proben bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

Sollten die Proteine für NMR-Filterexperimente verwendet werden, so wurden die Fraktionen dreimal gegen jeweils 2 l NMR-Puffer dialysiert (Spectra/Por-Dialyseschlauch, MWCO=100 Da, Roth, Karlsruhe) und mittels Ultrafiltrations-Konzentratoren mit einer MWCO von 3000 Da (Amicon, Beverly, USA) bis zu 2 mM aufkonzentriert.

NMR-Puffer

50 mM Kaliumphosphat

20 mM Natriumchlorid

pH 6,4

3.15 Phagendisplay

Um Peptid-Liganden für die Lck-SH3-Domäne zu identifizieren, wurde die kommerzielle Phagenbibliothek (Ph.D.-12 Phage Display Library Kit, New England Biolabs, Frankfurt) verwendet, welche die Präsentation von 12 randomisierten Aminosäuren erlaubt. Als Target für die Selektion diente das GST-Lck-SH3-Fusionsprotein. Als Kontrolle wurde gegen GST selektiert.

Zur Durchführung der Selektion wurde GST-Lck-SH3 in einer Konzentration von 100 µg/ml in Bis-Tris-Puffer in einer Mikrotiterplattenvertiefung immobilisiert. Hierfür wurden jeweils 200 µl Proteinlösung über Nacht bei 4°C unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wurden verbleibende Bindungsstellen der Mikrotiterplattenvertiefung mit Blocking-Puffer für 60 min unter leichtem Schütteln geblockt. Danach wurden 6 Waschschrte mit 200 µl Bis-Tris-Puffer durchgeführt. Für die Selektion wurden 10 µl Phagen der kommerziellen Phagenbibliothek in 100 µl Bis-TrisT-Puffer für 20 Minuten unter leichtem Schütteln in einer GST-Lck-SH3-beschichteten Mikrotiterplattenvertiefung inkubiert. Die nicht gebundenen Phagen wurden verworfen und anschließend zehnmal mit 200 µl Bis-TrisT-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 100 µl 0,2 M Glycin-HCl, pH 2,2 für 10 Minuten unter leichtem Schütteln. Das Eluat wurde durch Zugabe von 25 µl 1 M Tris-HCl, pH 9,1 neutralisiert. Zur Amplifikation der im Eluat enthaltenen Phagen wurde 9/10 des Eluats zu 20 ml *E. coli*-Kultur (OD₆₀₀ von 0,1) gegeben und für 5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 20 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde überführt und 1/6 Volumen PEG/NaCl zugegeben. Der Ansatz wurde nun über Nacht auf Eis gefällt. Danach wurde 60 min bei 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml TBS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde 5 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde überführt und 1/6 Volumen PEG/NaCl zugegeben. Der Ansatz wurde 1 Stunde auf Eis gefällt. Abschließend wurde 60 min zentrifugiert und das Pellet in 100 µl TBS-Puffer resuspendiert. Die so erhaltenen Phagen konnten nun in der nächsten Runde eingesetzt werden. Nach 3 – 4 Selektionsrunden wurden anhand der ELISA-Ergebnisse ausgewählte Phagenklone isoliert (Kapitel 3.1.2) und die Aminosäuresequenz der auf diesen Phagen präsentierten Peptide über die DNA-Sequenzierung (Kapitel 3.8) des im Phagengenom kodierten Peptids bestimmt.

Bis-Tris-Puffer	Bis-TrisT-Puffer	Blocking-Puffer	Elutions-Puffer
20 mM Tris-Bis	0,1 % Tween-20	10 mg/ml BSA	0,2 M Glycin-HCl
150 mM NaCl	in Bis-Tris	in Bis-Tris	pH 2,2
pH 6,5			
Tris-HCl	PEG/NaCl	TBS-Puffer	
1M Tris-HCl	20% Polyethylenglycol-8000	50 mM Tris-HCl	
pH 9,1	2,5 M NaCl	pH 7,5	
		150 mM NaCl	

3.16 Anti-Phagen-ELISA - Bestimmung der relativen Lck-SH3-Bindungsaktivität einzelner Phagenklone

Dieser Bindungstest ist ein häufig verwendeter Test zur schnellen Bestimmung relativer Bindungsstärken selektierter Peptide, die hierbei noch physikalisch mit dem Phagen verknüpft vorliegen. Dieser Schritt dient auch zur Bestimmung von (bei dieser Methode nicht selten auftretenden) Phagenvarianten, die z.B. aufgrund ihrer Affinität zur Plastikoberfläche der verwendeten Mikrotiterplatten angereichert werden, und die somit zur Verfälschung der Ergebnisse führen können. Eine grundsätzliche Beschreibung der Methode findet sich z.B. unter Sparks et al. (1995).

GST-Lck-SH3-Protein wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml in Bis-Tris-Puffer über Nacht bei 4 °C in Mikrotiterplatten immobilisiert. Verbleibende Bindungsstellen wurden durch 2-stündige Inkubation mit Blockierungspuffer abgesättigt. Je 100 µl Suspension der zu testenden Phagenvariante wurden mit 100 µl Blockierungspuffer in einer Mikrotiterplatte für 20 min vorinkubiert. Danach wurde das Phagensuspension-Blockierungspuffer-Gemisch für 1 h zum immobilisierten GST-Lck-SH3-Protein gegeben. Nach einem Waschschriff mit Bis-Tris-Puffer wurde ein Anti-M13 Antikörper konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (Amersham Bioscience) zugegeben und die Platten für eine weitere Stunde inkubiert. Nach weiteren drei Waschschriffen mit Bis-Tris-Puffer konnten die gebundenen Phagen mittels einer Farbreaktion unter Verwendung von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine/ Wasserstoffperoxid nach Abstoppen mit 100 µl 2 M Schwefelsäure bei 450 nm detektiert werden. Die Intensität der Gelbfärbung wurde mittels eines Fluostar Optima Mikrotiterplatten-Lesegerätes (BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg) dokumentiert und gibt die relative Bindungsstärke der getesteten Phagenvariante an.

Blocking-Puffer

Bis-Tris mit 10 mg/ml BSA

Färbelösung

1 Tablette 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine in 1 ml DMSO
9 ml 0,05 M Phosphat-Citrat-Puffer (1 Kapsel Phosphat-Citrat-Puffer mit Natrium Perborat)

3.17 PepSpot-Membran-Technologie

Für die weitere Analyse von Protein-Peptidbindungen wurde die PepSpot-Membran bestehend aus an Zellulose gebundenen Peptiden der Firma Jerini BioTools GmbH (Berlin) verwendet.

Eine Beschreibung der automatisierten PepSpots-Technologie findet sich zum Beispiel unter Reineke et al. (1999). Alle Peptide lagen mit einer aminoterminalen Acetylierung vor. Pro Spot waren etwa 5 nmol Peptid kovalent mit der Zellulosemembran verknüpft.

3.17.1 Inkubation der PepSpot-Membran

Für den Immunoassay wurde die PepSpot-Membran über Nacht in 20 ml Blocking-Puffer geblockt. Nach einmaligem Waschen mit TBS-T für 10 min wurde die Membran für 3 h mit 0,5 µg/ml SH3 Protein in 20 ml Blocking-Puffer inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für je 10 min mit TBS-T gewaschen. Nach anschließender Inkubation mit 5 µl des Antikörpers Anti-GST HRP konjugiert (Novus Biologicals, Inc., Littleton, USA) in 20 ml Blocking-Puffer für 2 h erfolgte dreimaliges Waschen mit TBS-T-Puffer für je 20 min. Alle bisherigen Schritte wurden unter Schütteln durchgeführt. Die Detektion und Dokumentation erfolgte am Gel Doc 2000 Gerät (Bio-Rad, München) 1 min nach Zugabe des Substrates „Chemiluminescence Western Blotting Reagent“ (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, USA).

Nach Aufnahme der PepSpot-Membran wurden die Spot-Intensitäten der einzelnen Spots (im Folgenden „PepSpots“ genannt) anhand des aufgenommenen Bildes mit der QuantityOne Software (Bio-Rad, München) ausgewertet. Über jeden PepSpot und dem Hintergrund wurde eine definierte kreisrunde Fläche gelegt und mittels der Software die Intensität (Dichte) dieser Flächen ermittelt. Die Analyse der Spot-Intensitäten erfolgte nach Subtraktion des Hintergrundes.

Blocking-Puffer

10 % (v/v) FCS in TBS-T

TBS-T

0,05 % (v/v) Tween-20 in TBS

3.17.2 Regeneration der PepSpot-Membran

Um die Membran für weitere Untersuchungen verwenden zu können, wurde sie regeneriert. Dafür wurde sie sofort nach der Detektion für 10 min mit H₂O gespült und über Nacht in 30 ml Regenerationspuffer IIA gewaschen. Nach zweimaligem Waschen mit Regeneration Puffer IIA für je 20 min erfolgte das Waschen in Regenerationspuffer IIB (3-mal für 1 h). Anschließend wurde zweimal für 30 min mit TBS-T und einmal über Nacht in TBS-T gewaschen. Zum Schluss wurde noch dreimal mit Regenerationspuffer I bei 50°C für je 1 h, dreimal mit 10 x PBS Puffer für je 30 min und dreimal mit TBS-T für je 30 min gewaschen.

Für die weitere Verwendung wurde die Membran in TBS-T bei 4 °C gelagert. Sollte die Membran für längere Zeit aufbewahrt werden, so wurde sie nach der Regeneration zweimal in Methanol gewaschen, an der Luft getrocknet und dann bei -20 °C gelagert.

Regenerationspuffer I	Regenerationspuffer IIA	Regenerationspuffer IIB
62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7	8 M Harnstoff	500 ml Ethanol
2 % SDS	10 % SDS	100 ml Essigsäure
100 mM β -Mercaptoethanol	100 mM β -Mercaptoethanol	

3.18 Fluoreszenzspektroskopische Messung

Eine Methode zur Analyse von Biomolekülen ist die Fluoreszenzspektroskopie. Bei der Anwendung der intrinsischen Fluoreszenzspektroskopie kann im Wesentlichen nur die Fluoreszenz der Aminosäure Tryptophan verwendet werden. Für die praktische Anwendung der Fluoreszenz ist es oft ausreichend, wenn die fluoreszierende Gruppe durch Licht geeigneter Wellenlänge angeregt und bei einer zweiten Wellenlänge die Intensität der emittierten Strahlung gemessen wird. Bei der Aufnahme des Fluoreszenz-Spektrums werden die aromatischen Aminosäuren bei ca. 280 nm (Tryptophan) angeregt, und die Fluoreszenz (Emission) dieses elektronischen Übergangs bei Wellenlängen von oberhalb 300 bis 350 nm beobachtet (Lottspeich et al. 1998).

Im Fall der SH3-Domänen ist bekannt, dass die prolinreichen Liganden in einer aromatenreichen hydrophoben Region auf der SH3-Oberfläche gebunden werden, die in der Regel zwei hoch konservierte Tryptophanreste enthält. Bei Zugabe eines Liganden zu einer SH3-Domäne kommt es bei Bindung des Liganden zu einer Änderung der chemischen Umgebung der Tryptophane. Erfolgt die Ligandenzugabe schrittweise, kann die damit verbundene, von der Konzentration des Liganden abhängige, Fluoreszenzänderung im Vergleich zur Fluoreszenz der freien SH3-Domäne zur Bestimmung der Affinität der Protein-Ligandbindung dienen.

Um die Bindungsaffinität selektierter Phagendisplay-Peptide zu den SH3-Domänen zu untersuchen, wurden Fluoreszenzspektren am Perkin-Elmer LS 55 Fluorescence Spectrometer (Perkin Elmer, Boston, USA) aufgenommen.

Jeweils 1,6 ml einer Lösung aus 0,5 μ M freie SH3-Proteine in PBS-Puffer mit 1 mM DTT wurden in 2 ml Quarzküvetten (Hella, Müllheim) bei einer konstanten Temperatur von 21,5 °C (Thermo Haake 10) vorgelegt. Unter ständigem Rühren wurden die Peptide (gelöst in H₂O) in verschiedenen Konzentrationen dazu titriert, bis keine Änderung der Fluoreszenz mehr zu erkennen war. Zwischen jedem Titrationsschritt wurde die Lösung 1 min lang gerührt. Es wurden jeweils Doppel- bzw. Dreifachbestimmungen einer Titrationsreihe durchgeführt. Nach Peptidzugabe wurde jeweils die Fluoreszenzänderung aufgezeichnet. Durch eine sinkende Lck-SH3-Konzentration während der Titration kommt es zu Abweichungen in den Fluoreszenzwerten. Durch eine Kontrolltitration (Hintergrundmessung), bei welcher die Peptidlösung durch Wasser ersetzt wurde, konnten die Abweichungen der Fluoreszenzwerte bestimmt werden. Bei Peptiden, die einen Tyrosinrest in ihrer Sequenz beinhalten, wurden Hintergrundmessungen durchgeführt, bei welchem Tyrosinamid in der gleichen Konzentration wie das Peptid eingesetzt wurde. Die Excitationswellenlänge war 290 nm, und die Emissionswellenlänge war 345 nm. Die Spaltweite war 6 nm. Pro Messpunkt wurden 300 Datenpunkte innerhalb von 30 s aufgenommen und gemittelt.

3.18.1 Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D) aus den Fluoreszenzdaten

Die Affinität der Bindung zwischen den SH3-Domänen und den selektierten Phagendisplay-Peptiden lässt sich durch die Dissoziationskonstante (K_D) beschreiben:

$$K_D = \frac{[P] \cdot [L]}{[PL]}$$

Dabei steht [P] für die Konzentration an freien Protein, in diesem Fall für die SH3-Domäne, [L] für die freie Ligandenkonzentration bzw. Peptidkonzentration und [PL] für die Konzentration des Komplexes aus beiden Bindungspartnern.

Um die K_D -Werte aus den Fluoreszenzdaten abzuschätzen, wurde eine nichtlineare Regressionsrechnung mit dem SigmaPlot-Programm (Version 8.0) nach der Gleichung 3-2 angewendet.

$$F = F_{\min} + \left(\frac{[P_{\text{ges}}] + [L_{\text{ges}}] + K_D}{2} - \sqrt{\frac{([P_{\text{ges}}] + [L_{\text{ges}}] + K_D)^2}{4} - [P_{\text{ges}}] \cdot [L_{\text{ges}}]} \right) \cdot \frac{(F_{\max} - F_{\min})}{P_{\text{ges}}} \quad \text{(Gleichung 3-2)}$$

F = Fluoreszenz-Intensität des Proteins bei der entsprechenden Peptidkonzentration

P_{ges} = Gesamtprotein-Konzentration [μM]

L_{ges} = Gesamtligand-Konzentration [μM]

F_{min} = Fluoreszenz-Intensität des Proteins bei Titrationsstart

F_{max} = Fluoreszenz-Intensität des Proteins bei gesättigter Peptidkonzentration

K_D = Dissoziationskonstante [μM]

3.19 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie wird zur Analyse von Proteinsekundärstrukturen herangezogen. Sie ist eine Form der Absorptionsspektroskopie im UV-VIS-Bereich des Spektrums. Unter Circular dichroismus versteht man die unterschiedliche Absorption von rechts und links zirkular polarisiertes Licht durch eine optisch aktive Probe. Der Circular dichroismus der Proteine wird vor allem von den asymmetrischen Elementen im Bereich des Peptidrückgrats und von den aromatischen Aminosäuren hervorgerufen. Bei allen Aminosäuren mit Ausnahme von Glycin ist das der Peptidgruppe benachbarte C_α-Atom asymmetrisch substituiert. Das führt zur unterschiedlichen Absorption von rechts und links zirkular polarisiertes Licht durch diesen Chromophor. Die konkrete Elektronenkonfiguration der Peptidbindungen wird weiterhin ganz entscheidend von den Sekundärstrukturen bestimmt, die das Peptidrückgrat ausbildet. Das führt letztlich zu den spezifischen und im Wesentlichen von der Konformation der Proteine bestimmten CD-Spektren im Peptidbereich von 180 nm bis 250 nm.

Für die Bestimmung der Sekundärstruktur der Peptide und SH3-Domänen sowie der Konformationsänderung bei Bindung beider Komponenten wurden Fern-UV-CD-Messungen mit einem Jasco-J810 CD-Spektrometer (Jasco, Groß-Umstadt) durchgeführt. Die Konzentration der Peptide und SH3-Domänen sowie der SH3-Peptid-Lösung betrug jeweils 12,5 μM. Die verwendeten Quarzküvetten (Hellma, Müllheim) hatten eine Schichtdicke von 0,2 cm. Der aufgezeichnete Wellenlängenbereich verlief von 180 bis 250 nm. Die Aufnahmegeschwindigkeit betrug 10nm/min, die Auflösung 1 nm, die Zeitkonstante 8 s, die Empfindlichkeit des Gerätes 100 mGrad und die Bandbreite 1 nm. Jedes Spektrum wurde dreifach akkumuliert. Bei allen Spektren wurde als Kontrolle und als Hintergrundmessung das dazugehörige Pufferspektrum

aufgezeichnet. Die Spektren wurden nach Subtraktion des Hintergrundes ausgewertet. Zur Bestimmung der mittleren molaren Elliptizität pro Aminosäurerest ($[\Theta]_{MRW}$) wurde die Gleichung 3-3 angewendet.

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta}{10 \cdot N_{-1} \cdot d \cdot c} \quad (\text{Gleichung 3-3})$$

$[\Theta]_{MRW}$ = mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest [Grad · cm² · dmol⁻¹]

Θ = gemessene Elliptizität [mGrad]

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

N_{-1} = Anzahl der Aminosäuren minus 1

c = Konzentration des Proteins/ Peptids [M]

3.20 NMR-Spektroskopie

3.20.1 Probenvorbereitung für die NMR-Messung

Für die Aufnahme von ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektren wurden die lyophilisierten freien SH3-Proteine mit einer Konzentration von 200 bis 300 µM in PBS aufgenommen und mit 10 % (v/v) D₂O und 0,02 % (w/v) Natriumazid versetzt. Um ein NMR-Filterexperiment aufzunehmen, wurden zu den nach der Größenausschlusschromatographie aufkonzentrierten Proben 10 % (v/v) D₂O und 0,02 % (w/v) Natriumazid gegeben. Die Messung der NMR-Proben erfolgte in 5 mm Shigemi NMR-Probenröhrchen (BMS-005V, Shigemi, Tokio).

3.20.2 NMR-Messbedingungen und Spektrenauswertung

Die Messung der NMR-Spektren wurden an Varian Unity INOVA Spektrometern mit Protonenfrequenzen von 600 MHz und 800 MHz (Varian, Palo Alto, USA) durchgeführt, die mit triple-axis pulse-field-gradient (PFG) ¹H/¹⁵N/¹³C Probenköpfe ausgestattet waren. Alle Experimente wurden bei 25 °C gemessen. Die Prozessierung erfolgte mit den Programmen VNMRJ (Version 1.1C, Varian, Palo Alto, USA) und NMRPipe (Version 1.7; Delaglio et al., 1995). Für die Visualisierung und Auswertung wurden die Programme NMRDraw (Version 1.7; Delaglio et al. 1995), NMRView (Johnson et al. 1994) und Xeasy (Version 1.3.9; Bartels et al., 1995) verwendet.

3.20.3 Bestimmung der Differenz der chemischen Verschiebung bei Peptid-Bindung

Für die Bindungsanalyse der Peptide an die SH3-Domänen wurden NMR-Titrationsexperimente unter Aufnahme von ^1H - ^{15}N -HSQC Spektren durchgeführt. Dabei wurde für jede Amidgruppe die Änderung der chemischen Verschiebung in der ^1H - ($\Delta\delta^1\text{H}$) und ^{15}N -Dimension ($\Delta\delta^{15}\text{N}$) zwischen freier und gebundener Position ermittelt. Um verschiedene Titrationen miteinander vergleichen zu können, wurde die Differenz der chemischen Verschiebung ($\Delta\delta$) jeweils auf den beobachteten Maximalwert anhand der Gleichung 3-4 und Gleichung 3-5 normiert.

$$\Delta\delta_{\text{norm}}^1\text{H} = \frac{\Delta\delta^1\text{H}}{\Delta\delta_{\text{max}}^1\text{H}} \quad (\text{Gleichung 3-4})$$

$$\Delta\delta_{\text{norm}}^{15}\text{N} = \frac{\Delta\delta^{15}\text{N}}{\Delta\delta_{\text{max}}^{15}\text{N}} \quad (\text{Gleichung 3-5})$$

$\Delta\delta_{\text{norm}}^1\text{H}$ = Normierte Differenz der chemischen Verschiebung für ^1H

$\Delta\delta_{\text{norm}}^{15}\text{N}$ = Normierte Differenz der chemischen Verschiebung für ^{15}N

$\Delta\delta^1\text{H}$ = Differenz der chemischen Verschiebung für ^1H [Hz]

$\Delta\delta^{15}\text{N}$ = Differenz der chemischen Verschiebung für ^{15}N [Hz]

$\Delta\delta_{\text{max}}^1\text{H}$ = Maximale beobachtete Differenz der chemischen Verschiebung für ^1H [Hz]

$\Delta\delta_{\text{max}}^{15}\text{N}$ = Maximale beobachtete Differenz der chemischen Verschiebung für ^{15}N [Hz]

Um die Peptidbindungsoberflächen der SH3 Domänen zu kartieren, wurde die Differenz der chemischen Verschiebung in der ^1H - und ^{15}N -Dimension der jeweiligen Amidgruppen mittels Gleichung 3-6 zusammengefasst.

$$\Delta\delta_{\text{add}} = \frac{\Delta\delta_{\text{norm}}^1\text{H} + \Delta\delta_{\text{norm}}^{15}\text{N}}{2} \quad (\text{Gleichung 3-6})$$

$\Delta\delta_{\text{add}}$ = Normierte Differenz der chemischen Verschiebung für ^1H und ^{15}N addiert

$\Delta\delta_{\text{norm}}^1\text{H}$ = Normierte Differenz der chemischen Verschiebung für ^1H

$\Delta\delta_{\text{norm}}^{15}\text{N}$ = Normierte Differenz der chemischen Verschiebung für ^{15}N

3.20.4 Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D) aus NMR-Kompetitions-experimenten

Konkurrieren zwei Liganden (A und B) um die Bindung eines Proteins (P), so können die Dissoziationskonstanten K_A und K_B wie folgt beschrieben werden:

$$K_A = \frac{[P] \cdot [A]}{[PA]} \quad K_B = \frac{[P] \cdot [B]}{[PB]}$$

In den NMR-Titrations-Kompetitionsexperimenten wurden die SH3-Domäne (P) und der Ligand HIV-1-Nef (B) vorgelegt, und in verschiedenen Konzentrationen die Peptide (A) als Inhibitoren dazu titriert. Durch die Bestimmung der Zunahme einzelner ^1H - ^{15}N -HSQC-Peakvolumina während der Titration kann mittels der Gleichung 3-7 und Gleichung 3-8 (Wang 1995) der K_D -Wert für den Liganden Nef (K_B) unter Vorgabe des K_D -Wertes für die Peptide (K_A) ermittelt werden.

$$[PA] = \frac{[P] \cdot [A]_0}{K_A + [P]} \quad (\text{Gleichung 3-7}) \quad [PB] = \frac{[P] \cdot [B]_0}{K_B + [P]} \quad (\text{Gleichung 3-8})$$

[PA] = Konzentration des Komplexes bestehend aus Protein P und Inhibitor A [M]

[PB] = Konzentration des Komplexes bestehend aus Protein P und des Liganden B [M]

[P] = Konzentration des Proteins P [M]

[A]₀ = Gesamt-Konzentration des Inhibitors A [M]

[B]₀ = Gesamt-Konzentration des Liganden B [M]

wobei:

$$[P] = -\frac{a}{3} + \frac{2}{3}\sqrt{(a^2 - 3b)}\cos\frac{\theta}{3}$$

$$\theta = \arccos \frac{-2a^3 + 9ab - 27c}{2\sqrt{(a^2 - 3b)^3}}$$

$$a = K_A + K_B + [A]_0 + [B]_0 - [P]_0$$

$$b = K_B([A]_0 - [P]_0) + K_A([B]_0 - [P]_0) + K_A K_B$$

$$c = -K_A K_B [P]_0$$

[P]₀ = Gesamt-Konzentration des Proteins P [M]

4 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Bindungsspezifität der Lck-SH3-Domäne untersucht werden. Mittels des Phagendisplay-Verfahrens sollten artifizielle Lck-SH3-Liganden identifiziert werden. Weiterhin sollte eine Sequenzanalyse aller bekannten physiologischen Lck-SH3-Interaktionspartner erfolgen. Dabei sollte nach Identifizierung der relevanten Sequenzbereiche ein Alignment der für die SH3-Bindung wichtigen Proteinregionen erstellt werden. Nach Auswertung dieser physiologischen Sequenzen und im Vergleich mit den Ergebnissen der *in vitro* gefundenen Lck-SH3-Peptid-Liganden sollten Schlüsse für die Bindungsspezifität der Lck-SH3-Domäne abgeleitet werden. Weiterhin sollte die Interaktion von ausgewählten Peptid-Liganden mit der Lck-SH3-Domäne mit verschiedenen spektroskopischen Methoden quantitativ und strukturell untersucht werden. Für vergleichende Analysen sollten die SH3-Domänen der Src-Typ Kinasen Hck, Fyn und Src sowie die SH3-Domänen von PI3K und Abl ebenfalls rekombinant hergestellt und für Bindungsstudien eingesetzt werden. Weiterhin sollte der Einfluss ausgewählter Liganden auf einen bestehenden Komplex aus Lck-SH3 und Hck-SH3 mit dem viralen Nef-Protein des menschlichen Immundefizienzvirus (HIV-1) *in vitro* untersucht werden.

4.1 Klonierung der Glutathion-S-Transferase-SH3-Fusionsproteine

Mit Hilfe von GST-Fusionsvektoren können eukaryontische Proteine als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST) in *E. coli* überexprimiert werden. Oft sind solche Fusionsproteine wasserlöslich und können nach Lyse der Bakterienzellen über Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose (Amersham Bioscience, Freiburg) schnell gereinigt werden. Aus diesem Grund wurde dieses Expressionssystem für die SH3-Proteine ausgewählt.

Zur Präparation der DNA-Fragmente der Abl-, Fyn-, Hck-, PI3K- und Src-SH3-Domänen wurde die PCR-Technik (Kapitel 3.7) angewendet, wobei isolierte DNA aus IMAGE-cDNA-Klonen (Kapitel 2.3) als Template diente. Die Reinigung der PCR-Ansätze erfolgte mittels Gelelektrophorese (Kapitel 3.3) und Gelextraktion (Kapitel 3.4). Als Vektor für die Klonierung

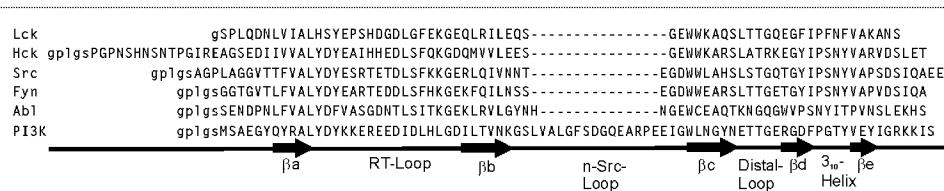


Abbildung 4-1: Aminosäure-Sequenz der verwendeten SH3-Domänen.

Die Aminosäuren sind im Einbuchstaben-Aminosäure-Code (Anhang, S. 141) dargestellt. Kleine Buchstaben kennzeichnen die Aminosäuren, die nach der Proteolyse mit der Protease Thrombin (bei Lck-SH3) oder PreScission (bei Hck-, Src-, Fyn-, Abl- und PI3K-SH3) entstehen. Unterhalb der Sequenz sind schematisch die Sekundärstrukturelemente dargestellt (nach Schweimer et al. 2002).

der SH3-Domänen wurde das Plasmid pGEX-6P-2 (Amersham Bioscience; Abbildung 3-1) verwendet. In diesem Vektor befindet sich stromaufwärts vom *gst*-Gen ein Sequenzabschnitt, der für die PreScission-Protease-Schnittstelle kodiert. Diese Schnittstelle ermöglicht nach der Reinigung des Fusionsproteins ein Abspalten des GST-Tags. Für die Präparation der DNA, kodierend für die GST-SH3-Fusionsproteine, wurden sowohl die SH3-PCR-Fragmente als auch die Vektor-DNA durch die Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xho*I verdaut. Nach Reinigung mittels Gelelektrophorese (Kapitel 3.3) und Gelextraktion (Kapitel 3.4) erfolgte die Ligation (Kapitel 3.5.3) und anschließende Transformation in den Klonierungsstamm *E. coli* DH5α (Kapitel 3.6.3). Zur Analyse der Transformanden wurde die Kolonie-PCR durchgeführt. Zeigten die Amplifikate im analytischen Gel (Kapitel 3.3) die erwartete Größe, so wurde die Richtigkeit der Inserts mittels Sequenzierung (Kapitel 3.8) überprüft. Erst danach erfolgte die Transformation der DNA in den Expressionsstamm *E. coli* BL21. Für die Lck-SH3 stand der Expressionsvektor zu Beginn dieser Arbeit zur Verfügung (Schweimer et al. 2002). Die Aminosäuresequenz der verwendeten SH3-Domänen sowie ihr Struktur- und Sequenz-Alignment sind in der **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**Abbildung 4-1 dargestellt.

4.2 Expression und Reinigung der SH3-Domänen

Für die Untersuchungen der SH3-Proteine mit NMR-Spektroskopie wurde die Expression in M9-Minimalmedium durchgeführt. Wurden ¹⁵N-isotopenmarkierte Proteine benötigt, so wurde ¹⁵N-Ammoniumchlorid als einzige Stickstoffquelle zugegeben. Sollten ¹⁵N- und ¹³C-isotopenmarkierte Proteine hergestellt werden, so wurde zusätzlich zu ¹⁵N-Ammoniumchlorid

^{13}C -Glukose als einzige Kohlenstoffquelle verwendet. Für alle anderen Experimente wurden unmarkierte Proteine in LB-Medium exprimiert.

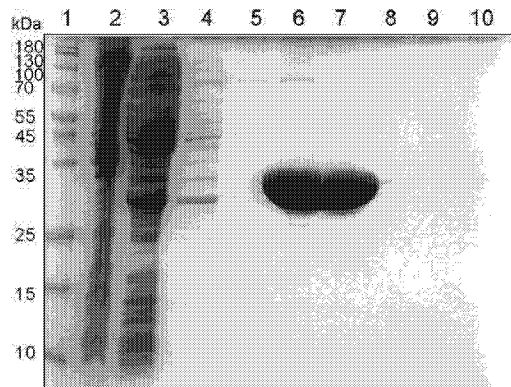


Abbildung 4-2: Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose.

12 % SDS-PAGE der Reinigung des GST-Fyn-SH3-Fusionsproteins. Spur 1: Prestained Marker; Spur 2: Bakterienpellet nach Aufschluss und Zentrifugation; Spur 3: Rohextrakt; Spur 4: Waschen 1; Spur 5: Waschen 2; Spur 6: Elution 1; Spur 7: Elution 2; Spur 8: Elution 3; Spur 9: Elution 4; Spur 10: Elution 5.

Zur Überexpression der SH3-Proteine in *E. coli* BL21-Zellen wurden 2 bis 3 l Medium eingesetzt. Die Zellen wurden nach Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von ca. 0,7 mit 1 mM IPTG induziert und nach 5 h Expression geerntet (Kapitel 3.6.1). Dabei konnten pro Liter Medium 2 bis 3 g Zellen (Nassgewicht) gewonnen werden. Anschließend wurden die Zellpellets bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Für die Reinigung der SH3-Proteine wurden die Zellpellets mittels Ultraschall aufgeschlossen (Kapitel 3.13) und nach Zentrifugation der Überstand (Rohextrakt) für die Affinitätschromatographie mit GSH-Sepharose (Kapitel 3.14.1) verwendet. Die Ausbeute war zwischen 40 und 50 mg Fusionsprotein pro Liter Kulturmedium. In der Abbildung 4-2 ist beispielhaft die Reinigung des GST-Fyn-SH3-Fusionsproteins anhand eines SDS-PAGE dokumentiert. Die meisten *E. coli* eigenen Proteine wurden mit dem Durchfluss oder beim Waschen von der Säule eluiert. Der größte Teil des reinen Fusionsproteins wurde sehr sauber mit den beiden ersten Elutionsfraktionen (Spur 6 & 7) eluiert. Die Resultate der Reinigung der anderen SH3-Domänen waren ähnlich.

Nach der Abspaltung von GST durch die Thrombin-(bei GST-Lck-SH3) oder der PreScission-Protease (bei GST-Fusion von Abl-, Fyn-, Hck-, PI3K- und Src-SH3) (Kapitel 3.14.2) wurden die Spaltprodukte durch Größenausschlusschromatographie (Kapitel 3.14.3) getrennt. Abbildung 4-3 zeigt am Beispiel des GST-Src-SH3 Fusionsprotein die Spaltung und die anschließende Reinigung. Die Elutionsfraktionen 19 und 20 enthielten GST. Das gespaltene Src-SH3-Protein wurde mit den Fraktionen 32 bis 36 eluiert.

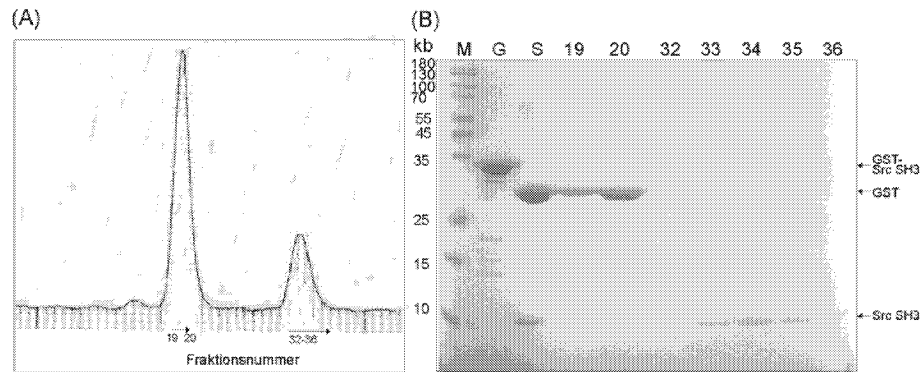


Abbildung 4-3: Spaltung und Größenausschlusschromatographie von GST-Src-SH3.

(A) Chromatogramm einer Größenausschlusschromatographie-Reinigung des Proteolysates des GST-Src-SH3-Fusionsproteins. Es wurde eine HiLoad 26/60 Superdex 75 pg-Säule mit einem Ausschlussvolumen von 300 ml verwendet. Das Volumen der Elutionsfraktionen betrug jeweils 4,5 ml. (B) SDS-Gel des Spaltansatzes und der Reinigung. M: Prestained Marker; G: GST-Src-SH3 vor der PreScission-Spaltung; S: Src-SH3 und GST nach zwei Stunden PreScission-Spaltung; Fraktionen 19 und 20: GST nach Trennung durch die Größenausschlusschromatographie. Fraktionen 32 bis 36: Src-SH3 nach Trennung durch die Größenausschlusschromatographie.

4.3 Identifizierung von Peptiden mit Lck-SH3-Bindungseigenschaften

Um artifizielle Peptid-Bindungspartner für die SH3-Domäne der Lck zu identifizieren, wurde ein Screening der Ph.D.-12-Phagenbibliothek (Kapitel 3.15) durchgeführt. Die Phagen dieser Bibliothek präsentieren auf ihrer Oberfläche Peptide mit 12 randomisierten Aminosäuren. Die Durchführung mehrerer Selektionsrunden ermöglichte das Anreichern von Phagen, deren präsentierte Peptide eine hohe Affinität zum Zielmolekül, in diesem Fall der Lck-SH3, besitzen. Als Ergebnis sollte eine Anreicherung von Phagen stattfinden, deren präsentierte Peptide gemeinsam eine dominierende Aminosäuresequenz aufweisen.

Insgesamt wurden drei Selektionsrunden durchgeführt. Bevor eine Sequenzierung der Phagen-DNA erfolgte, konnte mittels anti-Phagen ELISA-Untersuchungen (Kapitel 3.16) sowohl eventuelle „Plastikbinder“ eliminiert werden, als auch zwischen schwach- und stark-bindenden Phagen unterschieden werden. Für die Sequenzierung wurden 18 stark bindende Phagen ausgewählt.

Name:	Klasse I:	P ₋₆	P ₋₅	P ₋₄	P ₋₃	P ₋₂	P ₋₁	P ₀	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	Vorkommen:
PD1		H	S	K	Y	F	L	P	P	L	P	S	L	11 x
PD2	A H	H	H	W	H	P	L	P	T	L	P			5 x
PD3		H	P	G	Y	P	L	P	P	F	P	L	P	1 x
PD4		H	T	W	H	P	L	P	I	L	P	P	K	1 x
Konsensus		H	x	w	y/h	P	L	P	p	l	P	x	x	

Abbildung 4–4: Peptidsequenzen aus der Phagendisplay-Selektion gegen die Lck-SH3-Domäne.

Vier Sequenzen wurden selektiert, wobei die Sequenz PD1 elfmal, PD2 fünfmal und PD3 und PD4 jeweils einmal vorkamen. Die Sequenzen sind anhand des xPxxP-Motivs angeordnet. Dunkelgrau sind die Reste markiert, die in allen Sequenzen vorkommen. Reste, die überwiegend vertreten sind, sind hellgrau unterlegt. Dick eingerahmt sind die für SH3-Liganden typischen beiden konservierten Proline sowie der mögliche Ankerrest.

Alle selektierten Peptide enthielten das für SH3-Liganden typische Bindungsmotiv xPxxP (Abbildung 4–4, Position P₀ - P₃). Da dies den Erwartungen entsprach, konnte die Selektion als erfolgreich angesehen werden. Elf der 18 Phagen wiesen die einheitliche Sequenz HSKYPLPLPSL (Abbildung 4–4, Sequenz PD1) auf. Die Sequenz AHHHWHPLPTLP (PD2) wurde fünfmal und die Sequenzen HPGYPLPPFPLP (PD3) und HTWHPLPLPPK (PD4) je einmal gefunden. Auffällig ist, dass allen Sequenzen das üblicherweise als „Ankerrest“ dienende und die Peptid-Orientierung festlegende Arginin fehlt. An dieser Position ist dafür ein Histidin oder Tyrosin zu finden. Aufgrund der Lage ihres xP-Dipeptids wurden, als erste Einschätzung, trotzdem alle vier Sequenzen als Klasse-I-Liganden eingestuft.

Auffällig ist das zusätzliche Vorkommen von Leucin an Position P₋₁, Prolin an der P₋₂-Position sowie Histidin an der P₋₆-Position in allen Peptidsequenzen. Daraus resultierend ergibt sich die Konsensus-Sequenz Hxw(y/h)PLPpLP. Große Buchstaben wurden in allen Sequenzen, kleine Buchstaben in mindestens 50 % der 18 Sequenzen gefunden, x steht für keine definierte Aminosäure.

Die PD4-Sequenz könnte aufgrund des Vorkommens der Aminosäure Lysin an der zweiten Position hinter dem xPxxP Motiv (P₅) auch zu den Klasse-II-Liganden gezählt werden (Klasse-II-Motiv: xPpxPp+). PD4 ist vermutlich in der Lage, an die SH3-Domäne in beiden Orientierungen oder in eine dieser beiden Orientierungen zu binden.

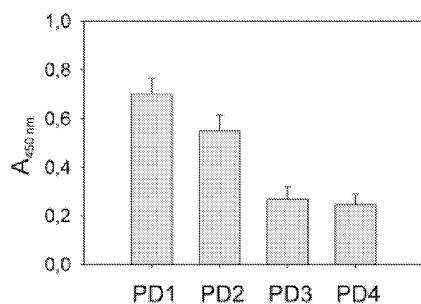


Abbildung 4-5: Relative Bindung der Phagendisplay-Peptide mittels anti-Phagen ELISA.

GST-Lck-SH3 wurde immobilisiert und mit der Phagenpopulation inkubiert, die die Peptide PD1, PD2, PD3 und PD4 präsentierte (Abbildung 4-4). Die gebundenen Phagen wurden mittels Farbreaktion visualisiert und bei 450 nm detektiert. Je stärker die Färbung, desto stärker ist die Bindung der jeweiligen Phagenvariante an Lck-SH3.

Um die relative Bindungsaffinität der vier selektierten Peptide zur Lck-SH3-Domäne zu bestimmen, wurde ein Anti-Phagen-ELISA (Kapitel 3.16) durchgeführt. GST-Lck-SH3 wurde immobilisiert und mit den Phagen inkubiert, die die Peptide PD1, PD2, PD3 und PD4 präsentierte. Die gebundenen Phagen wurden mittels Farbreaktion visualisiert und die Absorption bei 450 nm detektiert. Die Intensität der Färbung gibt die relative Bindungsstärke der getesteten Phagenvariante an. Es wurden jeweils zehnfach-Bestimmungen durchgeführt und der Mittelwert ermittelt. Das Ergebnis zeigt für das Peptid PD1 die stärkste Bindung an Lck-SH3, gefolgt vom Peptid PD2. PD3 und PD4 binden gleich gut, aber schwächer als PD2 an Lck-SH3. Das spiegelt die Häufigkeit der Peptide nach der Phagendisplay Selektion wider.

4.4 Bindungsanalyse der Phagendisplay-Peptide (PD-Pptide) und deren Varianten mittels der PepSpot-Membran

Eine Methode, eine Vielzahl von Protein-Peptid-Interaktionen in relativ kurzer Zeit zu analysieren, ist die Verwendung von PepSpot-Membranen mit immobilisierten Peptiden, wobei die Peptide mittels Spot-Synthese (Frank 1992) auf kontinuierliche Cellulose-Träger halbautomatisch aufgebracht werden. Bei dieser Methode kann eine sehr große Anzahl an immobilisierten Peptid-Liganden (so genannte PepSpots) gleichzeitig mit einem beliebigen Testprotein, z.B. GST-Lck-SH3, inkubiert werden. Findet keine Interaktion statt, wird das Testprotein abgewaschen. Kommt es zu einer Wechselwirkung, bleibt das Zielprotein am zugehörigen PepSpot gebunden und kann anschließend mittels Antikörper und Peroxidase-Reaktion visualisiert werden (Kapitel 3.17). Dabei ist die Intensität der PepSpots ein Maß für die Bindungsstärke der jeweiligen Peptide an die SH3-Domäne. Je stärker die Intensität der PepSpot, desto stärker ist die Bindung der SH3-Domäne an das entsprechende Peptid.

Tabelle 4-1: Sequenzen der auf der PepSpot-Membran immobilisierten PD-Peptide und deren Varianten.

Die Sequenzen sind im Einbuchstaben-Aminosäure-Code dargestellt. In fetten schwarzen Großbuchstaben sind die beiden konservierten Proline und der jeweilige Ankerrest markiert. Die Aminosäuresubstitutionen in Bezug auf das jeweilige PD-Peptid sind durch kleine fette Buchstaben gekennzeichnet. Das kursive N stellt das aminoterminalen Ende dar. Die letzten vier Sequenzen kennzeichnen Kontrollpeptide zur Detektion von unspezifischen Wechselwirkungen.

Peptidname	Sequenz											
	P ₋₆	P ₋₅	P ₋₄	P ₋₃	P ₋₂	P ₋₁	P ₀	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅
PD1	N-	H	S	K	Y	P	L	P	P	L	P	S L
PD1-ncg	N-	H	S	K	a	P	L	a	P	L	a	S L
PD1-R	N-	H	S	K	r	P	L	P	P	L	P	S L
PD1-h	N-	a	S	K	Y	P	L	P	P	L	P	S L
PD2	N-	A	H	H	H	W	H	P	L	P	T L	P g g
PD-2-neg	N-	A	H	H	H	W	a	P	L	a	T L	a g g
PD2-R	N-	A	H	H	H	W	r	P	L	P	T L	P g g
PD2-h	N-	A	H	a	H	W	H	P	L	P	T L	P g g
PD2-w	N-	A	H	H	H	a	H	P	L	P	T L	P g g
PD3	N-	H	P	G	Y	P	L	P	P	F	P	L P
PD3-ncg	N-	H	P	G	a	P	L	a	P	F	a	L P
PD3-R	N-	H	P	G	r	P	L	P	P	F	P	L P
PD3-h	N-	a	P	G	Y	P	L	P	P	F	P	L P
PD4	N-	H	T	W	H	P	L	P	I	L	P	P K g g
PD4-ncg	N-	H	T	W	a	P	L	a	I	L	a	P K g g
PD4-I	N-	H	T	W	H	P	L	P	I	L	P	P a g g
PD4-II	N-	H	T	W	a	P	L	P	I	L	P	P K g g
PD4-R	N-	H	T	W	r	P	L	P	I	L	P	P K g g
PD4-h	N-	a	T	W	H	P	L	P	I	L	P	P K g g
PD4-w	N-	H	T	a	H	P	L	P	I	L	P	P K g g
sauer (D)	N-	D	D	D	G	D	D	G	D	D		
basisch (R)	N-	R	R	R	G	R	R	G	R	R		
aromatisch (F)	N-	F	F	F	G	F	F	G	F	F		
poly-Alanin (A)	N-	A	A	A	G	A	A	G	A	A		

Um die Bindungsspezifität der Lck-SH3-Domäne genauer zu untersuchen, wurden im Folgenden die vier mittels Phagendisplay selektierten Peptide PD1, PD2, PD3 und PD4 sowie einige Varianten dieser Peptide untersucht (Tabelle 4-1).

Die Varianten wurden unter verschiedenen Aspekten ausgewählt. Um die Bedeutung des Kernmotivs zu untersuchen, wurde als Negativkontrolle (PD-neg) in allen Peptiden die beiden konservierten Proline (P₀ und P₃) sowie der dazugehörige Ankerrest (P₋₃) gegen Alanin substituiert. Um die Rolle von Arginin an der Position des Ankerrestes zu prüfen, wurde die Aminosäure an dieser P₋₃-Position (Histidin oder Tyrosin) gegen Arginin ausgetauscht (PD-R). Weiterhin wurde eine Alaninsubstitution des Histidins an der Position P₆, das in allen Sequenzen vorkommt, vorgenommen (PD-h). Hierdurch soll die Rolle des Histidins geklärt werden. Bei den

Peptiden PD2 und PD4, die direkt vor dem Ankerrest an der Position P₄ ein Tryptophan enthalten, wurde ebenfalls ein Alaninaustausch vorgenommen (PD-w). Das Peptid PD4 könnte anhand seiner Sequenz in beiden Orientierungen an die SH3-Domänen binden. Um die Zugehörigkeit von PD4 zu einer der beiden Klassen zu bestimmen, wurde deshalb jeweils der mögliche Ankerrest gegen Alanin substituiert (PD4-I und PD4-II). Ferner sollten Kontrollpeptide (sauer, basisch, aromatisch und poly-Alanin) mögliche unspezifische Bindungen der SH3-Domänen aufzeigen.

4.4.1 Bindung der Lck-SH3-Domäne an PepSpots der Phagendisplay-Peptide und deren Varianten

Das Ergebnis der Inkubation der Lck-SH3-Domäne mit der PepSpot-Membran ist in der Abbildung 4–6 A dargestellt.

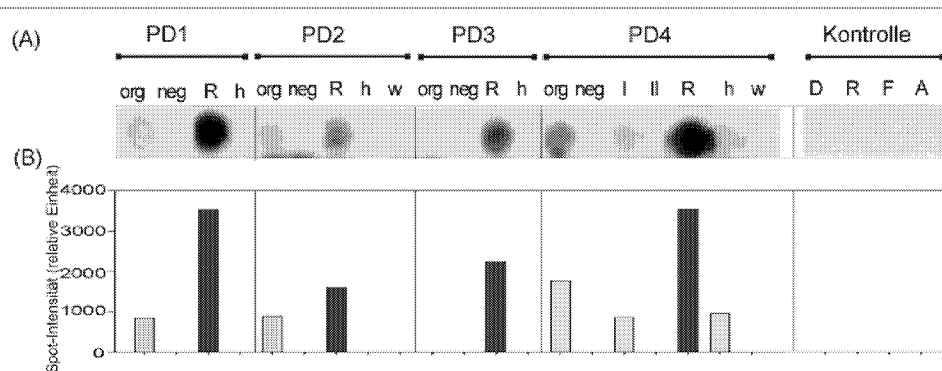


Abbildung 4–6: Bindungsanalyse der mittels Phagendisplay selektierten Peptide PD1, PD2, PD3, PD4 und deren Varianten an die Lck-SH3.

(A) Dargestellt ist die PepSpot-Membran nach Inkubation mit GST-Lck-SH3. Die an die PepSpots gebundenen GST-Lck-SH3-Proteine wurden mittels Peroxidase-konjugierten GST-Antikörper detektiert und mittels Chemilumineszenz-Reaktion visualisiert. Die Bezeichnung der PepSpots bezieht sich auf die Sequenzen in der Tabelle 4-1. Die Zugehörigkeit der Spots zu den PD-Peptiden ist durch einen Balken gekennzeichnet. Ein „org“ bezeichnet die Original selektierten PD-Peptide. Die Negativkontrolle, bei denen die invarianten Proline und der dazugehörige Ankerrest ausgetauscht sind, ist mit „neg“ beschriftet. „R“ kennzeichnet eine Substitution des Ankerrestes an P₃ zu Arginin, „h“ ein Alaninaustausch an P₆ und „w“ eine Alaninsubstitution an P₄. Bei PD4-I ist das Histidin an P₃ und bei PD4-II das Lysin an P₅ gegen Alanin ausgetauscht. Kontrollspots: D = sauer, R = basisch, F = aromatisch, A = poly-Alanin. (B) Die Spot-Intensitäten wurden wie in Kapitel 3.17.1 beschrieben ermittelt. Schwarze Balken kennzeichnen die Substitution zu Arginin an Position P₃. Eine Intensitätsunterscheidung zwischen den PepSpots PD1-R und PD4-R war nicht möglich, da beide Spots gesättigte Signale zeigten.

Wie erwartet, konnte keine Interaktion von Lck-SH3 mit den vier PepSpots PD-(1-4)-neg nachgewiesen werden (Abbildung 4-6). Bei diesen PepSpots sind innerhalb der PD-Peptidsequenzen die konservierten Proline (P_0 und P_3) des xPxxP-Motivs sowie der Ankerrest an Position P_3 jeweils durch Alanin ersetzt worden. Betrachtet man den Austausch der Ankerreste von Histidin bzw. Tyrosin zu Arginin an der Position P_3 (PD1-R), so ist deutlich erkennbar, dass dieser Austausch bei allen vier Peptiden zu einer drastischen Erhöhung der Spotintensität beitrug (siehe auch Abbildung 4-6 B). Im Fall des Histidins an der Position P_6 bewirkte die Alaninsubstitution bei den Peptiden PD1 (PD1-h) und PD2 (PD2-h) eine komplette Aufhebung der Bindung. Beim Peptid PD4 führte dies zu einer eindeutigen Reduzierung der Interaktion (PD4-h). Auch der Austausch von Tryptophan an der Position P_4 bei PD2 und PD4 führte zum Bindungsverlust an die Lck-SH3 (PD-w).

Wie oben erwähnt, scheint anhand der Peptidsequenz von PD4 seine Bindung in beiden Orientierungen an die Lck-SH3-Domäne möglich zu sein. Im Fall der Klasse-I-Orientierung würde Histidin an der Position P_3 als Ankerrest dienen und im Fall der Klasse-II-Orientierung Lysin an P_5 . Zur Bestimmung der Orientierung wurden deshalb einmal das Histidin (PD4-II) und einmal das Lysin (PD4-I) gegen Alanin substituiert. Erfolgt eine Bindung an PD4-II, so weist dies auf eine Klasse-II-Orientierung des Peptids PD4 hin. Umgekehrt deutet eine Interaktion mit PD4-I eine Klasse-I-Orientierung des Peptids an. Das Ergebnis zeigt eine Bindung der Lck-SH3-Domäne nur an PD4-I. Somit scheint PD4 in Klasse-I-Orientierung an Lck-SH3 zu binden, und kann daher als Klasse-I-Ligand der Lck-SH3 eingestuft werden.

4.4.2 Untersuchung der Bindungsspezifität der PD-Peptide und deren Varianten

Um die Bindungsspezifität der Peptide zu bestimmen, wurde neben der Bindung an die Lck-SH3-Domäne zum Vergleich noch die Bindung an die SH3-Domänen von Hck, Src, Fyn, PI3K und Abl untersucht. Abbildung 4-7 zeigt die Intensitäten der einzelnen Peptidspots nach Inkubation mit den jeweiligen SH3-Domänen.

Vergleicht man die Interaktion von Lck-SH3 und den anderen SH3-Domänen zu den PD-Peptiden und deren Varianten, so ist erkennbar, dass sich die Muster der Spot-Intensitäten bei den SH3-Domänen der Lck, Src und Hck ähneln (Abbildung 4-7). Dabei zeigt die Lck-SH3 die größte Übereinstimmung mit der Src-SH3. Die SH3-Domänen der nicht Src-Typ Kinasen Abl und PI3K zeigen eine im Vergleich dazu geringere Bindung mit den PD-Peptiden und ihren Varianten. Dies reflektiert ihre unterschiedliche Liganden-Präferenz im Vergleich zu den Src-Typ

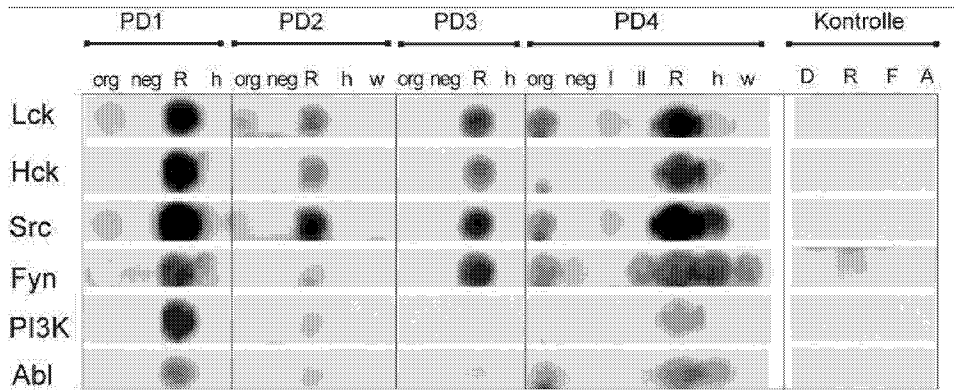


Abbildung 4-7: Analyse der Bindungsspezifität der mittels Phagendisplay selektierten Peptide PD1, PD2, PD3, PD4 und deren Varianten.

PepSpot-Membran nach Inkubation mit den verschiedenen SH3-Domänen. Die an die PepSpots gebundenen GST-SH3-Proteine wurden mittels Peroxidase-konjugierten GST-Antikörper detektiert und mittels Chemilumineszenz-Reaktion visualisiert. Die Bezeichnung der Spots bezieht sich auf die Sequenzen in der Tabelle 4-1. Die Zugehörigkeit der Spots zu den PD Peptiden ist durch einen Balken gekennzeichnet. Ein „-“ bezeichnet die Original-PD Peptide. Die Negativkontrolle, bei denen die invarianten Proline und der dazugehörige Ankerrest ausgetauscht sind, ist mit „neg“ gekennzeichnet. „R“ kennzeichnet eine Substitution des Ankerrestes an P-3 gegen Arginin, „h“ ein Alaninaustausch an P-6 und „w“ eine Alaninsubstitution an P-4. Bei PD4-I ist das Histidin an P-3 und bei PD4-II das Lysin an P-5 gegen Alanin ausgetauscht. Kontrollspots: D = sauer, R = basisch, F = aromatisch, A = poly-Alanin.

Kinasen. In den meisten Fällen ist nur eine Interaktion von Abl- und PI3K-SH3 an die R-Variante (Austausch des Ankerrestes an Position P₃ zu Arginin) zu erkennen. Fyn-SH3 zeigt als einziges Protein eine schwache, aber deutliche Bindung an den basischen Kontroll-PepSpot. Das deutet darauf hin, dass Fyn-SH3 unspezifisch an Peptide mit einem basischen Rest binden kann. So ist es nicht überraschend, dass für die SH3-Domäne von Fyn eine Interaktion mit allen Varianten von PD1 und PD4 gefunden wurde, die jeweils an der Position P₄ (bei PD1) bzw. an der Position P₅ (bei PD4) einen Lysinrest enthalten.

Obwohl die SH3-Domänen der Lck, Src und Hck ähnliche Muster in ihrer Bindung aufweisen, konnten offensichtliche Unterschiede registriert werden. Für Lck-SH3 konnte keine Bindung mit dem PD1-h-Peptid nachgewiesen werden, das an der Position P₆ einen Austausch des Histidins zu Alanin aufweist. Im Gegensatz zur Lck-SH3 konnte für die Src- und Hck-SH3-Domänen noch eindeutig eine (wenn auch schwache) Bindung mit diesem Peptid nachgewiesen werden. Für Lck-SH3 und Src-SH3 ist eine Interaktion mit dem ursprünglichen PD2-Peptid zu sehen. Für die SH3-Domäne von Hck konnte eine Assoziation nur an die PD2-R-Variante gezeigt werden. Die Ergebnisse deuten auf ein unterschiedliches Bindungsverhalten von PD4 für die

untersuchten SH3-Domänen hin. In der Abbildung 4-7 ist für die Lck-SH3 und Src-SH3 eine Bindung mit PD4-I (Klasse-I-Orientierung) und für die SH3-Domänen von Hck und Fyn eine Bindung mit PD4-II (Klasse-II-Orientierung) zu erkennen.

Eine Gemeinsamkeit der vier SH3-Domänen liegt in dem Fehlen bzw. der eindeutigen Reduzierung der Bindung an die Peptide PD2 und PD4, wenn das Tryptophan an der Position P₄ durch Alanin ersetzt wurde.

4.4.3 Optimierung der Bindungsaffinität des Peptides PD1-R an die Lck-SH3

Anhand der Spotmembran aus der Abbildung 4-6 ist erkennbar, dass Lck-SH3 mit den PepSpots PD1-R und PD4-R die stärkste Bindung zeigt. Da PD1 die dominante Sequenz nach Selektion (11 von 18 Phagen) darstellt, wurde auf der Basis von PD1-R eine weiterführende Substitutionsanalyse durchgeführt.

Die vier Aminosäurereste an den Sequenzpositionen P₂, P₁, P₀ und P₃, die in jedem PD-Peptid vorhanden sind, wurden konstant gehalten. Darunter sind die beiden konservierten Proline (P₀ und P₃) vertreten. Weiterhin wurde das Arginin an der Position P₃ unverändert gelassen. Um den Beitrag der anderen sieben Aminosäurereste von PD1-R an der Lck-SH3-Wechselwirkung zu untersuchen, wurden diese systematisch gegen alle neunzehn anderen natürlichen Aminosäuren ausgetauscht. Das in allen PD-Peptiden konservierte Histidin an P₆ (siehe Sequenz-Alignment, Abbildung 4-4) wurde ebenfalls substituiert, um dessen Bedeutung für die Lck-SH3-Wechselwirkung näher zu charakterisieren. Die resultierenden, als PepSpots auf einer Membran vorliegenden Peptide wurden mit GST-Lck-SH3 inkubiert. Wie in Abbildung 4-8 zu sehen, ist an Hand des Musters der Substitutionsmatrix sofort die Bedeutung jeder Aminosäure für die Lck-SH3-Bindung an den verschiedenen Positionen in der Sequenz ablesbar.

Anhand der Substitutionsmembran (Abbildung 4-8 A) wird deutlich, dass für die PepSpots keine Bindung an Lck-SH3 nachgewiesen werden kann, deren Peptide einen Histidinaustausch an der Position P₆ durch die anderen Aminosäuren enthält (obere Zeile). Nur beim Austausch zu Arginin konnte noch eine sehr schwache Bindung nachgewiesen werden. Zum Vergleich ist sowohl die Spotmembran nach Inkubation mit der GST-Src-SH3 (Abbildung 4-8 A unten) als auch die Spot-Intensitäten beider SH3-Domänen mit den P₆-Substitutionspeptiden abgebildet (Abbildung 4-8 B). Bei der Src-SH3 ist an der Position P₆ außer mit Histidin noch mit anderen Aminosäuren (Arginin, Lysin, Isoleucin, Prolin und Phenylalanin) eine zwar generell schwächere, aber dennoch gute Bindung zu erkennen.

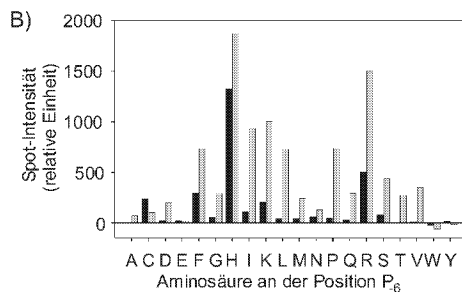
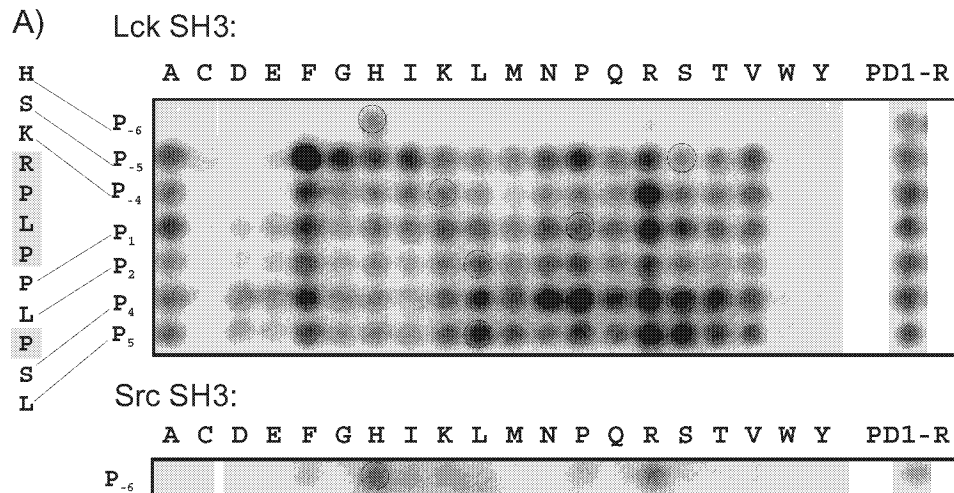


Abbildung 4–8: Substitutionsanalyse des Peptids PD1-R.

(A) Zu sehen ist die PepSpot-Membran nach Inkubation mit GST-Lck-SH3 und GST-Src-SH3. Die Buchstaben oberhalb der Membran zeigen die Aminosäuresubstitutionen der jeweiligen Spalten im Einbuchstaben-Aminosäuren-Code an. Die ursprünglichen Aminosäuren der Positionen P₋₆, P₋₅, P₋₄, P₁, P₂, P₄ und P₅ im Peptid PD1-R wurden gegen alle anderen natürlichen Aminosäuren ausgetauscht.

Für die Lck-SH3 ist jede substituierte Position und für die Src SH3 nur die P₋₆ Position dargestellt. Links sind sowohl die Sequenz von PD1-R als auch die dazugehörigen Positionen zu sehen. Aminosäurereste, die nicht substituiert wurden, sind grau schattiert. Als Kontrollen sind rechts die PepSpots des Peptids PD1-R zu sehen. Die PepSpots von PD1-R-Ausgangspeptiden innerhalb der Membran sind durch Kreise gekennzeichnet. In (B) sind die Spot-Intensitäten an der Position P₋₆ nach Inkubation mit der GST-Lck-SH3 (schwarze Balken) oder GST-Src-SH3 (graue Balken) abgebildet.

An den anderen sechs Positionen (P₋₅, P₋₄, P₁, P₂, P₄ und P₅) werden von der Lck-SH3 viele Substitutionen toleriert. Bei den meisten Substitutionen konnte eine Lck-SH3-Bindung nachgewiesen werden. Viele dieser PepSpots zeigten eine ähnliche Intensität wie PD1-R. Peptide mit Substitutionen zu Tryptophan (Spalte W) oder Tyrosin (Spalte Y) zeigten verringerte Lck-SH3-Bindung. Im Gegensatz dazu bewirkte die Substitution zu Phenylalanin in den meisten Positionen (Spalte F: P₋₄, P₁, P₂, P₄ und P₅) keine Änderung der Lck-SH3-Bindung im Vergleich zum Ausgangspeptid PD1-R. Bei Position P₋₅ ist sogar eine deutliche Affinitätssteigerung zu sehen. Der Austausch zu Cystein verringerte die Interaktion in allen Positionen deutlich (Spalte C). Negativ geladene Aminosäuren (Spalte D: Aspartat und E: Glutamat) verursachten an fast allen Positionen eine drastische Verminderung der Lck-SH3-Bindung. Nur an den Positionen P₄

und P₅ war mit Aspartat und Glutamat eine leichte Assoziation zu erkennen. Die Substitution zu Glycin führte außer bei der Position P₅ bei allen anderen Positionen zu einer Abnahme der Bindung (Spalte G). Ähnlich verhielt es sich mit dem Isoleucinaustausch (Spalte I). Wurden die Positionen durch Arginin (Spalte R) ersetzt, so konnte in fast allen Fällen eine deutliche Interaktion nachgewiesen werden. An den Positionen P₃, P₄ und P₁ ist eine deutliche und an den Positionen P₄ und P₅ eine leichte Affinitätssteigerung zu beobachten.

Zusammenfassend betrachtet, konnte beim Austausch von Histidin an der Position P₆ zu allen anderen Aminosäuren im Fall von PD1-R keine Bindung mit Lck-SH3 nachgewiesen werden. Weiterhin konnten für einige Positionen durch einzelne Aminosäureaustausche eine Verbesserung der Affinität im Vergleich zum PD1-R Peptid erzielt werden. Ein Phenylalanin an Position P₅ erhöhte die Affinität um ein Vielfaches. Diese Variante zeigte auch die stärkste Interaktion mit der Lck-SH3. Sowohl mit Arginin als auch mit Phenylalanin an den Positionen P₄ und P₁ wurde eine stärkere Lck-SH3-Bindung gefunden. An der Position P₂ wurde keine Verbesserung der Interaktion erreicht. Die P₄-Position zeigte mit Asparagin, Prolin und Serin und die Position P₅ mit Asparagin und Serin eine gleichstarke Bindung wie mit dem Peptid PD1-R.

4.5 Bestimmung der Ligandenspezifität aus Sequenzen von physiologischen Interaktionspartner der Lck-SH3-Domäne

Durch die Identifizierung von Peptid-Liganden mittels Phagendisplay und die anschließende Analyse mittels der Spotmembran konnte die Bindungsspezifität der Lck-SH3 für die selektierten „*in vitro*“-Liganden abgeschätzt werden. Nun sollte untersucht werden, ob anhand der Sequenz von natürlichen Liganden der Lck-SH3-Domäne sich eine Konsensus-Sequenz für physiologische Lck-SH3-Liganden und somit ihre Bindungsspezifität *in vivo* ableiten lässt. In der Literatur sind verschiedene physiologische Interaktionspartner für die SH3-Domäne der Lck beschrieben. Die Sequenzen der Lck-SH3-Bindungsregionen sollten miteinander verglichen und ihre Eigenschaften herausgearbeitet werden. Allerdings sind bis jetzt nur für einige wenige Interaktionspartner die exakten Bindungsregionen für die Lck-SH3 bekannt. Der erste Schritt war es deshalb, alle Bindungsregionen innerhalb der Sequenzen der Interaktionspartner zu lokalisieren. Zunächst wurden in den Sequenzen der 21 in der Literatur beschriebenen physiologischen Lck-SH3-Liganden systematisch nach Regionen gesucht, die dem Kriterium der klassischen SH3-Bindung entsprachen (+xxPxxP für Klasse-I- und PxxPx+ für Klasse-II-Liganden) und potenzielle Lck-SH3-Bindungsregionen darstellen. Um abzuschätzen, ob diese

Methode zuverlässige Daten liefert, wurden auch Liganden, bei denen die Bindungsregion schon von anderen Arbeitsgruppen bestimmt worden war, dieser systematischen Suche unterzogen.

Tabelle 4-2: Peptidsequenzen mit potenziellen SH3-Bindungsmotive aus Sequenzen natürlicher Lck-SH3 Interaktionspartner.

Die Sequenzen sind im Einbuchstaben-Aminosäuren-Code dargestellt. Die Auflistung der Peptide ist alphabetisch sortiert. Wenn für ein Protein mehr als eine potenzielle Bindungsregion gefunden wurde, sind die entsprechenden Peptide nummeriert. Die potenziellen invarianten Proline und der vermutliche Ankerrest sind dick markiert. In den Fällen, wo es viele mögliche invariante Proline gibt, ist nichts markiert. Die Position der ersten Aminosäure des Peptids innerhalb der entsprechenden Proteinsequenz ist in Klammern dargestellt. Die Namen der Peptide, für die laut Literatur eine Lck-SH3-Bindung bestätigt ist, sind dick markiert.

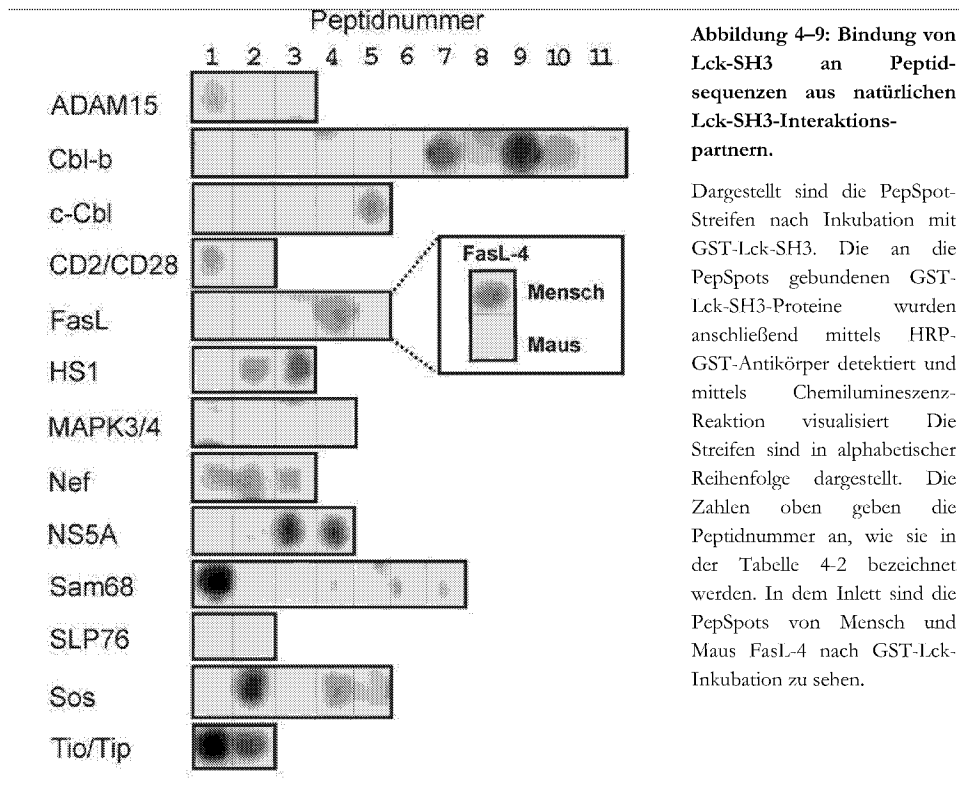
Name	Sequenz	Name	Sequenz
ADAM15-1 [742]	N-PSERPGPPQ R ALLAR	Nef-HIV [68-NL4-3]	N-FPVTPQVPLRPMTYK
ADAM15-2 [762]	N-GPAK P PP R KPLPAD	Nef-HIV [72-SF2]	N-FPVRPQVPLRPMTYK
ADAM15-3 [797]	N-VVPSRPAPPPPTVSS	Nef-SIV [99-mac ₂₃₉]	N-SVRPKVPLRTMSYKL
Cbl-1 [420]	N-PIIVDPFDPRDEGSR	NS5A-1 [22]	N-WLQSKLLPRLPGVPF
Cbl-2 [500]	N-PHLSLPPVPPRLDLI	NS5A-2 [339]	N-VHGCPLPPTKAPP I P
Cbl-3 [543]	N-PLPAPPPPLRDEPPP	NS5A-3 [344]	N-LPPTKAPP I PPERRK
Cbl-4 [557]	N-PPPERPP I PPDNRL	NS5A-4 [347]	N-TKAPP I PPRRKRTV
Cbl-5 [581]	N-VPSRDPPMPLEAWC	PI3K-1 [303]	N-IHVLDTPDPALDE
Cbl-6 [668]	N-PPRLSPPPPVTTLLP	PI3K-2 [365]	N-IRGIDIPVLPNTDL
Cbl-7 [773]	N-SDPVLP P ARPPTR	PI3K-3 [555]	N-LEAIIATDPLNPLTA
Cbl-8 [818]	N-PPSLPPPPPPARHSL	PI3K-4 [779]	N-LPESFRVPYDPLKA
Cbl-9 [863]	N-ASGQVPL P ARRLPG	PI4K-1 [136]	N-DYFSCPPKFPTQGEK
Cbl-10 [898]	N-GSQAPAR P KPRPL	PI4K-2 [360]	N-HVLCWAPTDPTGLS
Cbl-11 [970]	N-FAFPPPVSPRLNL	PI4K-3 [375]	N-YFSSMYPPHPLTAQY
c-Cbl-1 [490]	N-QASLPPVPPRLDLLP	PI4K-4 [522]	N-VQPGCYLPSNPEAIV
c-Cbl-2 [527]	N-LHKDKPLVPPTLRD	Sam68-1 [34]	N-PSRQPP L PHRSRGG
c-Cbl-3 [536]	N-PPTLRDLPPPPPPDR	Sam68-2 [59]	N-PATQPP L LPPSATG
c-Cbl-4 [541]	N-DLPPPPPPDRPYSVG	Sam68-3 [81]	N-PAPT L LPPSATASV
c-Cbl-5 [816]	N-GSQVPERPPKPPFRR	Sam68-4 [295]	N-PPPPPPVPRGRGVGPP
CD2 [297]	N-PPLPRPRVQPKPPHG	Sam68-5 [327]	N-ATVTRGVPPPTVRG
CD28 [182]	N-RKPYQPYAPARDFAA	Sam68-6 [352]	N-IQRIPLPPPPAPET
FasL-1 [17]	N-SSASSPWAPPGLTV	Sam68-7 [420]	N-RPSLKAPPARPVKGA
FasL-2 [39]	N-RPGQRPPPPPPPPP	SLP76-1 [182]	N-TPQQPPVPPQREMAA
FasL-3 [51]	N-PPPLPPPPPPPLPP	SLP76-2 [400]	N-PLPNKPRPPSPAEEE
FasL-4 [62]	N-PLPPLPLPLKKRGN	SOS-1 [1020]	N-NPKPLPRFPKKYSYP
FasL-5 [127]	N-LEKQIGHSPPEKK	SOS-2 [1147]	N-VPVPPVPPRRRPES
hDgl-2 [152]	N-VSHSHIS P IKPTEAV	SOS-3 [1173]	N-SKHLDSPPAIPPRQP
hDgl-1 [64]	N-PKCIDRSKPSEPIQP	SOS-4 [1207]	N-PPESP L LPPREPVR
hDgl-3 [165]	N-AVLSP P PTVPVIVL	SOS-5 [1284]	N-LHSIAGFPVPPRQST
hDgl-4 [170]	N-PPTVPV I PVLPVPAE	TIO [184]	N-PGIPPPQLPPRPANL
HS1-1 [269]	N-KAVTKRSPEAPQPVI	TIP [171]	N-DPGMPT P PLPPRPAN
HS1-2 [319]	N-REHPV L LPIRQTLP	WASP-1 [184]	N-LDRP H EPEKVPRA P H
HS1-3 [338]	N-NEEPPALPPRTLEGL	WASP-2 [270]	N-RVLVRPHEPPPPPPM
SH2-Kinase Linker	N-PCQTQKPQKPWWEDE	WASP-3 [318]	N-VFVSP T PPPPPPPLP
MAPK3-1 [30]	N-MSK P PAPNPTPPRNL	WASP-4 [347]	N-PPPPVPPPPPPPPATA
MAPK3-2 [281]	N-VVEE S PQ L PADRF S	WASP-5 [363]	N-LQAPAVPPPPAP L Q I
MAPK4-1 [23]	N-PVGSPAPGH P AVSSM	WASP-6 [380]	N-GVLHPAPP P PIAPPLV
MAPK4-2 [385]	N-LDQMPATPSSPMYVD	WASP-7 [423]	N-LPPPPPPPPPLPPPGI

In den Fällen, bei denen die Lck-SH3-Bindung mit einem Protein aus einem vom Menschen abweichenden Organismus nachgewiesen worden war (z. B. Maus bei HS1/LckBP1 (Takemoto et al., 1995) und FasL (Hane 1995)), wurde in dieser Arbeit bewusst die entsprechende Aminosäuresequenz des menschlichen Proteins eingesetzt. Es wurden insgesamt 80 Sequenzregionen aus den 21 Ligandensequenzen gefunden, die ein potenzielles Lck-SH3-Bindungsmotiv enthalten. Die Anzahl der Bindungsregionen, die innerhalb eines Proteins gefunden wurden, variierten von eins bis elf. Jede dieser Region umfasste eine Länge von 13 bis 15 Aminosäuren. Die Sequenzen der gefundenen potenziellen Lck-SH3-Bindungsregionen sind in der Tabelle 4-2 zusammengefasst. Diese potenziellen Bindungsregionen wurden als Peptide auf der PepSpot-Membran immobilisiert und anschließend auf eine Lck-SH3-Bindung hin untersucht.

Für ADAM15 wurden durch die systematische Suche nach dem PxxP-Motiv drei prolinreiche Regionen gefunden. Eine Bindung von Lck-SH3 wurde nur an das Peptid ADAM15-1 nachgewiesen (Abbildung 4–9). Dies stimmt mit den Ergebnissen von Poghosyan et al. (2002) überein. Für das HS1-Protein sind drei prolinreiche Regionen und eine Interaktion von Lck-SH3 an zwei dieser Regionen (HS1-2 und HS1-3) beschrieben (Takemoto95). Auch hier wurden durch die Analyse der Proteinsequenz drei prolinreiche Bereiche innerhalb des HS1-Proteins gefunden. Wie in der Abbildung 4-9 zu sehen, konnte die Bindung von Lck-SH3 an die beiden Peptide HS1-2 und HS1-3 bestätigt werden. Für CD2, die drei Nef-Peptide, SLP-76, Tio und Tip konnten in allen Fällen die Bindung an die Lck-SH3 nachgewiesen werden, was die Literaturdaten bestätigt. Das CD28-Peptid zeigte in der PepSpot-Analyse eine zwar schwache, aber noch detektierbare Bindung an Lck-SH3.

Für das Protein NS5A wurden durch die PxxP-Motivsuche wie in der Literatur beschrieben vier prolinreiche Regionen gefunden. Die Abbildung 4–9 zeigt eine Bindung von Lck-SH3 an die beiden PepSpots NS5A-3 und NS5A-4. Das Ergebnis zeigt eine Übereinstimmung mit der von MacDonald et al. (2003) veröffentlichten Ergebnissen.

Für das Protein Sos sind fünf prolinreiche Regionen gefunden worden. Für Sos ist eine starke Lck-SH3-Bindung an das Peptid 2 und eine schwächere für die Peptide 3 und 5 beschrieben worden (Park et al. 1998). Das Ergebnis dieser Arbeit zeigt ebenfalls eine Bindung von Lck-SH3 an das Peptid 2 und Peptid 5. Abweichend ist jedoch keine Assoziation an Peptid 3, sondern eine schwächere Interaktion an das Peptid 4 nachgewiesen (Abbildung 4–9).



Die Ergebnisse der Spotmembran-Analyse bestätigten in den Fällen ADAM15, CD2, HS1, Nef, NS5A, SLP76, Tio und Tip ihre Bindung an die SH3-Domäne der Lck, wie sie in der Literatur beschrieben sind. Im Fall von ADAM15, HS1, NS5A und SLP-76, wo es jeweils mehrere mögliche Bindungsregionen gab, wurde exakt eine Interaktion an die in der Literatur beschriebenen Regionen gezeigt. Nur beim Sos-Protein konnte keine Bindung an das Peptid 3 nachgewiesen werden. Somit erwies sich diese Methode als ausreichend, um die noch unbekannten Lck-SH3-Bindungsstellen für die restlichen Proteine zuverlässig ermitteln zu können.

Im Gegensatz zu den oben genannten Proteinen waren für die Proteine PI3K, PI4K, hDgl, WASP, MAPK3, MAPK4, c-Cbl, Cbl-b, Sam68 und FasL (Prasad et al. 1993; Hane et al. 1995; Keane et al. 1995; August et al. 1996; Fusaki et al. 1997; Hanada et al. 1997; Zhu et al. 1997; Hawash et al. 2002) die Bindungsregionen für die Lck-SH3 innerhalb dieser Proteine nicht bekannt. Da die Sequenz der Phosphatidylinositol-Kinase (PI3K und PI4K) keine Übereinstimmung mit dem klassischen SH3-Bindungsmotiv aufweist (+xxPxxP für Klasse-I- und

PxxPx+ für Klasse-II-Liganden), wurden hier deshalb Sequenzregionen ausgewählt, die nur dem Kernmotiv PxxP entsprechen. Es konnten aber keine detektierbaren Interaktionen der entsprechenden Peptide mit der Lck-SH3 gefunden werden. Auch für die Peptide aus den Proteinen hDgl, Lck-SH2-Kinase-Linkerregion und WASP konnte keine Bindung an die Lck-SH3-Domäne nachgewiesen werden (Abbildung nicht dargestellt). Im Fall von MAPK konnte eine schwache Interaktion an MAPK3-1 beobachtet werden (Abbildung 4-9).

Für die Proteine c-Cbl, Cbl-b, Sam68 und FasL konnte die Lck-SH3-Bindungsstelle innerhalb dieser Proteine deutlich lokalisiert werden. Beim Protein c-Cbl zeigte nur das Peptid c-Cbl-5 eine Interaktion mit der Lck-SH3. Im Fall von Cbl-b konnten drei mögliche Interaktionsregionen lokalisiert werden. Die stärkste Bindung an die Lck-SH3 zeigte das Peptid Cbl-b-9. Die Peptide Cbl-b-7 und Cbl-b-10 zeigten eine weniger starke Bindung an die SH3-Domäne der Lck. Für die Peptide Cbl-b-2 und Cbl-b-8 ist eine sehr schwach detektierbare Bindung zu sehen. Beim Protein Sam68 zeigte das Peptid Sam68-1 eine starke Bindung an die Lck-SH3. Die Peptide Sam68-4, -5 und -7 zeigen nur eine schwache Interaktion. Im Fall von FasL findet eine Interaktion nur mit dem Peptid FasL-4 statt. In einer zusätzlichen Analyse wurde ergänzend zum FasL-4-Peptid aus Mensch das entsprechende Maus FasL-4-Peptid untersucht (AS: LPLPPLTPLKKKDHN). Die Bindung an das menschliche FasL-4-Peptid konnte wieder bestätigt werden. Im Gegensatz dazu wurde keine Interaktion der Lck-SH3 mit dem Maus FasL-4-Peptid gefunden (Abbildung 4-9, Inlett).

4.5.1 Gemeinsame Sequenzelemente der physiologischen Lck-SH3-Interaktionspartner

Um die Gemeinsamkeiten der Lck-SH3-Bindungsregionen aus den physiologischen Interaktionspartnern und somit die Bindungsspezifität der Lck-SH3 *in vivo* zu bestimmen, wurden die Peptidsequenzen der einzelnen physiologischen Bindungspartner in einem Alignment zusammengefasst. Es wurden Peptidsequenzen ausgewählt, dessen PepSpot in der PepSpot-Analyse die stärksten Wechselwirkungen mit der Lck-SH3 zeigten (Abbildung 4-10). Betrachtet wurden nur die 15 Sequenzen, deren Spotintensitäten Werte über 1000 (relative Einheiten; Kapitel 3.17) zeigten.

Auffallend ist, dass alle Peptide ohne Ausnahme den Klasse-II-Liganden angehören. Die entsprechende Ankerposition P₃ ist bei 12 von 15 Peptiden von einem Arginin besetzt. Bei den

	P ₇	P ₆	P ₅	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P ₀	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆
Sam68-1	G	G	R	S	R	H	P	L	P	P	Q	R	S	P -N
Tio	L	N	A	P	R	P	P	L	Q	P	P	P	I	G P -N
Cbl-b-9	G	P	L	R	R	A	P	P	L	P	V	Q	G	S A -N
Sos-2	S	E	P	R	R	R	P	P	V	P	P	V	P	V -N
Tip		N	A	P	R	P	P	L	P	P	T	P	M	G P D -N
Cbl-b-7	R	T	P	P	R	A	P	P	L	P	V	P	D	S -N
HS1-3	G	E	L	T	R	P	P	L	A	P	P	E	E	N -N
NS5A-3		K	R	R	P	P	P	I	P	P	A	K	T	P P L -N
NS5A-4	V	T	R	K	R	R	P	P	P	I	P	P	A	K T -N
Sos-4	R	V	P	E	R	P	P	L	L	P	P	S	E	P P -N
Nef-SF2	K	Y	T	M	P	R	L	P	V	Q	P	R	V	P F -N
Cbl-b-10	R	P	R	P	K	P	P	R	A	P	A	Q	S	G -N
HS1-2	P	L	T	Q	R	I	P	L	L	P	V	P	H	E R -N
FasL-4	N	G	R	K	K	L	P	P	L	P	L	P	P	L P -N
c-Cbl-5	R	R	P	F	P	K	P	P	R	E	P	V	Q	S G -N
Konsensus	r	p	r	p	R	P	P	l/p	l	P	v/p	p	x	g -N

Abbildung 4-10: Alignment der an die Lck-SH3-Domäne bindenden Peptidsequenzen aus physiologischen Interaktionspartnern.

Dargestellt sind nur Peptidsequenzen, die bei der PepSpot-Analyse eine starke Interaktion mit der Lck-SH3 zeigten. Die Sequenzen sind nach abnehmender Stärke der Bindung geordnet. Die Sequenzen sind mit dem carboxyterminalen Ende voran abgebildet, wie dies für Sequenzen von Klasse-II-Liganden üblich ist. Betrachtet wurden nur Peptidsequenzen mit Spot-Intensitäten von Werten über 1000 relative Einheit. In dunkelgrau sind die beiden konservierten Proline und in hellgrau der mögliche Ankerrest markiert. Unten ist die Konsensus-Sequenz dargestellt. Groß geschriebene Aminosäuren kommen über 60 % an den jeweiligen Positionen vor. Die beiden fetten Buchstaben sind in allen Sequenzen zu finden. Klein geschriebene Aminosäuren kommen mit mehr als 25 % vor. Für die x-Position ist keine klare Aminosäure-Präferenz zu erkennen.

restlichen drei Peptiden kommt an dieser Position ein Lysin vor. Die resultierende Konsensus-Sequenz aus diesen Peptidsequenzen kann wie folgt dargestellt werden: N-gxp(v/p)**Pl**(l/p)**PPR**prpr. Groß geschriebene Buchstaben repräsentieren Aminosäurereste, die mit einer Häufigkeit von über 60 % an den Positionen vorkommen. Die fett markierten Buchstaben sind in allen Sequenzen zu finden. Aminosäuren in Kleinbuchstaben kommen mit einer Häufigkeit von mehr 25 % an der jeweiligen Sequenzposition vor. An der mit x bezeichnete Position ist keine klare Präferenz für eine bestimmte Aminosäure zu erkennen. Innerhalb der 15 Sequenzen sind die Positionen P₆, P₄, P₃ und P₄ bevorzugt von Prolin besetzt. In der Nähe des Kern-Motivs sind häufig Argininreste zu finden. An den Positionen P₄, P₄ und P₅ sind bis auf einige Ausnahmen (P₄ in Nef-SF2 und Sos-2 sowie P₅ in Tio) keine hydrophoben Aminosäuren zu finden. Aromatische Aminosäuren sind kaum und Cysteine gar nicht anzutreffen. Im Bereich

zwischen P₇ bis P₄ kommen 18 positiv geladene und nur drei negativ geladene Aminosäuren vor (Abbildung 4–10).

4.6 Lck-SH3-Bindung an bekannten *in vitro* selektierten Konsensus-Peptiden

Wie in Kapitel 4.4 dargestellt, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch andere SH3-Domänen an die gegen die Lck-SH3-Domäne selektierten Peptide und ihre Varianten binden können. Um die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse für die Lck-SH3-Peptid-Liganden besser einschätzen zu können, wurde ebenfalls die Spezifität anderer aus der Literatur bekannter Konsensus-Peptide untersucht. Diese Konsensus-Peptide wurden durch *in vitro* Selektionen ermittelt. Die Bindungen dieser Peptide an die in der Selektion verwendete Lck-SH3-Domäne sowie an anderen SH3-Domänen wurden bestimmt und miteinander verglichen. Es wurden Peptidsequenzen ausgewählt, die als Konsensus-Sequenz für die Kontroll-SH3-Domänen Src, Fyn, Hck, Abl und PI3K beschrieben sind (Brannetti et al. 2000). In Abbildung 4–11 ist die Membran nach Inkubation mit den SH3-Domänen der Lck und den Kontroll-SH3-Domänen gezeigt.

Name	Sequenz	Lck	Hck	Src	Fyn	PI3K	Abl
Src-Klassell	N- R P P V P P R P G T						
Fyn-Klassell	N- R P P V P P R P M T						
PI3K-Klassell	N- R A A R P L P P L P P						
Abl-Klassell	N- P P P Y P P P P P P						
Hck-Klassell	N- R R F R P L P P P P						
Hck-Klassell	N- R P P V P P R P S T						

Abbildung 4–11: Bindungseigenschaften von Lck-SH3 und den Kontroll-SH3-Domänen an verschiedene Konsensus-Liganden.

PepSpot-Membran nach Inkubation mit verschiedenen GST-SH3-Domänen. Die an die PepSpots gebundenen GST-SH3-Proteine wurden mittels HRP-GST-Antikörper detektiert und mittels Chemilumineszenz-Reaktion visualisiert. In der Sequenz sind die invarianten Proline und der Ankerrest fett markiert.

Offensichtlich ist die Lck-SH3 in der Lage, auch an Konsensus-Sequenzen von anderen SH3-Domänen zu binden. Auffällig ist die starke Bindung von Lck-SH3 an alle PepSpots mit immobilisierten Klasse-II-Peptid-Liganden (Src, Fyn, Hck). Weiterhin ist eine schwache Interaktion an den PI3K-Klasse-I-PepSpot und eine kaum detektierbare Bindung an den Hck-Klasse-I-PepSpot zu erkennen.

Auch die Kontroll-SH3-Domänen zeigten neben der Bindung an ihrem Konsensus-PepSpot eine Interaktion an die anderen Konsensus-Peptide. Das Bindungsmuster für die SH3-Domänen der Src-Typ Kinasen Lck, Hck, Src und Fyn ist sehr ähnlich, wobei in einigen Fällen große Unterschiede in den Spot-Intensitäten zu erkennen sind. Bei allen Kontroll-SH3-Domänen wurde die stärkste Interaktion nicht mit ihrem Konsensus-PepSpot erzielt. Auffällig ist die alleinige Bindung von Abl-SH3 an den Abl-Klasse-I-PepSpot. Dies bestätigt die Zuverlässigkeit dieser Methode, da für die Abl-SH3 als einzige SH3-Domäne eine abweichende Ligandenspezifität berichtet wurde (Tyrosin statt Arginin an der Ankerposition; Musacchio et al. 1994; Pisabarro et al. 1998).

4.7 Bestimmung der Bindungsaffinität der Phagendisplay-Peptide PD1 und PD1-R an die Lck-SH3-Domäne

Die Bindung von einem der selektierten Peptide an die Lck-SH3-Domäne sollte quantitativ und strukturell charakterisiert werden. Dafür wurde das Peptid PD1 ausgewählt, da es bei der Phagendisplay-Selektion mit einer Häufigkeit von über 60 % auftrat und beim Anti-Phagen-ELISA die höchste Affinität aufwies (Kapitel 4.3.). Weiterhin wurde die Variante PD1-R analysiert, bei welchem in Position P₃ die Aminosäure Tyrosin gegen Arginin ausgetauscht wurde. Diese Variante zeigte bei der PepSpot-Analyse im Vergleich zum PD1-Peptid eine erhöhte Bindungsaffinität zur Lck-SH3-Domäne (Kapitel 4.4).

Für die Bestimmung der Bindungsaffinität der selektierten Peptide an die SH3-Domäne wurde die Änderung der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz bei Peptidzugabe ermittelt (Kapitel 3.18). Mittels Fluoreszenz-Titrations-Messung wurde die Dissoziationskonstante (K_D -Wert) der Peptide PD1 und PD1-R an die Lck-SH3-Domäne bestimmt. Dafür wurden 0,5 μ M Lck-SH3 vorgelegt und die Peptide in steigenden Konzentrationen dazu titriert. Um die Bindungsspezifität der Peptide PD1 und PD1-R an die Lck-SH3-Domäne zu bestimmen, wurden auch Fluoreszenz-

Titrationen von PD1 und PD1-R zu den SH3-Domänen von Fyn, Hck, Src, Abl und PI3K durchgeführt.

Für die Bestimmung der K_D -Werte wurde die Änderung der Fluoreszenzsignale in Abhängigkeit der Peptidkonzentrationen dargestellt (Abbildung 4-12) und die nichtlineare Regressionsrechnung anhand der Gleichung 3-2 (Kapitel 3.18.1) durchgeführt.

Die Lck-SH3 interagiert mit einem K_D -Wert von ca. 49 μM mit dem Peptid PD1 und 23 μM mit dem PD1-R-Peptid (Tabelle 4-3). Im Kapitel 4.4 konnte anhand der PepSpot-Analyse eine stärkere Bindung von Lck-SH3 an PD1-R als an PD1 gezeigt werden. Die K_D -Werte bestätigen diese Spotmembran-Ergebnisse. Für das Peptid PD1 wurden steigende Affinitäten für die folgenden Kontroll-SH3-Domänen gemessen: PI3K (112 μM), Src (47 μM), Fyn (4 μM) und Hck (0,2 μM). Für das Peptid PD1-R wurde eine zunehmende Bindungsaffinität an die anderen SH3-Domänen in der Reihenfolge PI3K (13 μM), Fyn sowie Src (beide 2,2 μM) und Hck (0,5 μM) festgestellt. Für die Abl-SH3 konnten keine reproduzierbaren Daten ermittelt werden. Im Gegensatz zu den Src-Typ-Kinasen (Lck, Fyn, Hck und Src) zeigten die SH3-Domänen der nicht Src-Typ-Kinasen PI3K und Abl nur eine schwache bzw. gar keine Bindung an das Peptid PD1. Überraschenderweise zeigte die Hck-SH3 vergleichsweise eine sehr starke Interaktion mit beiden Peptiden.

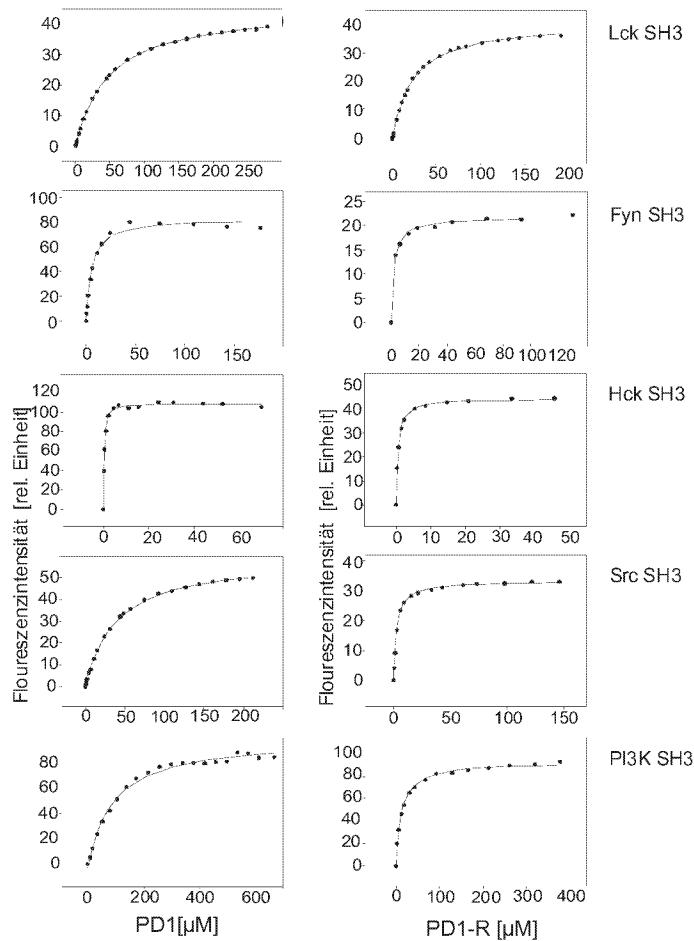


Abbildung 4-12:
Fluoreszenz-Titration
von PD1 und PD1-R zur
SH3-Domäne von Lck,
Fyn, Hck, Src, Abl und
PI3K.

Es wurden jeweils 0,5 μM SH3-Protein in einem Volumen von 1,6 ml vorgelegt und PD1 bzw. PD1-R aus wässrigen Stammlösungen in steigenden Konzentrationen dazu titriert. Dargestellt sind die Werte nach Abzug des Hintergrundes (schwarze Punkte). Die Excitationswellenlänge war 290 nm, die Emissionswellenlänge 345 nm. Die nichtlineare Regressionsrechnung der Datenpunkte (durchgezogene Linie) wurde unter der Annahme einer einfachen bimolekularen Reaktion durchgeführt. Für die Abl-SH3 konnten keine reproduzierbaren Daten gewonnen werden.

SH3-Domäne	K_D (μM)	
	PD1-Peptid	PD1-R-Peptid
Lck-SH3	$48,7 \pm 1,7$	$23,1 \pm 2,0$
Fyn-SH3	$3,9 \pm 0,6$	$2,2 \pm 0,4$
Hck-SH3	$0,23 \pm 0,03$	$0,47 \pm 0,02$
Src-SH3	$47,1 \pm 1,7$	$2,2 \pm 0,2$
PI3K-SH3	$112,1 \pm 10,1$	$13,1 \pm 0,5$
Abl-SH3	nicht bestimmbar	

Tabelle 4-3: Dissoziationskonstanten (K_D -Werte) der SH3-Domänen mit den Peptiden PD1 und PD1-R.

Die nichtlineare Regressionsrechnung der Datenpunkte aus der Fluoreszenzmessung erfolgte mit der Gleichung 3-2 (Kapitel 3.18.1).

4.8 Untersuchung der Konformation der Phagendisplay-Peptide PD1 und PD1-R und der Peptid-SH3-Komplexe

Im vorherigen Kapitel konnte die Bindung der Peptide PD1 und PD1-R an die SH3-Domänen quantitativ bestimmt werden. Deshalb war es interessant, die Konformation der freien Peptide PD1 und PD1-R, der freien SH3-Domänen sowie der entsprechenden Protein-Peptid-Komplexe zu analysieren. Dafür wurden Messungen am CD-Spektrometer durchgeführt. Diese Methode erlaubt eine Aussage über die Gesamt-Sekundärstruktur der untersuchten Peptide und Proteine. Durch Zugabe eines Liganden zu einem vorgelegten Protein kann die Änderung der Konformation bei Bindung ermittelt werden.

Im Fern-UV-CD-Spektrum zeigt das Peptid PD1 ein Minimum um 200 nm und ein Maximum bei 228 nm (Abbildung 4-13 A). Auch das Peptid PD1-R zeigt bei 200 nm ein Minimum und Maximum um 224 – 228 nm. Das Fern-UV-CD-Spektrum einer PPII-Helix ist durch ein Minimum bei ca. 200 nm und ein Maximum um 230 nm gekennzeichnet (Manning et al. 1991; Rabanal et al. 1993; Kelly et al. 2001). Durch Vergleich der erhaltenen Spektren mit typischen PPII-Helix-Spektren aus der Literatur (Manning et al. 1991; Rabanal et al. 1993; Kelly et al. 2001), zeigte sich, dass die Spektren auf eine Konformation einer PPII-Helix der PD-Peptide in wässriger Lösung hindeuten.

In der Abbildung 4-13 B sind die CD-Spektren der sechs in dieser Arbeit verwendeten SH3-Domänen (jeweils 12,5 μ M) abgebildet. Die CD-Spektren der SH3-Domänen zeigen

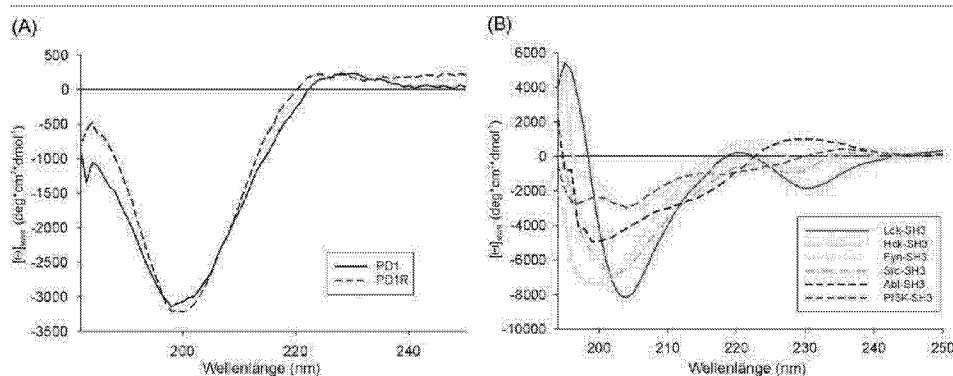


Abbildung 4-13: Fern-UV-CD-Spektren der Peptide PD1 und PD1-R (A) sowie der sechs verwendeten SH3-Domänen (B).

Es wurden CD-Spektren von jeweils 12,5 μ M PD1 und PD1-R in H_2O (A) und jeweils 12,5 μ M SH3-Domäne in PBS (B) aufgenommen. Alle Spektren wurden bei 21,5 $^{\circ}\text{C}$ unter Verwendung einer 0,2 cm-Küvette aufgenommen. Die molaren Elliptizitätswerte sind auf die Anzahl der Aminosäurereste bezogen.

Unterschiede in ihrem Minimum und Maximum auf. Ihre Minima liegen zwischen 195 und 205 nm. Die Src-Typ SH3-Domänen (Lck, Fyn, Hck und Src) zeigen ein sich ähnelndes Maximum um 220 – 222 nm. Das entsprechende Maximum der nicht Src-Typ SH3-Domänen Abl und PI3K liegt dagegen bei 229 nm beziehungsweise bei 236 nm.

Des Weiteren wurden Fern-UV-CD-Spektren von jeweils 12,5 μ M SH3-Domänen im Komplex mit 12,5 μ M Peptid aufgenommen. Um abzuschätzen, ob die Bindung eine konformationelle Änderung im Peptid und/oder Protein hervorruft, wurden die Spektren der Komplexe mit den Spektren der jeweiligen SH3-Domäne und Peptid im freien Zustand verglichen (Abbildung 4-14). Zum visuellen Vergleich wurden die Spektren der freien SH3-Domänen (aus Abbildung 4-13 B) mit den Spektren der freien Peptide (aus Abbildung 4-13 A) addiert. Die Spektren der SH3-Peptid-Komplexe ähneln sehr den Spektren aus der Summe der jeweiligen SH3-Domäne und dem jeweiligen Peptid im freien Zustand (Abbildung 4-14). Generell scheint die Bindung nur eine sehr geringe Konformationsänderung zu bewirken.

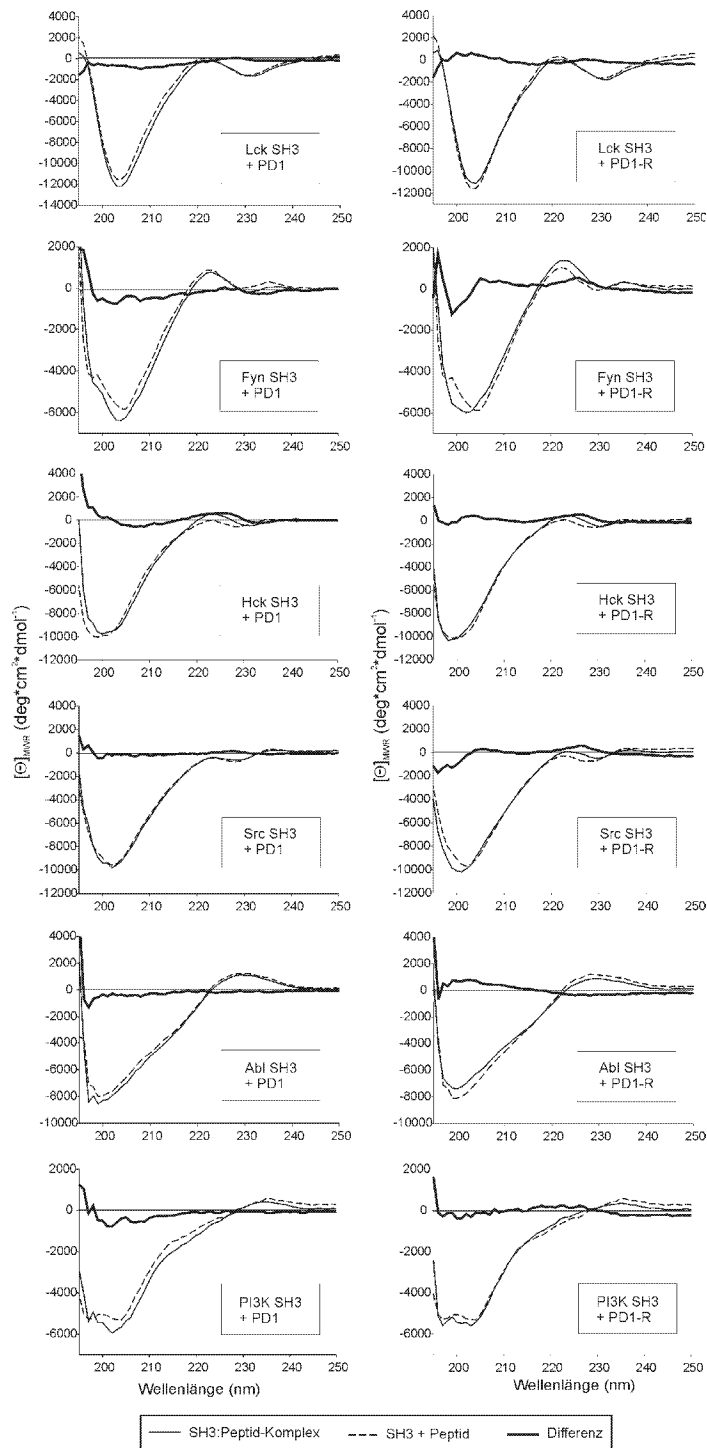


Abbildung 4-14: Fern-UV-CD-Analyse der Komplexe zwischen den Peptiden PD1 und PD1-R und den SH3-Domänen.

Je $12,5 \mu\text{M}$ SH3-Protein wurden mit je $12,5 \mu\text{M}$ Peptid gemessen. Die durchgezogenen Linien zeigen die Spektren der SH3:Peptid-Komplexe. Zum Vergleich sind die Spektren aus der Summe der jeweiligen SH3-Domäne und dem jeweiligen Peptid im freien Zustand dargestellt (gestrichelte Linien; SH3 + Peptid). Die dicke Linie stellt die Differenz dieser beiden Spektren dar.

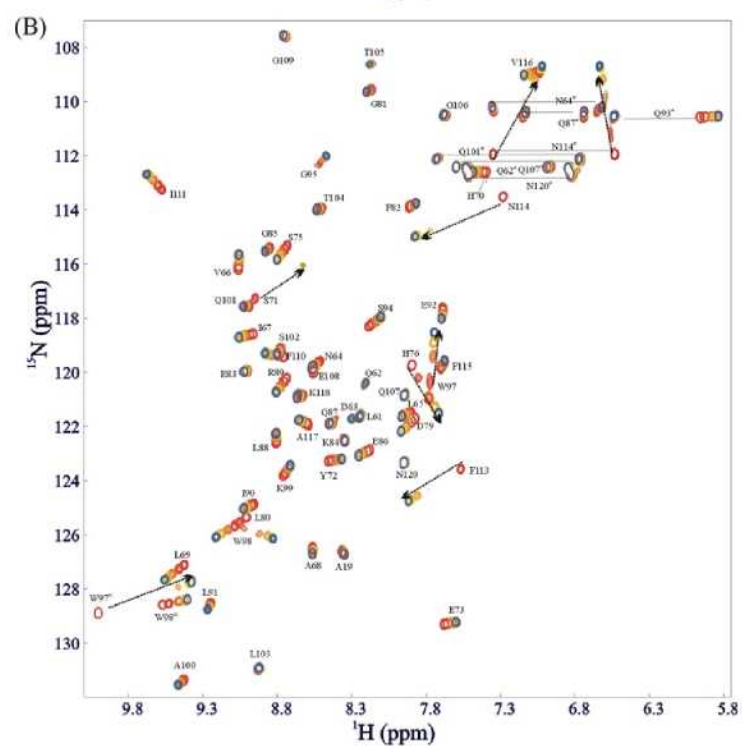
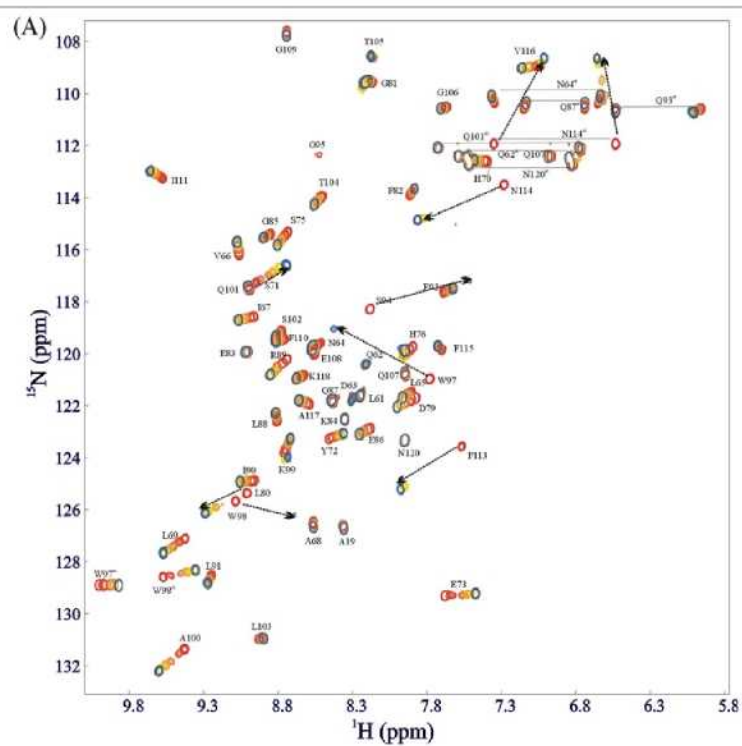
4.9 NMR-Spektroskopische Untersuchungen der SH3:Peptid-Interaktionen

NMR-Titrationsexperimente erlauben die strukturelle Untersuchung der Interaktion eines Proteins mit einem Liganden und die Kartierung der Bindungsregion. Dafür werden ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von ^{15}N -isotopenmarkiertem Protein unter Titration eines nicht isotopenmarkierten Interaktionspartners aufgenommen. Wie schon in der Einleitung erwähnt, ist für jede Amidgruppe des Protein-Rückgrats im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum ein Signal (Resonanz) zu beobachten, wobei die Lage, d.h. seine chemische Verschiebung von der chemischen Umgebung der jeweiligen Amidgruppe abhängt und damit für den jeweiligen Aminosäurerest charakteristisch ist. Die Bindung eines Liganden bewirkt an der Bindungsstelle eine Änderung der chemischen Umgebung der dortigen Amidgruppen, was direkt als eine Verschiebung der Resonanzen im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum beobachtet werden kann.

4.9.1 Strukturelle Charakterisierung der Bindung von PD1 und PD1-R an die Lck-SH3-Domäne

Für die Kartierung der Bindungsregionen wurden ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von ^{15}N -isotopenmarkiertem Lck-SH3-Protein in PBS-Puffer mit steigenden Konzentrationen an nicht isotopenmarkierten PD1- bzw. PD1-R-Peptid aufgenommen. Zu einer Lck-SH3-Lösung mit einer Startkonzentration von 300 μM wurden die Peptide in folgenden Endkonzentrationen zugeführt: 47, 168, 312, 920, 1760 und 2115 μM .

Abbildung 4-15 zeigt die Effekte der Peptidtitrationen auf die Lck-SH3-Resonanzen im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum. Für die meisten Resonanzen war bei jedem Titrationsschritt eine Änderung ihrer chemischen Verschiebung beobachtbar. Eine Änderung der chemischen Verschiebung der Resonanzen bei Zugabe der Peptide weist auf eine Bindung von Lck-SH3 mit den Peptiden hin. Dabei erfolgt die Änderung der Resonanzen von der Position vom ungebundenen Zustand zur Position im gebundenen Zustand. Die Änderung der chemischen Verschiebung einzelner Resonanzen ohne Veränderung ihrer Linienbreite weist auf eine Kinetik des schnellen Austausches hin. Nur einige Amidresonanzen zeigten eine Veränderung der Linienbreite. Das Verschwinden ihrer Signale bei steigender Peptidkonzentration und ihr anschließendes Erscheinen bei hohen Konzentrationen, deutet auf einen intermediären Austausch hin (z. B. Abbildung 4-15 B: S71, H76, G95, W97, W98, F113, N114).



Abbildungs-
beschriftung:
nächste Seite

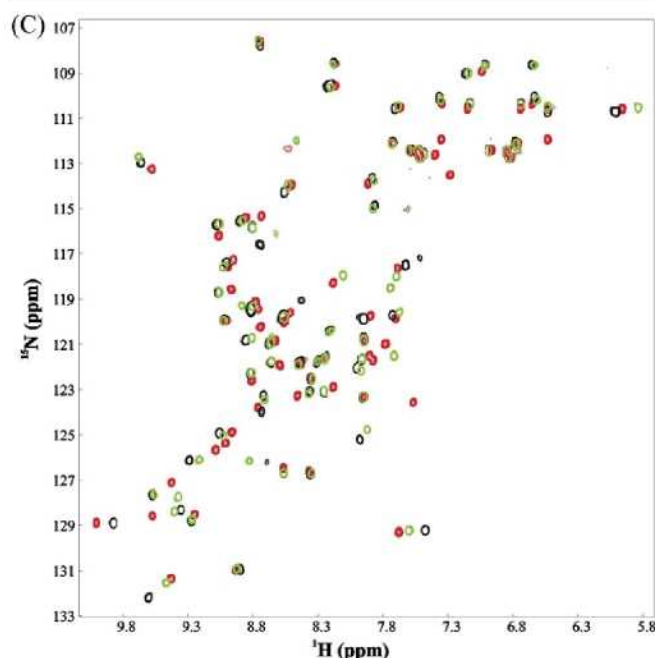


Abbildung 4-15: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Lck-SH3 während der Titration mit PD1 (A) und PD1-R (B).

Dargestellt ist eine Überlagerung von ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren für zunehmende Peptid-Liganden-Konzentration. 300 μM ^{15}N -Lck-SH3 (rot) wurden vorgelegt, und die Peptide PD1 (A) bzw. PD1-R (B) bis zu einem vierfachen molaren Überschuss titriert (blau). Die Zuordnung der Amidresonanzen des Protein-Rückgrats ist im Einbuchstaben-Aminosäure-Code dargestellt. Die Seitenkettensignale von Asparagin und Glutamin sind durch einen Strich hervorgehoben. Die Pfeile markieren die Richtung der Änderung einiger Amidresonanzen, die intermediären Austausch aufweisen. (C) Zum Vergleich der

beiden Titrationen sind die Spektren der Endpunkte der beiden Titrationen übereinander gelegt. In rot sind die Resonanzen der freien Lck-SH3, in schwarz nach Titration mit PD1 und in grün nach Titration mit PD1-R zu sehen.

Die Zuordnung der Amidresonanzen der freien Lck-SH3-Domäne im ^1H - ^{15}N -HSQC Spektrum erfolgte unter Zuhilfenahme bekannter Lck-SH3- Zuordnungsdaten (Briese et al. 2001, Schweimer et al. 2002). Die Zuordnung der Lck-SH3 im Komplex mit PD1-R konnte zuverlässig durchgeführt werden, in dem die Änderung der Resonanzen von ihrer ungebundenen zur gebundenen Position während der Titration verfolgt wurde (Abbildung 4-15 B). Auch bei den sieben Amidresonanzen, die während der Titration intermediären Austausch zeigten, wurde die Zuordnung durch Extrapolation der beobachteten Änderungen der chemischen Verschiebung erreicht (Abbildung 4-15 B: S71, H76, G95, W97, W98, F113, N114). Auch im Fall des Lck-SH3:PD1-Komplexes konnten die meisten Amidresonanzen durch Verfolgung ihrer Positionsverschiebung während der Titration zugeordnet werden (Abbildung 4-15). Acht der Resonanzen zeigten intermediären Austausch (E73, S95, L80, G95, W97, W98, F113, N114). Die Zuordnung der Resonanzen S94, G95, W97 und W98 wurde durch Extrapolation erstmals vorläufig durchgeführt, da ihre Positionen im gebundenen Zustand nicht exakt bestimmt werden konnten.

Die Abbildung 4-15 (B und C) zeigt die Differenz der chemischen Verschiebung in der Protonen- und der Stickstoff-Dimension für alle Aminosäurereste von Lck-SH3 bei Zugabe von PD1 bzw. PD1-R. Die Differenz der chemischen Verschiebungen ist jeweils auf den beobachteten Maximalwert der entsprechenden Kerne normiert (Gleichung 4-3 & 4-5) (Hinck et al. 1997). Für den Komplex Lck-SH3:PD1 konnten Maximalwerte für ^1H für den Kern N114 mit 0,58 ppm und für ^{15}N für den Kern W97 mit 3,79 ppm beobachtet werden. Diese beiden Kerne wiesen auch beim Komplex Lck-SH3:PD1-R Maximalwerte auf: für ^1H für N114 mit 0,59 ppm und für ^{15}N für W97 mit 2,45 ppm. Zum besseren Vergleich der Bindung beider Peptide an die Lck-SH3 wurden die Differenzen der chemischen Verschiebungen der Protonen- und der Stickstoff-Dimension zusammengefasst und normiert (Gleichung 4-6, Abbildung 4-16 D). Um den Bezug der einzelnen Aminosäurereste auf die Lck-SH3-Domäne und ihrer Sekundärstruktur zu ermöglichen, ist die Sequenz der Lck-SH3-Domäne ebenfalls dargestellt (Abbildung 4-16 A).

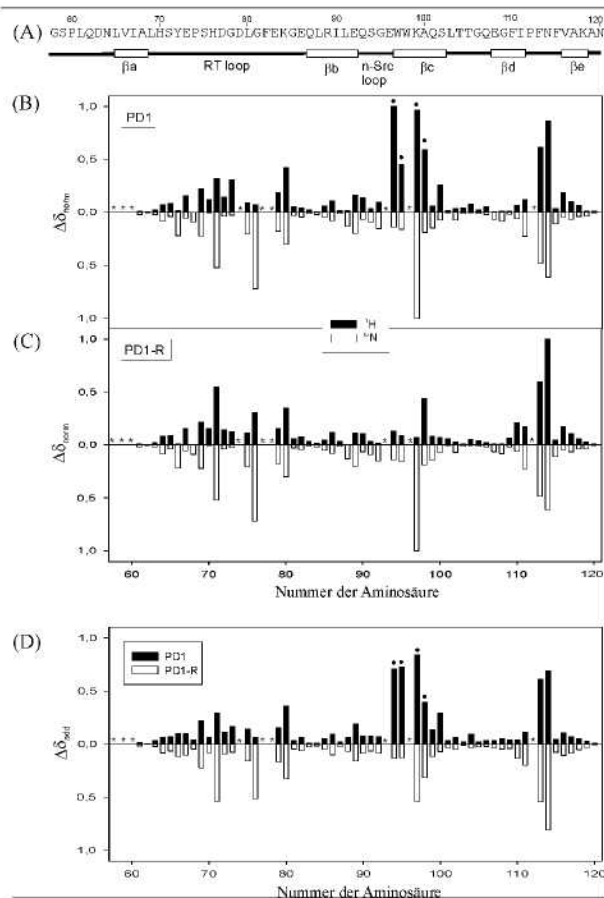


Abbildung 4-16: Darstellung der Lck-SH3-Sequenz und der Differenz der chemischen Verschiebung bei Bindung der Peptide PD1 und PD1-R.

(A) Aminosäuresequenz der Lck-SH3-Domäne sowie deren Sekundärstruktur. Differenz der chemischen Verschiebung der Amidresonanzen für ^1H (schwarze Balken) und für ^{15}N (weiße Balken) bei Interaktion mit den beiden Peptiden: PD1 (B) und PD1-R (C). Die Werte sind auf den beobachteten Maximalwert der entsprechenden Kerne normiert. Für beide Komplexe wurden die Maximalwerte für ^1H für N114 und für ^{15}N für W97 beobachtet. (D) Normierte Differenz der chemischen Verschiebung für ^1H und ^{15}N addiert. Aminosäuren, die nicht im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum beobachtbar waren, sind mit einem Sternchen markiert. Im Fall des Lck-SH3:PD1-Komplexes sind die Resonanzen, die nur vorläufig zugeordnet werden konnten, mit einem schwarzen Kreis gekennzeichnet.

Aus den Histogrammen in Abbildung 4-16 ist erkennbar, dass ähnliche Aminosäurereste von Lck-SH3 bei Bindung der Peptide PD1 und PD1-R betroffen sind. In beiden Komplexen fanden die stärksten Änderungen innerhalb von drei Regionen der Lck-SH3-Sequenz statt, und zwar innerhalb von L69 - L80, S94 - A100 und F113 - N114, die dem RT-Loop, dem n-Src-Loop und dem helikalen Turn entsprechen. Die Bindung beider Peptide scheint die gleichen Regionen auf der Lck-SH3-Oberfläche zu betreffen. Die auffälligsten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Komplexen konnten den Aminosäureresten S71, H76, S94, G95, W97, A100, F110 und der Seitenkette von W97 zugeordnet werden (Abbildung 4-15 & 4-16).

Die Kartierung der Peptidbindungsregionen an die Lck-SH3 ist in Abbildung 4-17 dargestellt. Um die Bindungsregion der Peptide an die SH3-Domäne der Lck zu veranschaulichen, erfolgte die Färbung der Aminosäurereste in der Moleküloberflächendarstellung und der Ribbonansicht in Bezug auf die Stärke der Änderung der chemischen Verschiebung bei Bindung der Peptide. Aminosäurereste mit großen Änderungen der normierten chemischen Verschiebung über 0,3 sind rot dargestellt. Orange sind solche Reste markiert, die eine Änderung zwischen 0,3 und 0,15 aufweisen. Gelbe Färbung zeigt eine moderate Änderung zwischen 0,15 und 0,1. Die restlichen Änderungen unter 0,1 sind weiß dargestellt.

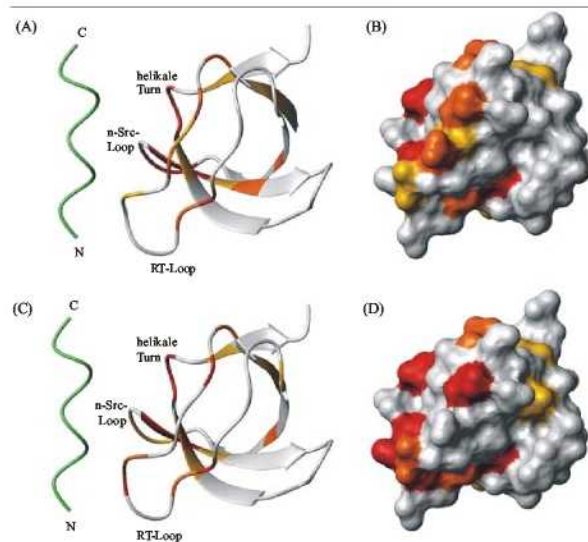


Abbildung 4-17: Ribbon- und Moleküloberflächendarstellung der Lck-SH3-Domäne bei Bindung von PD1 und PD1-R.

(A + C) Ribbondarstellung von Lck-SH3 (PDB-Code: 1KIK). Die Position der PPII-Helix ist schematisch in der Klasse-I-Orientierung relativ zur Lck-SH3-Domäne dargestellt. (B + D) Oberflächendarstellung von Lck-SH3. Aminosäurereste, die bei Zugabe von PD1 (A + B) und PD1-R (C + D) beeinflusst werden, sind angefärbt. Aminosäurereste mit großen Änderungen der normierten chemischen Verschiebung über 0,3 sind rot, Reste mit Änderungen zwischen 0,3 und 0,15 sind orange und Reste mit Änderungen zwischen 0,15 und 0,1 sind gelb gefärbt. Die restlichen Änderungen unter 0,1 sind weiß dargestellt.

Für die Darstellung wurde das Molmol-Programm verwendet.

Zur besseren Veranschaulichung ist unter Zuhilfenahme von bereits gelösten Komplexstrukturen (Musacchio et al. 1994; Feng et al. 1995; Pisabarro et al. 1998) bei der Ribbonansicht die Lage des Peptid-Liganden relativ zur Lck-SH3-Domäne schematisch dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die bei der Peptid-Bindung am stärksten betroffenen Aminosäurereste von Lck-SH3 auf der dem Peptid zugewandten Seite liegen.

4.9.2 Strukturelle Charakterisierung der Bindung von PD1 und PD1-R an die Hck-SH3-Domäne

Bei der Analyse der Peptidspezifität (Kapitel 4.7) konnte eine sehr hohe Affinität der selektierten Peptide zu der SH3-Domäne der Hck festgestellt werden. Die Affinität liegt im nanomolaren Bereich und rangiert somit unter den stärksten bisher in der Literatur beschriebenen SH3:Peptid-Interaktionen. Daher erscheint eine nähere Charakterisierung der Hck-SH3:Peptid-Wechselwirkungen interessant. Die Hck wird auch in den Zellen des Immunsystems exprimiert und ist dort analog zur Lck-SH3-Domäne ein Bindungspartner für das virale Nef-Protein.

In Analogie zu den im vorherigen Kapitel 4.9.1 durchgeführten Experimenten mit der Lck-SH3-Domäne wurde eine Titration der Peptide PD1-R bzw. PD1 zu einer ^{15}N -isotopenmarkierten Hck-SH3-Proteinlösung durchgeführt. Die Zuordnung der freien Hck-SH3-Domäne wurde in unserer Arbeitsgruppe von Herrn Holger Schmidt im Rahmen seiner Doktorarbeit durchgeführt.

Bei der NMR-Titration des Peptids PD1-R zur Hck-SH3-Domäne wurden zu 296 μM Hck-SH3 in vier Titrationsschritten (70, 165, 317 und 531 μM) PD1-R zugegeben. Abbildung 4-18 zeigt übereinander gelegte ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren der Hck-SH3-Domäne in Abwesenheit (rot) und Anwesenheit des Peptids PD1-R (blau). Wie bei der Titration zu Lck-SH3 ist hier wiederum eine Änderung der chemischen Verschiebung von einzelnen Amidresonanzen von ihrer Position im freien Zustand zur Position des Komplexes zu erkennen (Abbildung 4-15). Jedoch weisen die meisten der Resonanzen einen intermediären Austausch auf (z. B. K116, L120, S128), was man anhand der Verringerung der Signalintensität und der Zunahme der Linienbreite während der Titration erkennen kann. Bei einigen Resonanzen aber (z. B. E110, S111, G112, E113, L139, rot) konnte während der Titration keine stetige Verschiebung der Resonanzen von der freien Position zur gebundenen Position beobachtet werden, sondern nur eine Intensitätsabnahme ihrer Signale. Diese Signale wurden gegen Ende der Titration an einer anderen Position wieder sichtbar. Diese

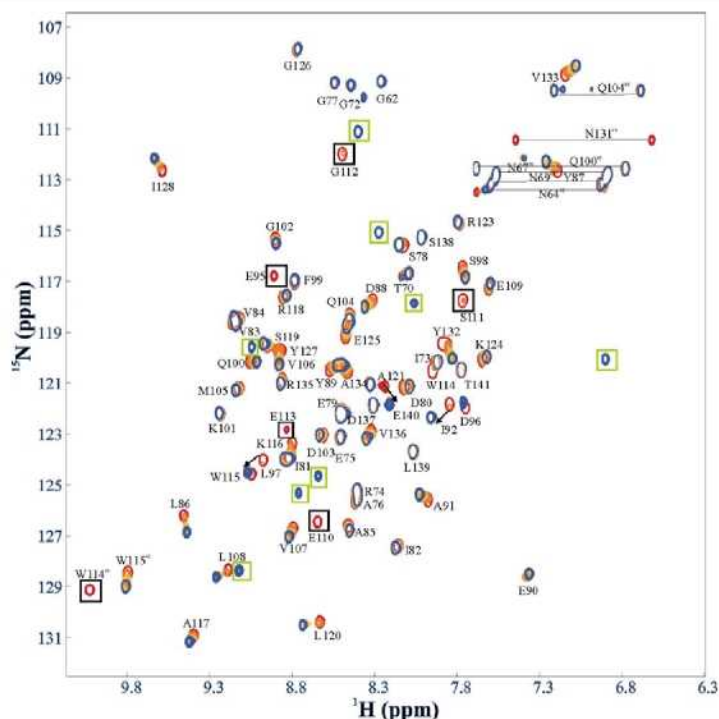


Abbildung 4-18: NMR-Titration von PD1-R an die Hck-SH3-Domäne.

Überlagerte ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren der Hck-SH3 für zunehmende Peptid-Liganden-Konzentration von PD1-R. Ca. 300 μM Hck-SH3 wurden vorgelegt (rot) und in vier Titrationsschritten PD1-R bis zu einem zweifachen molaren Überschuss zugegeben (blau). Die Zuordnung der Amidresonanzen des Protein-Rückgrats ist im Einbuchstaben-Aminosäure-Code dargestellt. Die Seitenkettensignale von Asparagin und Glutamin sind durch einen Strich hervorgehoben. Die Pfeile markieren die Richtung der Änderung einiger Amidresonanzen, die intermediären Austausch aufweisen. Resonanzen der freien Hck-SH3, deren Signale bei Peptidzugabe nicht mehr zu beobachten waren, sind mit einem schwarzen Kästchen markiert. Resonanzen von Hck-SH3 im gebundenen Zustand, deren Signale bei Peptidzugabe an einer anderen Position sichtbar wurden, sind mit einem grünen Kästchen markiert.

Dynamik des intermediären Austausches im Gegensatz zum schnellen Austausch bei den Lck-SH3:Peptid-Komplexen (Kapitel 4.9.1, Abbildung 4-15) spiegelt den niedrigeren K_D -Wert für den Komplex Hck-SH3:PD1-R mit 0,47 μM wider.

Die Abbildung 4-19 B zeigt die Differenz der chemischen Verschiebung für alle Aminosäurereste von Hck-SH3 bei Zugabe von PD1-R. Für die Resonanzen der Amidprotonen der Aminosäuren E110 – E113, die im n-Src-Loop liegen, konnte die Differenz der chemischen Verschiebung nicht ermittelt werden, da ihre Positionen im gebundenen Zustand nicht zugeordnet werden konnte. Bei Peptidzugabe waren ihre Signale nicht mehr sichtbar. Die Maximalwerte, die zugeordnet werden konnten, sind für H^{N} für Aminosäurerest I92 mit 0,11 ppm und für ^{15}N für A121 mit 0,71 ppm. Die beobachteten Werte (Differenzwerte) wurden auf den beobachteten

Maximalwert der entsprechenden Kerne normiert. Über weite Bereiche der Hck-SH3-Sequenz sind geringe Änderungen zu beobachten. Die stärksten Änderungen liegen in dem Bereich L86 - L97, also im RT-Loop, und verteilt in den anderen Bereichen (n-Src-Loop, 3_{10} -Helix, Distal-Loop). Für die Kartierung der Peptidbindungsfläche wurden nur Änderungen der chemischen Verschiebung über 0,4 beachtet. Bei der Ribbonansicht ist unter Zuhilfenahme von bereits gelösten Komplexstrukturen (Musacchio et al. 1994; Feng et al. 1995; Pisabarro et al. 1998) die Lage des Peptid-Liganden relativ zur Hck-SH3-Domäne schematisch dargestellt. Die Moleküloberflächen- und Ribbonansicht (Abbildung 4-19 C) zeigen, dass bei Bindung von PD1-R überwiegend ein bestimmter Bereich der SH3-Oberfläche von den Änderungen betroffen ist, und dass dieser, wie zu erwarten, auf der dem Peptid zugewandten Seite liegt.

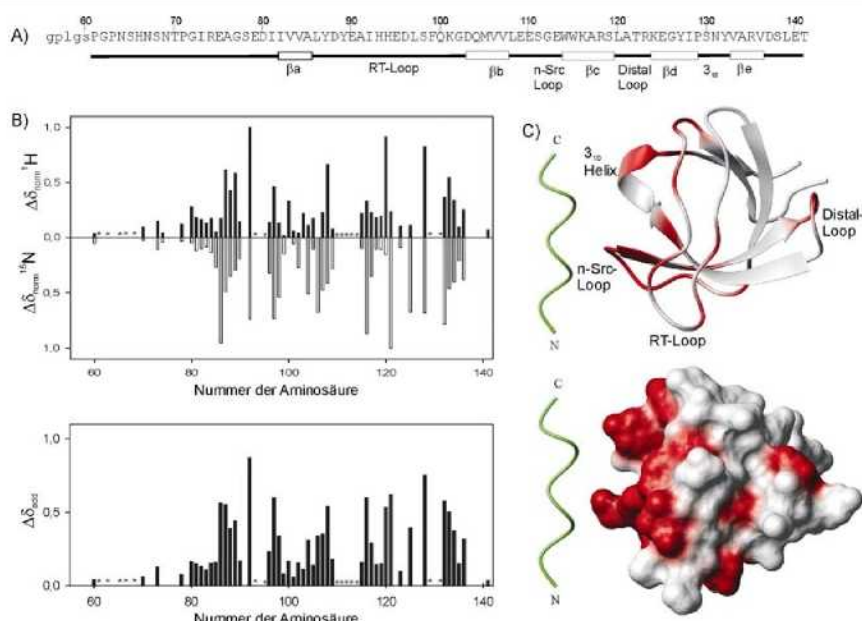
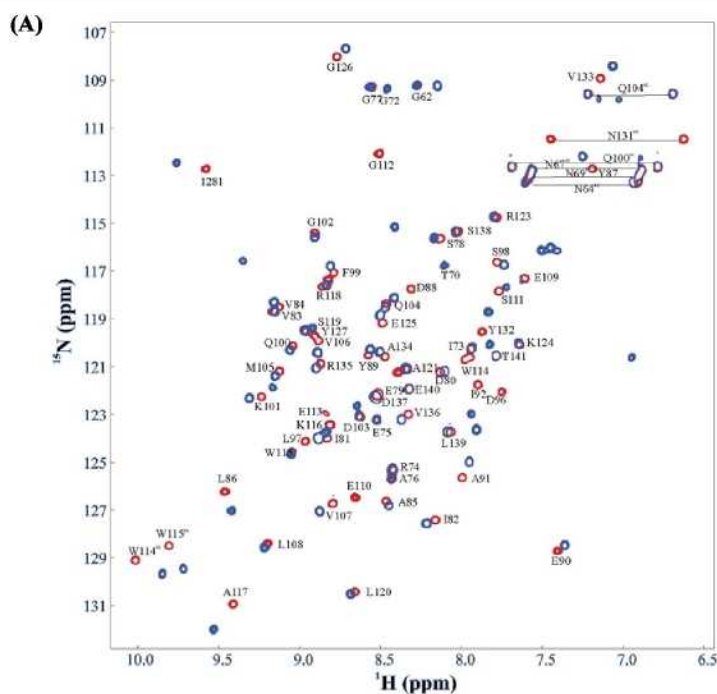


Abbildung 4-19: Differenz der chemischen Verschiebung, Ribbon- und Oberflächendarstellung der Hck-SH3-Domäne bei Bindung des Peptids PD1-R.

(A) Sequenz der verwendeten Hck-SH3-Domäne mit Sekundärstrukturangabe. Die Sequenz ist im Einbuchstaben-Aminosäure-Code dargestellt. (B) Differenz der chemischen Verschiebung bei PD1-Bindung. Die Werte sind auf den beobachteten Maximalwert der entsprechenden Kerne normiert. Die Maximalwerte wurden für ^1H für AS-Rest I92 und für ^{15}N für AS-Rest A121 beobachtet. Resonanzen, die im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum nicht beobachtbar waren, sind mit einem Sternchen markiert. Resonanzen, bei denen die Differenz nicht bestimmt werden konnte, sind mit einem schwarzen Kreis gekennzeichnet. (C) Ribbon- und Oberflächendarstellung der Hck-SH3. Es ist schematisch die Position der PPII-Helices in der Klasse-I-Orientierung relativ zur Hck-SH3-Domäne dargestellt. Aminosäurereste, die bei Peptidbindung eine normierte Änderung der chemischen Verschiebung über 0,4 aufweisen, sind rot dargestellt.

Bei der NMR-Titration des Peptids PD1 wurden 260 μM Hck-SH3-Domäne vorgelegt. Es wurden zwei Titrationsschritte (74 und 145 μM) mit PD1 durchgeführt. Die Abbildung 4–20 (A) zeigt übereinander gelegte ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren der freien Hck-SH3-Domäne (rot) und nach Zugabe des Peptids PD1 (blau). Es ist erkennbar, dass wie bei der Interaktion mit dem PD1-R-Peptid (Abbildung 4-18) die meisten Amidresonanzen durch die Bindung mit PD1 betroffen sind (vergleiche rote und blaue Resonanzen). Der Unterschied zur Interaktion mit PD1-R ist hierbei, dass während der Titration für keine der Resonanzen eine kontinuierliche Verschiebung von der freien Position zur gebundenen Position registriert werden konnte. Vielmehr sind gleichzeitig eine Intensitätsverringerung der vorhandenen Resonanzen und ein Auftauchen neuer Resonanzen zu beobachten. Schon beim ersten Titrationsschritt mit 74 μM PD1 Peptid zu 260 μM Hck-SH3- Proteinlösung war festzustellen, dass die Intensitäten einiger Resonanzen geringer wurden und gleichzeitig neue Resonanzen auftauchten (Abbildung 4–20 B, rote Kästchen). Das zeigte, dass die Hck-SH3 sowohl im freien als auch im Komplex mit PD1 zu beobachten war. Dies weist auf eine Kinetik des langsamen Austausches hin. Dieses Verhalten der Resonanzen während der Titration spiegelt den niedrigen K_D -Wert für die Interaktion von Hck-SH3 mit PD1 (0,23 μM) im Vergleich zur Bindung mit PD1-R (0,47 μM) wider.



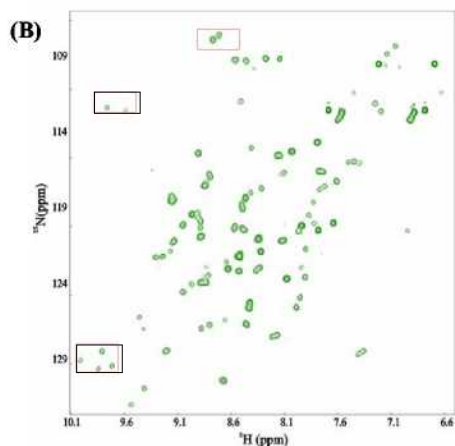


Abbildung 4-20: NMR-Titration von PD1 an die Hck-SH3-Domäne.

(A) Übereinander gelegte ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren der Hck-SH3 (260 μM) in Abwesenheit (rot) und Anwesenheit (blau) einer äquimolaren Konzentration des Peptids PD1. Die Zuordnung der Amidresonanzen des Protein-Rückgrats ist im Einbuchstaben-Aminosäure-Code dargestellt. Die Seitenketten-signalen von Asparagin und Glutamin sind durch einen Strich hervorgehoben. (B) Zum Vergleich ist der erste Titrationsschritt mit 74 μM PD1 abgebildet. Signale, die vermutlich auf den freien und den gebundenen Zustand desselben Amidprotons zurückzuführen sind, sind durch rote Kästchen hervorgehoben.

Eine Überlagerung der Hck-SH3-Spektren im freien Zustand (Abbildung 4-20 rot) und im Komplex mit PD1 (schwarz) und PD1-R (grün) zeigt die Bindung der beiden Peptide im direkten Vergleich. Es ist erkennbar, dass in den meisten Fällen die gleichen Resonanzen von den Änderungen betroffen sind. Dies deutet darauf hin, dass das Peptid PD1 an die gleiche Region von der Hck-SH3 bindet wie das PD1-R-Peptid. Aufgrund der Kinetik des langsamen

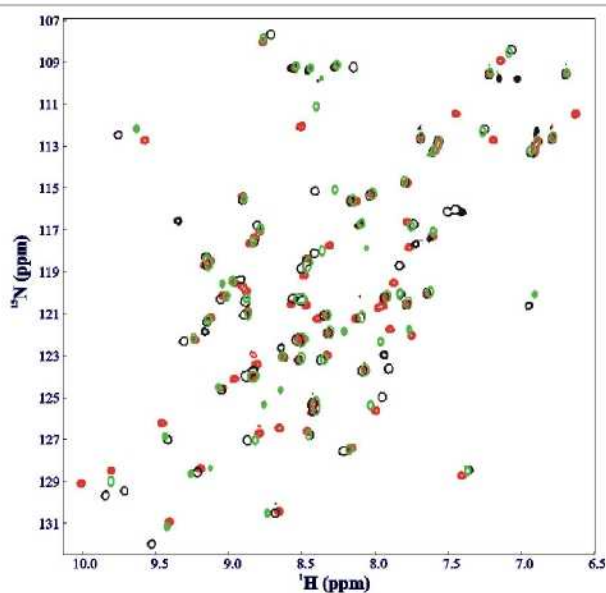


Abbildung 4-21: Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren der Hck-SH3 im freien Zustand (rot) und bei Bindung von PD1 (schwarz) und PD1-R (grün).

Überlagerung der Spektren aus Abbildung 4-18 (Hck-SH3+PD1-R, grün) und Abbildung 4-20 A. (Hck-SH3+PD1, schwarz). Dargestellt sind jeweils die Endpunkte der Titration sowie die freie Hck-SH3-Domäne (rot).

Austausches für den Hck-SH3:PD1-Komplex (und des daraus resultierenden Zuordnungsproblems), konnten die Differenzen der chemischen Verschiebung nicht ermittelt werden. Um die Bindungsregion bestimmen zu können, sind weitere NMR-Experimente und Auswertungen notwendig.

4.9.3 Untersuchung der Stabilität der SH3-Peptid-Komplexe

Sowohl für die Lck-SH3 als auch für die Hck-SH3 sind bis jetzt keine Protein-Peptid-Komplexstrukturen veröffentlicht. Daher sollte untersucht werden, ob eine NMR-basierte Strukturbestimmung für die in dieser Arbeit gefundenen Komplexe der SH3-Domänen der Lck und Hck mit den Phagendisplay-Peptiden möglich ist. Um die drei-dimensionale Struktur eines Komplexes bestimmen zu können, muss der Komplex fest und stabil sein. In der Regel ist dies für Dissoziationskonstanten (K_D) im Bereich 10 μM und kleiner (Zuiderweg 2002) der Fall. Entscheidend hierbei ist, dass die Lebensdauer des gebundenen Zustands der beiden Interaktionspartner lang genug ist, damit sich intermolekulare NOEs detektieren lassen. Dabei ist die Dissoziationsrate (k_{off}) der maßgebliche Faktor. Je kleiner der k_{off} , desto langlebiger ist der Komplexzustand.

Um zu untersuchen, ob eine Strukturbestimmung dieser SH3-PD-Komplexe möglich ist, wurden 2D- $(^{13}\text{C}, ^{15}\text{N})$ -F1-gefilterte/ F2-editierte- $(^1\text{H}, ^1\text{H})$ -NOE-Spektren (Filterexperiment; Zwahlen et al. 1997) aufgenommen. Dieses Experiment ermöglicht die Detektion von ausschließlich intermolekularen NOEs. Diese NOEs können nur detektiert werden, wenn der Komplex langlebig und somit stabil genug ist.

Die Untersuchung von Lck-SH3 und Hck-SH3 wurde jeweils nur mit dem Peptid durchgeführt, für welches bei der K_D -Wertbestimmung eine affinere Bindung an die SH3-Domäne gezeigt wurde. Bei der Interaktion mit Lck-SH3 wies das Peptid PD1-R eine höhere Affinität auf. Das PD1-Peptid zeigte eine stärkere Bindung an die Hck-SH3-Domäne (Kapitel 4.7). Theoretisch müsste der Hck-SH3:PD1-Komplex mit einem K_D -Wert von 0,23 μM stabil genug für eine drei-dimensionale Strukturbestimmung sein. Für den Lck-SH3:PD1-R Komplex mit einem K_D von 25 μM lässt sich eine erfolgreiche NMR-Strukturbestimmung nicht vorhersagen. Eine sichere Aussage aber wird durch folgendes Filterexperiment gegeben.

Die Aufnahme der 2D-gefilterten/editierten NOE-Spektren erfolgte mit einer 2 mM ^{15}N , ^{13}C -isotopenmarkierter Lck-SH3-Lösung versetzt mit einer äquimolaren Menge an nicht isotopenmarkierten PD1-R-Peptid. Die Aufnahme des Filterexperimentes beim Komplex Hck-SH3:PD1 erfolgte mit 2 mM ^{15}N , ^{13}C -isotopenmarkiertes Hck-SH3-Protein mit einer äquimolaren Menge an nicht isotopenmarkierten PD1-Peptid.

In Abbildung 4-22 sind die 2D-gefilterten/editierten NOE-Spektren der Lck-SH3 mit PD1-R und Hck-SH3 mit PD1 dargestellt. Das residuelle Wassersignal ist in Form der senkrechten und waagerechten Signale bei ca. 4,8 ppm zu sehen. Die Signale in der Diagonale sind Artefakte des Filterexperimentes (Filterartefakte). Alle anderen Signale sind NOEs zwischen Protonen des Proteins und des Peptids (Kreuzsignale). Wie erwartet, konnten für den Hck-SH3:PD1-Komplex viele intermolekulare NOEs detektiert werden (Abbildung 4-22 B). Aber auch im NOE-Spektrum vom Komplex Lck-SH3 mit PD1-R (Abbildung 4-22 A) sind viele intermolekulare NOEs zu erkennen. Somit wurde gezeigt, dass die beiden Komplexe langlebig genug sind, um eine drei-dimensionale Bestimmung ihrer Struktur mittels NMR-Spektroskopie zu gewährleisten.

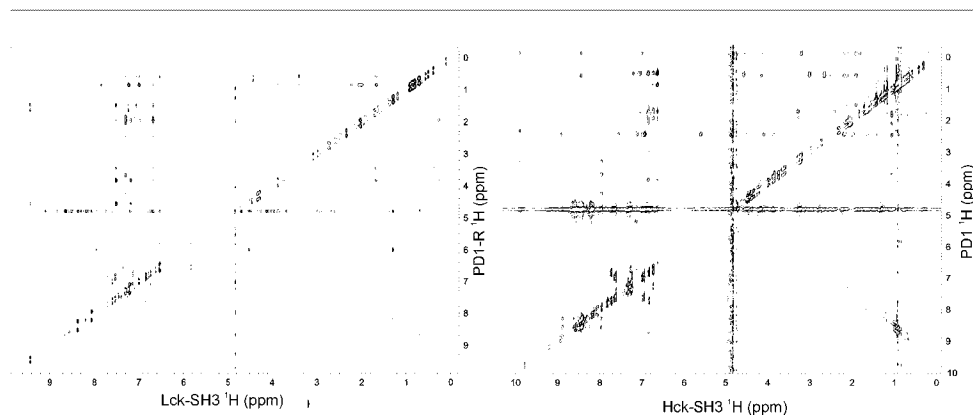


Abbildung 4-22: 2D-(^{13}C , ^{15}N)-F1-gefiltertes/F2-editiertes NOE-Spektrum vom Lck-SH3:PD1-R-Komplex (A) und Hck-SH3:PD1-Komplex (B).

(A) Die Messung erfolgte mit 2 mM ^{15}N , ^{13}C -isotopenmarkierter Lck-SH3-Domäne und einer äquimolaren Menge nicht isotopenmarkiertem PD1-R-Peptid. (B) 2 mM ^{15}N , ^{13}C -isotopenmarkierte Hck-SH3-Domäne wurde mit 2 mM nicht isotopenmarkiertes PD1-Peptid gemessen. Die senkrechten und waagerechten Signale bei ca. 4,8 ppm kennzeichnen das residuelle Wassersignal. Die Signale in der Diagonalen sind Artefakte des Filterexperimentes.

4.9.4 Bindung von HIV-1-Nef an die Lck- und Hck-SH3-Domäne

In den vorangegangenen Kapiteln konnte die Bindung der selektierten Peptide PD1 und PD1-R an die Lck- und Hck-SH3-Domäne nachgewiesen werden. Sowohl die mit CD-Spektroskopie nachgewiesene PPII-Helix-Konformation dieser beiden Peptide (Kapitel 4.8) als auch die Kartierung der Peptidbindungsoberfläche (Kapitel 4.9.1 & 4.9.2) deuten darauf hin, dass PD1 und PD1-R klassische SH3-Liganden darstellen. Es sollte untersucht werden, ob diese beiden Peptide in der Lage sind, den physiologischen Bindungspartner HIV-1-Nef der Lck-SH3 und Hck-SH3 zu verdrängen. Eine Verdrängung von Nef erscheint denkbar, da die nachgewiesene Assoziation von Nef an die Bindungstasche der Fyn-SH3-Domäne auch durch eine prolinreiche Region (P72xxP75) in Form einer PPII-Helix erfolgt (Lee et al. 1995; Arold et al. 1998). Die mittels Phagendisplay selektierten Peptide und Nef könnten mit hoher Wahrscheinlichkeit an die gleiche Region auf der Lck- bzw. Hck-SH3-Oberfläche binden. Auch die Betrachtung der K_D -Werte lässt eine Verdrängung von Nef möglich erscheinen. Die Bindung von Nef an die Hck-SH3 ist mit einem K_D -Wert von 0,25 μM (Lee et al. 1995) und 0,6 μM (Arold et al. 1998) beschrieben, und ist die zurzeit stärkste, bekannte native SH3:Ligand-Interaktion. Die Interaktion des PD1-Peptids an die Hck-SH3 erfolgte mit einem K_D -Wert von 0,23 μM mit ähnlich hoher Affinität (Kapitel 4.7). Im Fall der Lck-SH3-Nef-Interaktion wurde von der Gruppe von Arold et al. (1998) mittels Isothermaler-Titrations-Kalorimetrie der K_D -Wert zwischen einer verkürzten Nef-Variante (Δ 1-57) und der SH3-Domäne von Lck mit 10 μM bestimmt. Der K_D -Wert der Lck-SH3-Wechselwirkung mit dem Peptid PD1-R liegt mit 23 μM in einem ähnlichen Bereich (Kapitel 4.7).

Die Klonierung des HIV-1-Nef-Konstruktes sowie die Expression und Reinigung des rekombinanten Wildtyp-Nef-Proteins wurde in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Silke Hoffmann und Frau Esther Jonas durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

Zur Charakterisierung der Bindung des rekombinanten Wildtyp-Nef-Proteins an Lck-SH3 und Hck-SH3 wurden NMR-Titrationsexperimente durchgeführt. Dafür wurden 350 μM ^{15}N -markiertes Lck-SH3-Protein vorgelegt und unmarkiertes Nef bis zu einer Endkonzentration von ca. 800 μM in vier Schritten dazu titriert. Die Konzentration des vorgelegten ^{15}N -markierten Hck-SH3-Protein betrug 182 μM . In vier Schritten wurde hierzu Nef bis zu einer Endkonzentration von 416 μM titriert.

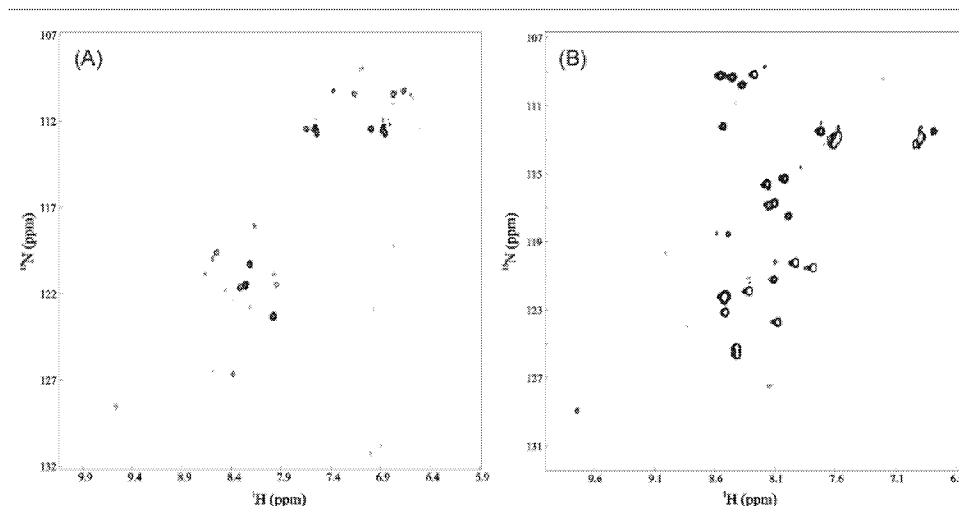


Abbildung 4–23: Bindung von HIV-1-Nef an die Lck- (A) und Hck-SH3-Domäne (B).

Dargestellt sind ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren der Lck-SH3 (A) und Hck-SH3 (B) zum Endpunkt der Nef-Titration. (A) 350 μM Lck-SH3 wurden vorgelegt und HIV-1-Nef bis zu einer Endkonzentration von ca. 800 μM titriert. (B) Zu 182 μM Hck-SH3 wurde HIV-1-Nef bis zu einer Endkonzentration von ca. 416 μM titriert.

Während der Titration war, einhergehend mit der Steigerung der Nef-Konzentration sowohl für die Lck-SH3 als auch für die Hck-SH3, ein Verschwinden vieler Signale zu beobachten. Gleichzeitig wurde eine Verbreiterung der übrigen Resonanzen registriert. In Abbildung 4–23 ist das Lck-SH3- (A) und Hck-SH3-Spektrum (B) am Ende der Nef-Titration dargestellt. Bei diesem SH3-Nef-Verhältnis (1:1 für Lck-SH3:Nef und 1:2 für Hck-SH3:Nef) konnten nur noch sehr wenige Amidresonanzen detektiert werden. Ordnet man den verbliebenen Amidresonanzen ihren Aminosäurerest- (oder Sequenzposition) zu, ist bei der Lck-SH3 erkennbar, dass diese Resonanzen entweder zu amino- oder carboxyterminalen Aminosäureresten gehören.

4.9.5 Konkurrenz von HIV-1-Nef und PD1-R um die Lck-SH3-Bindung

Um eine mögliche Konkurrenz von Nef durch PD1-R um die Bindung von Lck-SH3 nachzuweisen, wurden NMR-Titrationsexperimente durchgeführt. Dabei wurde von dem Lck-SH3:Nef-Komplex aus Abbildung 4–23 A ausgegangen und das Peptid PD1-R in steigenden Konzentrationen zugegeben. Das Peptid PD1-R wurde in vier Schritten bis zu einer Endkonzentration von 341 μM zugegeben (Abbildung 4-23). Nach jedem Titrationsschritt wurde ein ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum aufgenommen.

Die Abbildung 4–24 zeigt den Einfluss von PD1-R auf den Lck-SH3:Nef-Komplex. Nach Zugabe von PD1-R zum Lck-SH3:Nef-Komplex erschienen sehr viele Signale, deren Intensitäten mit steigenden PD1-R-Konzentrationen zunahmen. Dies deutet auf eine Verdrängung von Nef durch PD1-R hin. In Abbildung 4–24 A ist eine Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Lck-SH3 vor der Titration (schwarz), also als Lck-SH3:Nef-Komplex, und am Ende der

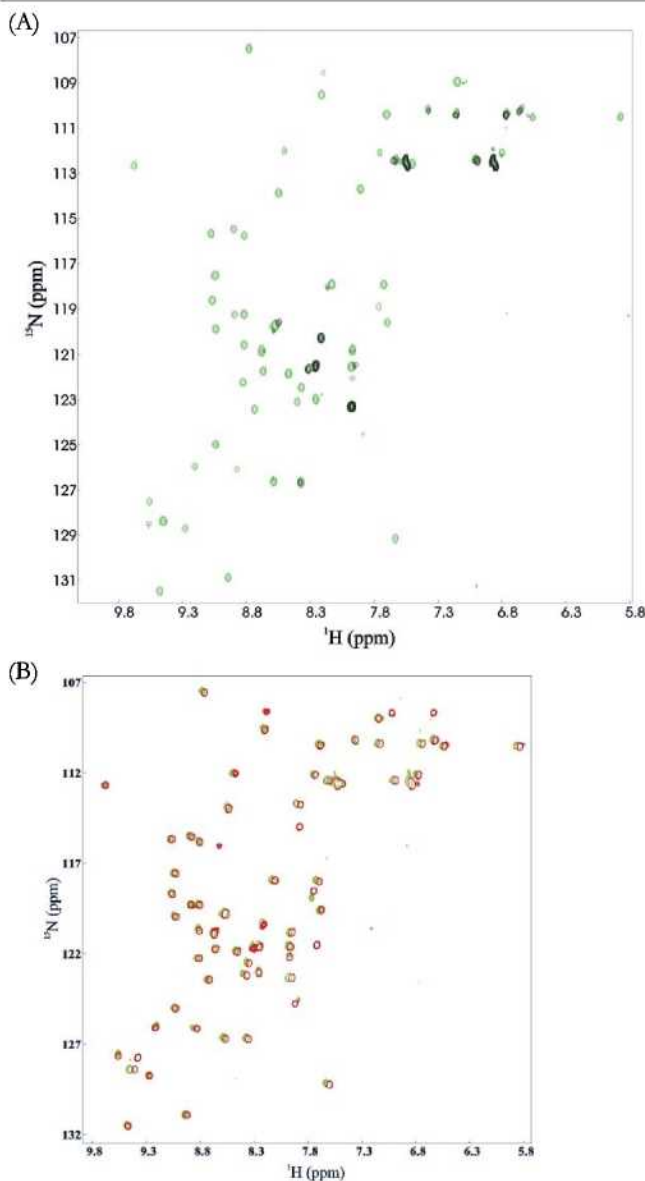


Abbildung 4–24: Verdrängung von HIV-1-Nef aus dem vorgelegten Lck-SH3:Nef-Komplex durch PD1-R.

(A) In schwarz ist das ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von Lck-SH3 im Komplex mit Nef (entspricht Abbildung 4–23 A) vor Zugabe von PD1-R abgebildet. In grün ist der Endpunkt der Titration des PD1-R Peptid (340 μM) zu diesem Komplex dargestellt. (B) Übereinanderlegung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Lck-SH3 nach der Verdrängung von Nef durch PD1-R (entspricht Abbildung A, grün) und des Lck-SH3:PD1-R-Komplexes aus Abbildung 4-15 B (rot).

Titration mit PD1-R (grün) dargestellt. Nach der Verdrängung von Nef bindet das Peptid PD1-R an die gleiche Region von Lck-SH3, wie es schon zuvor im Kapitel 4.9.1 für dieses Peptid nachgewiesen wurde. Um das zu verdeutlichen, ist in der Abbildung 4–24 B das entstandene Spektrum (grün) und das Spektrum des Lck-SH3:PD1-R-Komplexes (blau) aus Abbildung 4-15 übereinander gelegt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die beiden Spektren übereinstimmen.

4.9.6 Konkurrenz von HIV-1-Nef und PD1 um die Hck-SH3-Bindung

Um zu überprüfen, ob das Peptid PD1 das Nef-Protein vom Hck-SH3:Nef-Komplex verdrängen kann, wurde eine NMR-Titration dieses Komplexes mit PD1 durchgeführt. Die Konzentration der vorgelegten Hck-SH3-Domäne war 350 μM . Die Konzentration des vorgelegten Nef-Proteins betrug 416 μM (Abbildung 4–23 B). Insgesamt wurden sieben Titrationsschritte mit 101, 147, 222, 353, 558, 748 und 1091 μM durchgeführt.

Die Spektren zeigten (Abbildung 4–25), dass wie bei der Konkurrenz um die Lck-SH3 auch hier mit Zugabe von PD1 sehr viele Amidresonanzen (grün) sichtbar wurden, und ihre Intensitäten mit steigenden PD1-Konzentrationen zunahm. Signale, die zu Resonanzen zum Nef:Hck-SH3-Komplex gehören, hingegen verschwanden langsam (rote Kästchen). Das Peptid PD1 scheint nach der Verdrängung von Nef an die gleiche Region von Hck-SH3 zu binden, wie schon zuvor für dieses Peptid gezeigt wurde (Kapitel 0). Um das zu verdeutlichen, ist in der Abbildung 4–25 B das entstandene Spektrum (grün) und das Spektrum des Hck-SH3-PD1 Komplexes (blau) aus Abbildung 4–20 übereinander gelegt. Auch hier ist deutlich zu erkennen, dass die Spektren übereinstimmen.

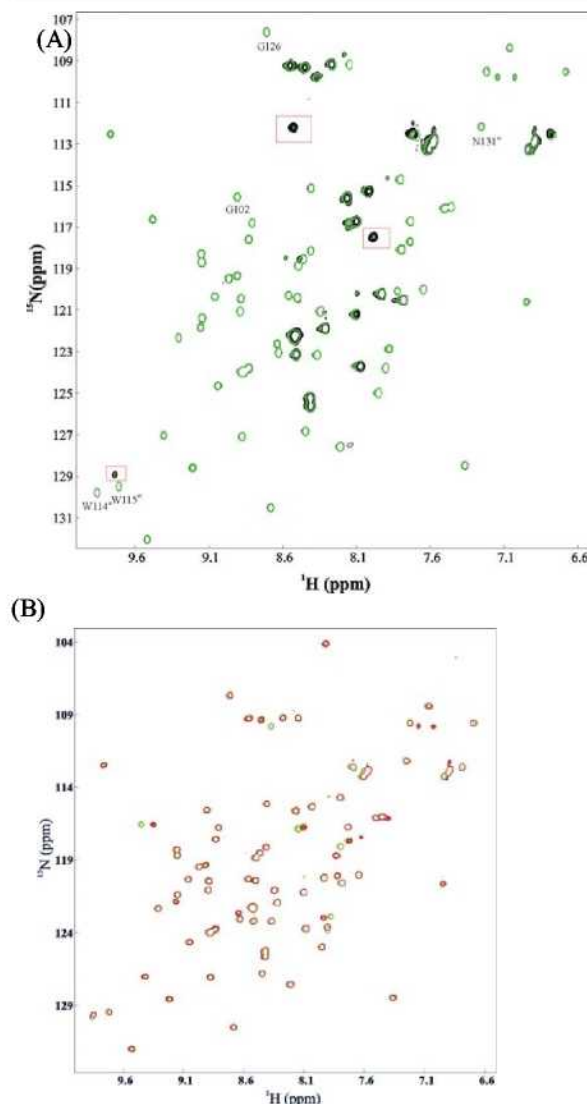


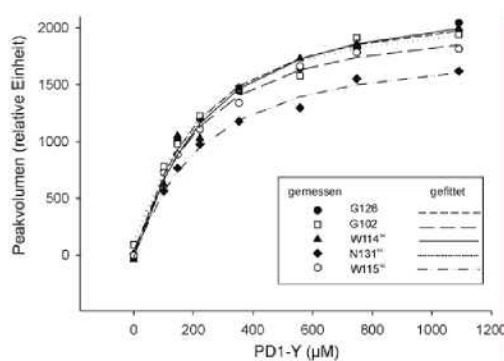
Abbildung 4-25: Verdrängung von HIV-1-Nef vom HIV-1-Nef:Hck-SH3-Komplex durch PD1-R.

(A) Zu sehen sind übereinander gelegte ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von $182\ \mu\text{M}$ Hck-SH3 im Komplex mit $416\ \mu\text{M}$ Nef (schwarz) (entspricht Abbildung 4-23 B) und nach Titration des Peptids PD1 ($1091\ \mu\text{M}$) zu diesem Komplex (grün). Einige Resonanzen, die nur zum Nef:Hck-SH3-Komplex gehören, sind mit einem roten Kästchen markiert. Resonanzen, die für die K_D -Bestimmung (Kapitel 4.9.7) ausgewählt wurden, sind mit ihren dazu gehörigen Aminosäurepositionen gekennzeichnet. (B) In grün ist das ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von Hck-SH3 nach der Verdrängung von Nef durch PD1 (entspricht Abbildung A) abgebildet. In rot ist das ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum des Hck-SH3:PD1-Komplexes aus Abbildung 4-20 A dargestellt.

4.9.7 Bestimmung des K_D -Wertes für den HIV-1-Nef:Hck-SH3-Komplex aus den NMR-Kompetitionsexperimenten

Die Konkurrenzexperimente (Kapitel 4.9.6) zeigten, dass das Peptid PD1 das HIV-1-Nef-Protein von der Hck-SH3-Domäne verdrängen konnte. In der Literatur ist der beschriebene K_D -Wert für die Bindung von volle-Länge-HIV-1-Nef an die Hck-SH3 mit $0,25\ \mu\text{M}$ (SPR, Lee et al. 1995) und $0,6\ \mu\text{M}$ (ITC, Arold et al. 1998) angegeben. Der in dieser Arbeit für den Komplex

Hck-SH3:PD1 bestimmte K_D -Wert liegt mit $0,23 \mu\text{M}$ im gleichen Bereich. Eine Verdrängung von HIV-1-Nef durch PD1 konnte schon gezeigt werden. Es ist deshalb interessant, zu bestimmen, welcher von den beiden Interaktionspartner affiner an Hck-SH3 bindet. Um das untersuchen zu können, sollte der Versuchsansatz alle drei Interaktionspartner beinhalten. Dies war durch die NMR-Kompetitionsexperimente gegeben. Der K_D -Wert für den Hck-SH3:Nef-Komplex wurde in Relation zu dem mittels Fluoreszenzmessung ermittelten K_D -Wert für den Komplex Hck-SH3:PD1 bestimmt. Wie im vorherigen Kapitel 4.9.6 beschrieben und wie aus der Abbildung 4-25 ersichtlich, ist für viele Resonanzen ein Sichtbarwerden und eine Intensitätszunahme ihrer Signale bei Zugabe vom PD1-Peptid zum Komplex Hck-SH3:Nef zu beobachten. Die Volumenzunahme dieser auftauchenden Resonanzen bei jedem Titrationsschritt konnte mittels der NMRView-Software ermittelt werden. Die Volumenzunahme dieser Resonanzen in Abhängigkeit der Peptidkonzentrationen ist ein Maß für die Bildung des Komplexes Hck-SH3:PD1. Für die Bestimmung des K_D -Wertes für den HIV-1-Nef:Hck-SH3-Komplex wurde die Änderung des Volumens in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration dargestellt (Abbildung 4-26) und die nichtlineare Regressionsrechnung unter Vorgabe des K_D -Wertes von Hck-SH3:PD1 mit $0,23 \mu\text{M}$ anhand der Gleichungen 3-7 und 3-8 (Seite 51) durchgeführt. Der durch die schrittweise Zugabe vom PD1-Peptid bedingte Verdünnungseffekt während der Titration wurde durch Normierung aller Daten auf das Volumenverhältnis einer im Titrationsverlauf stabilen Resonanz korrigiert. Für die K_D -Wert-Berechnung wurden willkürlich fünf verschiedene Resonanzen (G102, G126, W114^{sc}, W115^{sc} und N131^{sc}, Abbildung 4-25)



KD-Wert [μM]	
G126	0,67
G102	0,69
W114sc	0,60
N131sc	0,59
W115sc	0,70
Mittelwert	$0,64 \pm 0,05$

Abbildung 4-26: K_D -Bestimmung für die HIV-1 Nef-Hck SH3 Interaktion anhand der NMR-Kompetitionsexperimente.

Es wurden fünf verschiedene Resonanzen ausgewählt und der K_D -Wert für jede Resonanz anhand der Gleichungen 3-7 und 3-8 einzeln bestimmt. Der daraus resultierende, gemittelte K_D -Wert beträgt $0,64 \pm 0,05 \mu\text{M}$.

ausgewählt, und der K_D -Wert für jede Resonanz einzeln bestimmt (Tabelle in Abbildung 4-26). Der daraus resultierende mittlere K_D -Wert für die HIV-1-Nef:Hck SH3 Interaktion beträgt $0,64 \mu\text{M}$ mit einer Standardabweichung von $0,05 \mu\text{M}$. Der ermittelte IC_{50} -Wert beträgt $164 \mu\text{M}$. $416 \mu\text{M}$ Nef wird mit einem IC_{50} von $164 \mu\text{M}$ PD1 verdrängt.

5 Diskussion

Die Lymphocytenspezifische Kinase Lck steht nach der Antigen-Stimulierung innerhalb der T-Zelle am Anfang der Signalkaskade und ist essentiell für deren Entwicklung und Differenzierung zur Effektorzelle. Lck ist an der Aktivierung anderer Kinasen und damit an der Koordination der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt. In einigen Fällen kann es sinnvoll sein, mittels neuer Therapeutika in die Aktivität der Lck einzugreifen. Zum Beispiel wurde bei der T-Zell-Leukämie oder bei T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen eine erhöhte Lck-Konzentration festgestellt. Eine Verminderung der Lck-Aktivität könnte auch ein sinnvoller Ansatz sein, um nach Organtransplantationen Abstoßungsreaktionen zu verhindern. Darüber hinaus ist die Lck ein Bindungspartner für bestimmte virale Proteine, wie HIV-1-Nef, Tio und Tip.

Die Identifizierung von Liganden, die z.B. an die SH3-Domäne der Lck binden, und das Verständnis ihrer Interaktionen kann als Basis für die Entwicklung neuer Medikamente dienen, um einerseits auf das Immunsystem in Form von Immunsuppressiva oder Immunaktiva einzuwirken und andererseits virale Infektionen bekämpfen zu können.

5.1 Die Klonierung, Expression und Reinigung der SH3-Domänen von Lck, Hck, Fyn, Src, PI3K und Abl verlief erfolgreich

Zu Beginn dieser Arbeit stand ein Expressionsvektor für die Lck-SH3-Domäne zur Verfügung (Schweimer et al. 2002) unter dessen Verwendung die Lck-SH3-Domäne sowohl als GST-Fusionsprotein als auch in freier Form gewonnen werden konnte. Damit die Bindungseigenschaften von im Laufe der Arbeit neu identifizierten Liganden der Lck-SH3-Domäne näher charakterisiert werden konnten, war es notwendig, eine Reihe anderer SH3-Domänen für vergleichende Bindungsstudien zur Verfügung zu haben. Aus diesem Grund wurden für die SH3-Domänen der verwandten Src-Typ Kinasen Fyn, Hck und Src sowie für die SH3-Domänen der nicht Src-Typ Kinasen Abl und PI3K Expressionsvektoren hergestellt und die entsprechenden Proteine erfolgreich gereinigt (Kapitel 4.1 und 4.2). Alle Proteine konnten in löslicher Form exprimiert werden, so dass die anschließende Reinigung der Proteine erleichtert wurde. Durch Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose konnten die GST-Fusionsproteine

in einem Schritt gereinigt werden. Die durchschnittlichen Ausbeuten lagen zwischen 15 und 20 mg/g Zellnassgewicht (Abbildung 4-2). Nach der limitierten Proteolyse konnte das GST-Spaltprodukt durch die Größenausschlusschromatographie von den SH3-Proteinen getrennt werden (Abbildung 4-3). Für einige NMR-Experimente wurden SH3-Proteine in Konzentrationen über 1 mM benötigt. Durch Einengen der Proteinlösung mittels Ultrafiltrations-Konzentratoren konnten Konzentrationen bis zu 3 mM erreicht werden, ohne dass eine Präzipitation der Proteine beobachtet wurde.

5.2 Phagendisplay führt zur Identifizierung von vier neuen Klasse-I-Liganden der Lck-SH3-Domäne

Die Anwendung des Phagendisplay-Verfahrens hat den Vorteil, dass in kurzer Zeit große Peptid-Bibliotheken nach Peptiden durchsucht werden können, die eine Bindung mit einem bestimmten Zielprotein eingehen. Für die Selektion von Lck-SH3-bindenden Peptiden wurde eine Phagenbibliothek verwendet, die Peptide mit 12 randomisierten Aminosäuren präsentiert und eine Variabilität von ca. 2×10^9 unterschiedlichen Peptid-Varianten aufweist.

Die Selektion gegen das Zielprotein Lck-SH3 wurde erfolgreich durchgeführt. Alle selektierten Peptide („PD-Peptide“) enthalten das für SH3-Liganden typische xPxxP-Motiv (Abbildung 4-4; P=Prolin, x=beliebige Aminosäure). Elf der 18 Phagen enthielten Peptide mit der Sequenz HSKYPLPPLPSL (PD1). Vier der 18 Phagen präsentierten das Peptid AHHHWHPLPTLP (PD2). Jeweils ein Phage besaß das Peptid mit der Sequenz HPGYPLPPFPLP (PD3) bzw. HTWHPLPILPPK (PD4). In der Regel sollten nach einer Selektion nur Peptide zu finden sein, die gut an GST-Lck-SH3 als Zielprotein binden. Dabei sollte die Häufigkeit ihres Vorkommens ihre relative Bindungsstärke an die Lck-SH3 wiedergeben. Dies wurde durch die anschließende Durchführung des Anti-Phagen-ELISAs bestätigt (Abbildung 4-5). PD1 wies die stärkste Bindung an Lck-SH3 auf, gefolgt von PD2. PD3 und PD4 zeigten beide eine gleichstarke, aber schwächere Bindung an Lck-SH3 als PD2.

SH3-Liganden werden anhand ihrer Sequenz in Klasse-I und Klasse-II-Liganden unterteilt. Beide enthalten in ihrer Sequenz das Kern-Motiv xPxxP. Die Einteilung in die beiden Klassen wird durch den basischen Rest an der Position P₃ bedingt, der sich entweder aminoterminal vom xPxxP-Motiv befindet (Klasse-I-Ligand) oder sich carboxyterminal anschließt (Klasse-II-Ligand; Abbildung 1-6). Klasse-I-Liganden haben die Konsensus-Sequenz +pPxxP und Klasse-II-

Liganden die Sequenz xPpxPp+ (P = konserviertes Prolin, p = ist in den meisten Fällen von einem Prolin besetzt, + = basische Aminosäure, x = beliebige Aminosäure, meist aliphatische Aminosäure).

Die Auswertung der vier Peptidsequenzen aus der Phagendisplay-Selektion zeigt, dass nach erster Einschätzung alle PD-Peptide als Klasse-I-Liganden eingestuft werden können. Eine exakte Zuordnung ist nur nach der Strukturbestimmung der Komplexe bestehend aus Peptid und SH3-Domäne möglich. Für das PD4-Peptid konnte anhand der PepSpot-Membran-Analyse eine Bindung von Lck-SH3 an die Variante PD4-I, aber nicht an PD4-II gezeigt werden (Abbildung 4-6). Das deutet darauf hin, dass das PD4-Peptid vermutlich in der Typ I-Orientierung, also als Klasse-I-Ligand an die Lck-SH3 bindet. PD2 weist an acht Positionen eine Sequenzübereinstimmung mit PD4 auf. Es kann somit vermutet werden, dass PD2 genauso wie PD4 an die Lck-SH3 in Typ I-Orientierung bindet. Die resultierende Konsensus-Sequenz aus den vier PD-Peptiden kann folgendermaßen dargestellt werden: Hxw(y/h)PLPpIP (Abbildung 4-4). Große Buchstaben repräsentieren Aminosäuren, die in allen Sequenzen gefunden wurden. Klein geschriebene Aminosäuren wurden in mindestens 50 % der Sequenzen gefunden. Und x steht für jede beliebige Aminosäure.

In der Vergangenheit wurden schon für eine Reihe von SH3-Domänen Liganden mittels der Phagendisplay-Technik oder Peptid-Arrays identifiziert. Darauf aufbauend wurden Präferenzen von Liganden für die SH3-Domänen von Src (Cheadle et al. 1994; Rickles et al. 1994; Sparks et al. 1994; Rickles et al. 1995; Sparks et al. 1996), Yes, Fyn, Lyn (Sparks et al. 1996, Rickles et al. 1994, Rickles et al. 1995) und PI3K (Rickles et al. 1994) sowie Grb2-N, Grb2-C, p53bp2, Cortactin, Crk, Abl, PICgamma (Sparks et al. 1996), Eps8 (Mongiovi et al. 1999), Amphysin und Endophilin (Cestra et al. 1999) abgeleitet. Für die Lck-SH3-Domäne sind solche Studien bis jetzt nicht durchgeführt. Somit sind für die Lck-SH3-Domäne auch keine Präferenzen in Bezug auf die Sequenz ihrer Liganden beschrieben. Mittels der Phagendisplay-Technik konnten in dieser Arbeit Peptid-Liganden für die Lck-SH3-Domäne identifiziert werden, die als Klasse-I-Liganden eingestuft werden. Diese Peptid-Liganden geben erstmals einen Einblick in die Liganden-Präferenz für die Lck-SH3-Domäne *in vitro*.

5.2.1 Die Peptide PD1, PD2 und PD4 sowie die Variante PD1-R gehören zu einer speziellen Gruppe von Klasse-I-Liganden, den Lig-I'-Peptiden

Die Sequenzen der selektierten PD-Peptide zeigen an fünf Positionen eine exakte Übereinstimmung der Aminosäurereste auf (Abbildung 4-4). Neben den beiden konservierten Prolinen an Position P_0 und P_3 sind an Position P_6 ein Histidin, an P_2 ein Prolin und an P_1 ein Leucin zu finden. Bei drei der vier PD-Peptiden (PD1, PD2 und PD4) steht an Position P_2 ein Leucin.

Kürzlich beschrieben Fernandez-Ballester et al. (2004) die unterschiedlichen, strukturellen Merkmale von SH3-Domänen bei Bindung von Klasse-I-Liganden im Vergleich zur Bindung von Klasse-II-Liganden. Sie konnten zeigen, dass ein konserviertes Tryptophan in der Bindungstasche der SH3-Domäne in der Lage war, zwei verschiedene Orientierungen einzunehmen. Die Orientierungen des Tryptophans (SH3-I oder SH3-II) erzeugten zwei unterschiedliche Umgebungsverhältnisse, die die Bindung der Liganden in Typ-I- oder Typ-II-Konformation bestimmten. Allgemein betrachtet, binden Klasse-I-Liganden an SH3-Domänen mit einem SH3-I konserviertem Tryptophan und Klasse-II-Liganden an SH3-Domänen mit einer SH3-II-Orientierung des Tryptophans (Abbildung 5-1 A). Weiterhin konnten sie zeigen, dass die Orientierung des konservierten Tryptophans von bestimmten Aminosäuren abhängt, die an einer Schlüsselposition in der Nähe der Bindungstasche liegt. Je nach Aminosäurerest kann z.B. die Umorientierung des Tryptophans unterbunden sein, was zur Folge hat, dass das Tryptophan in bestimmten SH3-Domänen ausschließlich in der SH3-II-Konformation vorliegt und demnach nur Klasse-II-Liganden binden kann.

Eine Ausnahme bildete eine spezielle Gruppe von Klasse-I-Liganden, die von Ballester et al. (2004) die neue Bezeichnung Lig-I'-Peptide bekamen. Charakteristisch für Lig-I'-Peptide ist das Vorkommen eines Leucinrestes an der Position P_1 sowie Leucin oder Alanin an der Position P_2 . Abweichend von den klassischen Lig-I-Peptiden, zeigen Lig-I'-Peptide eine ähnliche Konformation wie Klasse-II-Liganden und können dementsprechend an SH3-II-Domänen binden (mit der gleichen Orientierung des Peptids wie normale Klasse-I-Liganden; Abbildung 5-2 B).

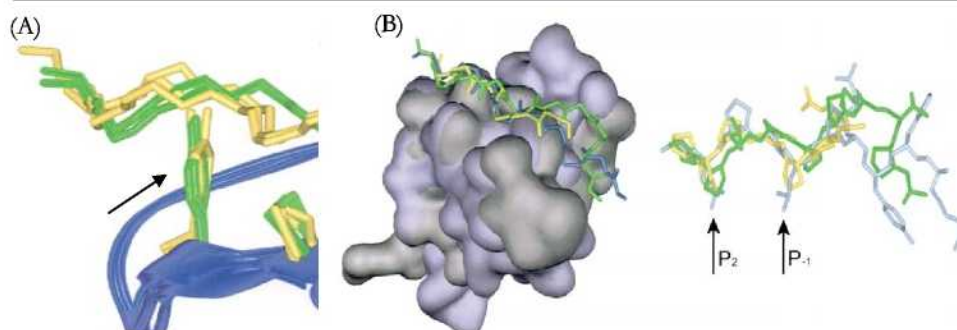


Abbildung 5-1: SH3-Domänen im Komplex mit Klasse-I- und Klasse-II-Liganden sowie Lig-I'-Peptide. (aus Fernandez-Ballester 2004).

(A) Überlagerung von fünf SH3-Ligand-Komplexen, zwei von ihnen mit Klasse-I-Liganden (PDB-Codes: 1ABO und 1FYN, grün) und drei mit Klasse-II-Liganden (PDB-Codes: 1CKA, 1CKB und 1SEM, gelb). Der Pfeil markiert das konservierte Tryptophan. (B) Überlagerung von Abl-SH3 (1ABO), Sem-5-SH3 (1SEM) und Grb2-SH3 (1IO6) und ihren Liganden. Die Rückgrat-Konformation des Lig-I'-Peptids (blau) ähnelt mehr dem des Klasse-II-Liganden (gelb) als dem des Klasse-I-Liganden (grün) (links). Die Überlagerung der drei Liganden (rechts) zeigt, dass die beiden Leucinreste beim Lig-I'-Peptid (blau) in Position P₁ und P₂ (Pfeile) die gleichen Positionen besetzt, wie die konservierten Proline beim Klasse-II-Liganden (gelb).

Betrachtet man die Sequenzen der selektierten PD-Peptide (Abbildung 4-4), so erfüllen drei der vier Sequenzen (PD1, PD2 und PD4) die Voraussetzung für Lig-I' (Leucin an P₁ und P₂). Somit gehört auch das Peptid PD1-R zu dieser speziellen Gruppe von Klasse-I-Liganden. Nur beim PD3-Peptid ist die Position P₂ von einem Phenylalanin statt von einem Leucin besetzt. Es ist aber zu erwähnen, dass dieses Peptid keine eindeutige Bindung mit den untersuchten SH3-Domänen aufwies (Abbildung 4-6). Die Ergebnisse zeigen eine klare Präferenz der Lck-SH3 für Lig-I'-Peptide *in vitro*. Möglicherweise weist das konservierte Tryptophan von Lck-SH3 eine SH3-II-Orientierung auf, so dass die Lck-SH3 wahrscheinlich bevorzugt mit Klasse-II-Liganden und Lig-I'-Peptide interagiert. Diese Vermutung wird durch die PepSpot-Untersuchung der Lck-SH3-Bindung an bekannte *in vitro* Konsensus-Sequenzen unterstützt (Kapitel 4.6). Es konnte eine deutliche Bindung von Lck-SH3 nur an Klasse-II-Liganden und Lig-I'-Peptide nachgewiesen werden, was wiederum eine bevorzugte Ausrichtung des relevanten Tryptophans der Lck-SH3 in SH3-II-Orientierung aufzeigt. Nur eine kaum detektierbare Interaktion an eine der zwei Klasse-I-Liganden wurde gefunden (Abbildung 4-11). Interessanterweise enthält dieses Peptid eines von den zwei LP-Dipeptiden, die bei Lig-I'-Peptiden nötig sind.

5.3 Die Analyse der „PD-Peptide“ und deren Varianten in Form immobilisierter PepSpots erlaubt einen Einblick in die Bindungsspezifität der Lck-SH3-Domäne

Eine schnelle Methode, um Protein-Ligand-Interaktionen zu untersuchen, ist die Verwendung so genannter PepSpot-Membranen mit immobilisierten Peptiden. Mit dieser Methode können zur gleichen Zeit und unter gleichen Bedingungen Bindungsdaten für eine Vielzahl potentieller Liganden zu einem bestimmten Zielprotein (hier Lck-SH3) gewonnen werden. Bedingt durch den Hochdurchsatzcharakter der Peptidsynthese auf der Zellulosemembran kann es in Einzelfällen vorkommen, dass einige PepSpots wegen einer geringeren Syntheserate nicht die angestrebte Peptidmenge pro Membranfläche aufweist. Solche PepSpots können in der Analyse schwächere Signale zeigen, als es die zugrunde liegenden Bindungseigenschaften erwarten ließen. Trotz dieser Schwankungen ist diese Methode verlässlich genug, um in den meisten Fällen Bindungen nachzuweisen und qualitativ Trends bezüglich der Bindungsstärken unterschiedlicher Liganden zu einem bestimmten Zielprotein anzuzeigen. In der Vergangenheit wurden durch die Anwendung der PepSpot-Membran u. a. die Bindungsregion von Synaptojanin-1 für die SH3-Domäne von Amphysin und Endophilin (Cestra et al. 1999) erfolgreich lokalisiert.

Auf dieser Grundlage wurde die Bindung der vier selektierten PD-Peptide PD1, PD2, PD3 und PD4 sowie einiger ihrer Varianten an die Lck-SH3-Domäne und auch an die SH3-Domänen der Fyn, Hck und Src sowie Abl und PI3K untersucht. Es wurden Substitutionen durchgeführt, um die Bedeutung bestimmter Aminosäuren an verschiedenen Sequenzpositionen der einzelnen Peptide näher zu analysieren.

5.3.1 Alle PD-Peptid-Varianten mit Arginin-Substitution an Position P₃ zeigen eine stärkere Bindung an die Lck-SH3 als die Ausgangspeptide

Die Kompass-Tasche der meisten SH3-Domänen enthält im RT-Loop einen negativ geladenen Rest, der für eine Präferenz von Arginin (oder manchmal auch Lysin) an der Position P₃ des Liganden verantwortlich ist (Feng et al. 1994). Eine Ausnahme bildet die Abl-SH3, die einen neutralen Rest (Threonin) an dieser Position besitzt und deswegen auch vorrangig an Liganden mit einem aromatischen Rest (Tyrosin) an der P₃-Position bindet (Cicchetti et al. 1992, Rickles et al. 1994). Die Lck-SH3-Domäne besitzt wie die meisten Src-Typ Tyrosin-Kinasen einen

Aspartatrest an dieser relevanten Position im RT-Loop (D79). Es war deshalb unerwartet, dass bei der Phagendisplay-Selektion keine der gefundenen Peptide einen Argininrest an der Position P₃ enthält, sondern Tyrosin (PD1 und PD3) oder Histidin (PD2 und PD4). Um die Bedeutung von Arginin im Vergleich zu Histidin und Tyrosin an dieser Position zu untersuchen, wurde bei allen vier PD-Peptiden auf der PepSpot-Membran ein Arginin-Austausch durchgeführt. Tatsächlich zeigten alle Arginin-Varianten, verglichen mit den Original-PD-Peptiden, eine erhöhte Affinität zu Lck-SH3 (Abbildung 4–6). Bei der Selektion wurden offensichtlich Peptide selektiert, die in Bezug auf die Affinität an der P₃-Position nicht optimal gewesen sind. Dieses kann durch die große, aber limitierte Vielfalt der in der Phagenbibliothek vorhandenen Peptidsequenzen erklärt werden. Vergleicht man die PD-Peptide miteinander, so sind die sechs Aminosäurereste an den Positionen P₆, P₂, P₁, P₀, P₂ und P₃ (Abbildung 4–4) in allen Sequenzen konserviert. Das bedeutet, dass $1,5 \times 10^8$ verschiedene Sequenzen nötig sind, damit ein gegebenes 6mer-Peptid mit einer Wahrscheinlichkeit von 90 % vertreten ist. Die verwendete Phagenbibliothek enthielt $1,9 \times 10^9$ Sequenzen. So ist die Chance, dass die Bibliothek Peptide mit sieben invarianten Positionen enthält nur 21 %.

Die prozentuale Häufigkeit der verschiedenen Aminosäuren in der Bibliothek ist vom Hersteller (New England Biolabs, Frankfurt) angegeben. Demnach ist Histidin mit 6,3 % und Tyrosin mit 3,6 % vertreten. Obwohl Arginin mit einer Wahrscheinlichkeit von 4,7 % angegeben ist, enthielt keines der PD-Peptide ein Arginin in ihrer Sequenz. In einer Untersuchung von Peters et al. (1994) wurde nachgewiesen, dass Peptide mit Argininresten die Funktion des pIII-Phagenhüllproteins inhibieren und somit die Sekretion des Phagenhüllproteins und auch die Phageninfektiosität stören könnten. Wahrscheinlich wird dadurch die angegebene prozentuale Häufigkeit für Arginin in den tatsächlich exponierten Peptiden an der Phagenoberfläche nicht erreicht. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass basische Reste in der verwendeten Phagenbibliothek offensichtlich unterrepräsentiert waren.

5.3.2 Histidin an Position P₆ der PD-Peptide ist essentiell für die Lck-SH3- Bindung und trägt zur Spezifität der Bindung bei

In jedem der vier selektierten PD-Peptide ist Position P₆ von einem konservierten Histidin besetzt (Abbildung 4-4). Bei drei (PD1, PD2, PD3) der vier PD-Peptiden konnte mittels PepSpot-Analyse gezeigt werden, dass nach Substitution dieses Histidins zu Alanin keine Interaktionen mit der Lck-SH3 nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4-6). Im Fall des PD4-Peptids führte dieser Austausch zu einer deutlichen Reduzierung der Lck-SH3-Bindung.

Die Bindung der anderen SH3-Domänen dagegen wurde durch die Substitution dieses Histidins zu Alanin nur geringfügig reduziert (Abbildung 4-7). Für die Peptidvariante PD1-R wurde anhand der Substitutionsmembran deutlich, dass Histidin an Position P₆ essentiell für die Bindung an die Lck-SH3 ist. Der Ersatz von Histidin durch sämtliche anderen proteinogenen Aminosäuren an dieser Position führte bei fast allen Peptidvarianten zu einem Bindungsverlust an die Lck-SH3 (Abbildung 4-8). Nur bei der Substitution zu Arginin konnte eine schwache Bindung detektiert werden. Die Bindungsanalyse mit Src-SH3 zeigte dagegen, dass diese SH3-Domäne noch an Varianten bindet, an dem dieses Histidin gegen Arginin, Phenylalanin, Leucin, Isoleucin, Lysin und Prolin ausgetauscht wurde (Abbildung 4-8). Die Src-SH3 scheint im Gegensatz zu Lck-SH3 an dieser Position noch andere Aminosäuren zu tolerieren.

SH3-Domänen erkennen Liganden mit einem xPxxP-Motiv. Je nachdem welche Aminosäurereste innerhalb dieses Motivs (an der x-Position) sowie amino- und carboxyterminal von diesem Motiv vorhanden sind, kann die Affinität und Spezifität dieser Liganden zu den verschiedenen SH3-Domänen unterschiedlich sein. Es ist beschrieben, dass zusätzliche Reste außerhalb des Kern-Motivs ebenfalls einen Beitrag zur Spezifität von SH3:Liganden-Wechselwirkung beitragen (Feng et al. 1995, Rickles et al. 1995). Rickles und seine Kollegen (1994 & 1995) konnten durch Selektion von verschiedenen Peptidbibliotheken, in denen das Kern-Motiv (z. B. RPLPPLPP) oder andere als wichtig erachtete Reste invariant gehalten wurden, bevorzugte Reste amino- oder carboxyterminal vom Kern-Motiv bestimmen, die charakteristisch für verschiedene SH3-Liganden sind. Ghose et al. (2001) konnten durch die Aufklärung der Struktur der SH3-Domäne von Csk mit dem natürlichen Peptid-Liganden 3BP1 (25 Reste) zeigen, dass noch zusätzliche Reste an der SH3-Bindung beteiligt sind. Diese zusätzlichen Reste befinden sich carboxyterminal vom xPxxP-Motiv. Neben der Bindung der PPII-Helix, das von Resten im xPxxP-Motiv gebildet wird, werden diese Reste in Form einer 3₁₀-Helix an eine zusätzliche, hydrophobe Tasche von Csk-SH3 gebunden. Die Autoren nehmen an, dass diese zusätzliche Interaktion die hohe Affinität ($K_D=0,8 \mu\text{M}$) und hohe Spezifität der Bindung erklärt. In der vorliegenden Arbeit konnte durch die PepSpot-Membran-Analyse gezeigt werden, dass für alle selektierten PD-Peptide ein Histidinrest außerhalb des Kernmotives an P₆ essentiell für eine affine Bindung an die Lck-SH3 ist. Zudem konnte für die Variante PD1-R gezeigt werden, dass dieser Rest auch einen Beitrag zur Bindungsspezifität leistet, da sich eine Besetzung dieser Position durch Histidin nur bei der Lck-SH3, nicht jedoch bei der Src-SH3 als obligatorisch für eine detektierbare Bindung erwies.

5.3.3 Die Substitutionsanalyse von PD1-R identifiziert Peptide mit verbesserten Lck-SH3-Bindungseigenschaften

Mittels der PepSpot-Membran wurde eine Substitutionsanalyse auf der Basis des Peptids PD1-R durchgeführt. Anhand dieser Analyse konnte geklärt werden, ob die selektierten Aminosäuren an den verschiedenen Positionen obligatorisch sind oder ob andere Aminosäuren an diesen Positionen toleriert werden. Weiterhin konnten anhand dieser Analyse Varianten mit einer höheren Affinität zu Lck-SH3 im Vergleich zu PD1-R identifiziert werden. Die Aminosäuren an den Positionen P₋₃, P₋₂, P₋₁, P₀ und P₃ des PD1-R-Peptids (HSK**R**PLPPLPSL; die Positionen sind fett markiert) wurden für die Substitutionsanalyse konstant gehalten (Abbildung 4-8). Bis auf das Arginin an P₃ kennzeichnen diese Aminosäuren das Kernmotiv der selektierten PD-Peptide, das in jedem dieser PD-Peptide gefunden wurde. Die restlichen Positionen (P₋₆, P₋₅, P₋₄, P₁, P₂, P₄ und P₅) wurden gegen die übrigen 19 Aminosäuren substituiert.

Bis auf das vorher diskutierte Histidin an Position P₋₆ ist an keiner weiteren Position im PD1-R-Peptid eine klare Präferenz für eine bestimmte Aminosäure oder Aminosäuregruppe zu finden. Offensichtlich werden an den Positionen P₋₅, P₋₄, P₁, P₂, P₄ und P₅ eine Reihe von verschiedenen Aminosäuren toleriert. Das deckt sich mit der Tatsache, dass die selektierten PD-Peptide an diesen Positionen unterschiedliche Aminosäurereste aufweisen. Generell aber scheinen Substitutionen mit Cystein, Tryptophan, Tyrosin, Aspartat und Glutamat an diesen Positionen die Bindung dramatisch zu reduzieren. Die Toleranz an einigen dieser Positionen könnte möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die Seitenketten der zugehörigen Aminosäuren kaum oder keinen Kontakt zur Lck-SH3-Oberfläche haben.

Durch den Einsatz der PepSpot-Membran konnten einige Peptide mit besseren Bindungseigenschaften als PD1-R identifiziert werden. Die beste Bindung an Lck-SH3 zeigt das Peptid HFKRPLPPLPS, das eine Substitution zu Phenylalanin an Position P₋₅ enthält. Auch die Peptide mit Arginin oder Phenylalanin an den Positionen P₄ und P₁ zeigen eine verstärkte Bindung zu Lck-SH3. Durch die Substitutionsanalyse konnten also interessante Peptide abgeleitet werden, die zumindest in der PepSpot-Analyse stärker an die Lck-SH3 binden als das PD1-R-Peptid. Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Peptidselektion einer Phagenbibliothek nur ein erster Einblick in die Sequenzeigenschaften der Liganden gegeben werden kann. Erst durch Modifikationen der Ligandensequenz, wie hier gezeigt wurde, kann die Bindung an das Zielmolekül optimiert werden und eine genauere Ligandenpräferenz abgeleitet werden.

5.4 Die PepSpot-Analyse natürlicher Lck-SH3-Bindungspartner erlaubt die Identifizierung ihrer potenziellen Lck-SH3-Bindungsregionen

Für Lck sind in der Literatur eine Reihe von Bindungspartnern beschrieben, von denen zweifelsfrei bekannt ist, dass die Interaktion durch die SH3-Domäne der Lck stattfindet und nicht durch die anderen Domänen. Wertvolle Einblicke in die Bindungsspezifität der Lck-SH3-Domäne können gemacht werden, wenn die Peptidsequenzen der zugehörigen Lck-SH3-Bindungsregionen dieser Interaktionspartner miteinander verglichen werden können. Allerdings ist bislang nur für einen Teil der beschriebenen Lck-SH3-Bindungspartner die für die Bindung relevante Region innerhalb des jeweiligen Proteins kartiert worden. Für die restlichen Interaktionspartner sind bis heute keine Daten vorhanden. In dieser Arbeit wurden daher zunächst von allen beschriebenen Lck-SH3-Bindungspartnern die möglichen Bindungsregionen eingegrenzt. Dazu wurde in den Sequenzen der in der Literatur beschriebenen physiologischen Lck-SH3-Bindungspartner systematisch nach Regionen gesucht, die dem Kriterium der klassischen SH3-Bindung entsprechen (+xxPxxP für Klasse-I- und PxxPx+ für Klasse-II-Liganden). Auch Liganden, bei denen die Bindungsregionen in der Literatur beschrieben sind, wurden dieser systematischen Suche unterzogen. Von den 21 physiologischen Lck-SH3-Bindungspartnern wurden insgesamt 80 Sequenzregionen gefunden, die ein potenzielles Lck-SH3-Bindungsmotiv enthalten. Die ermittelten, potenziellen Bindungsregionen wurden als Peptide auf der PepSpot-Membran immobilisiert und auf eine mögliche Lck-SH3-Bindung untersucht. Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Evolution mittels Phagendisplay, werden mit dieser Methode Daten aus einer natürlich abgelaufenen Selektionsprozedur gewonnen.

Für die Proteine ADAM15, CD2, CD28, HS1, Nef, NS5A, SLP76, Sos, Tio und Tip, deren Lck-SH3-Bindungsstellen bekannt sind (Biesinger et al. 1995; Takemoto et al. 1995; Greenway et al. 1996; Park et al. 1998; Albrecht et al. 1999; Holdorf et al. 1999; Sanzenbacher et al. 1999; Poghosyan et al. 2002; Schweimer et al. 2002; Macdonald et al. 2004), konnten diese durch die Spotmembran-Analyse bestätigt werden (Abbildung 4-9). Für alle diese Proteine konnte nach Inkubation mit Lck-SH3 ein Signal mit dem PepSpot detektiert werden, für dessen zugehöriges Peptid eine Lck-SH3-Bindung beschrieben wurde. In den Fällen, in denen mehrere mögliche Bindungsregionen gefunden wurden, konnte exakt die Bindungsregion nachgewiesen werden, die in der Literatur beschrieben war. Dies zeigt die Zuverlässigkeit der angewendeten Methode.

Für die Proteine PI3K, PI4K, hDgl und WASP sowie für die SH2-Kinase-Linkerregion sind keine detektierbaren Bindungen mit den entsprechenden Peptiden nachweisbar. Die in der Literatur beschriebenen Interaktionen von PI3K (Susa et al. 1996), PI4K (Prasad et al. 1993) und WASP (Zhu et al. 1997) mit der Lck-SH3-Domäne wurden entweder durch Coimmunopräzipitationen oder Affinitätspräzipitationen nachgewiesen. Es ist daher möglich, dass die Bindung dieser Proteine an die Lck-SH3 nicht direkt erfolgt, sondern durch andere Proteine vermittelt wird, und hier deshalb keine direkte Assoziation nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise sind noch andere Bereiche im Protein entscheidend für die Bindung, so dass mit den Peptiden alleine keine Interaktion nachgewiesen werden konnte. Zum Beispiel konnte für die SH2-Kinase-Linkerregion der Abl und Src nur eine Interaktion mit der SH3-Domäne gezeigt werden, wenn diese Linkerregion im Kontext mit der Kinase-Domäne vorlag und nicht als kurzes Peptid. Die Ausbildung der PPII-Helix ist von der räumlichen Umgebung und nicht von einem hohen Prolinanteil abhängig (Cobos et al. 2004).

Für die Proteine c-Cbl, Cbl-b, Sam68 und FasL konnten potenzielle Lck-SH3-Bindungsstellen lokalisiert werden. Da es sich hier um neue Ergebnisse handelt, werden diese Proteine im Folgenden vorgestellt. Mit den Kartierungs-Ergebnissen dieser Arbeit wurde für diese Proteine der Grundstein gelegt, um die Wechselwirkungen dieser Interaktionspartnern mit der Lck-SH3 z.B. durch Mutagenese gezielter untersuchen zu können.

5.4.1 Lck-SH3 interagiert mit der Aminosäureregion 816 bis 830 von c-Cbl und bevorzugt mit drei Regionen von Cbl-b

Die multifunktionalen Proteine c-Cbl und Cbl-b gehören zur Proto-Onkogen Familie, die an verschiedene Signalmoleküle binden und somit in der Signaltransduktion involviert sind. Beide Proteine werden in blutbildenden Zellen exprimiert. Ihre Struktur kann in verschiedene Domänen aufgeteilt werden. Am aminoterminalen Ende befindet sich die SH2-Domäne, gefolgt von der RING-Typ-Zinkfinger-Domäne, die mit E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzymen interagiert, und abschließend die carboxyterminale prolinreiche Domäne. Die Proteine der Cbl-Familie regulieren die T-Zell-Aktivität auf negative Weise, indem sie die Liganden-induzierte Herabregulierung des T-Zell-Rezeptors fördern (Naramura et al. 2002). Eine direkte Bindung von Lck-SH3 an c-Cbl wurde von Hawash und seinen Kollegen (Hawash et al. 2002) beschrieben. Sie konnten nachweisen, dass die Interaktion von c-Cbl mit der SH3-Domäne der Lck wichtig für die Regulation der Lokalisation der Lck in „Lipid Rafts“ ist. Eine Überexpression

an c-Cbl hatte zur Folge, dass die Lokalisation von Lck in den „Lipid Rafts“ verhindert wurde, und umgekehrt die Abwesenheit von c-Cbl die Lokalisation verstärkte.

Für das 120 kDa große Protein c-Cbl wurde durch die systematische Suche nach dem PxxP-Motiv fünf potenzielle Bindungsregionen gefunden. Mittels der PepSpot-Analyse wurde eine Bindung nur an eines der fünf Peptide nachgewiesen (Abbildung 4-9). Dieses Peptid c-Cbl-5 hat die Sequenz GSQVPERPPKPFPRR (AS 816 – 830) und liegt innerhalb des Proteins in der carboxyterminalen prolinreichen Domäne. Dies zeigt, dass die Bindung von Lck-SH3 vermutlich durch diese Region vermittelt wird.

Im Fall von Cbl-b wurden elf mögliche Bindungsregionen gefunden. Eine Bindung von Lck-SH3 konnte an drei dieser Bindungsregionen gezeigt werden, wobei die Bindungsintensitäten an die zugehörigen PepSpots unterschiedlich war. Die Peptide Cbl-b-9 (AS 863 - 877: ASGQVPLPPARRLP), Cbl-b-7 (AS 773 - 786: SDPVPLPPARPPT) und Cbl-b-10 (AS 898 - 911: GSQAPARPPKPRPR) scheinen Regionen innerhalb des Cbl-b-Proteins zu repräsentieren, mit denen die Lck-SH3 interagiert.

5.4.2 Lck-SH3 bindet an die Aminosäureregion 34 bis 48 von Sam68, einem RNA-Bindungsprotein

Sam68 ist ein 68 kDa großes Protein, das während der Mitose an Src assoziiert und von ihr phosphoryliert wird (Fumagalli et al. 1994; Taylor et al. 1994). Sam68 ist ein RNA-bindendes Protein (Feuillet et al. 2002). Sam68 besitzt fünf prolinreiche Domänen, eine carboxyterminale tyrosinreiche Region und eine KH-Domäne. Sam68 ist in der Lage, mit Liganden zu interagieren, die prolinreiche Motive erkennen. Sam68 scheint als ein Adaptormolekül in verschiedenen Signalwegen eine Rolle zu spielen, wobei sie an unterschiedliche PTKs über deren SH3- und SH2-Domänen bindet, abhängig vom Zelltyp und Aktivierungsstatus. In Fibroblasten wechselwirkt Sam68 hauptsächlich mit Src (Taylor et al. 1995). In HTLV-1 infizierten Hayai Zelllinien zeigt Sam68 eine bevorzugte Bindung an Fyn, und in nicht infizierten Jurkat T-Zellen eine Bindung an Fyn und Lck (Fusaki et al. 1997). Auch eine Interaktion mit der p86-Untereinheit von PI3K ist beschrieben (Taylor et al. 1995). Es wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von Sam68 in einigen T-Zelllinien mit dem hohen Expressionslevel von verschiedenen PTK verbunden ist (Fusaki et al. 1997, Lang et al. 1999). Die niedrige Phosphorylierungsrate von Sam68 durch Lck konnte durch die Mutation einiger wichtiger Aminosäurereste in der Lck-SH2-Kinase-Linkerregion erhöht werden (Feuillet et al. 2002). Es

wurde vermutet, dass dadurch die SH3-Domäne der Lck zugänglicher für Sam68 war und somit ihre Interaktionen begünstigt wurde.

In dieser Arbeit konnte eine Bindung von Lck-SH3 an Sam68 gezeigt und die Bindungsregion für Lck-SH3 kartiert werden (Abbildung 4-9). Für Sam68 konnten sieben potenzielle Bindungsregionen innerhalb der Sequenz identifiziert werden. Mittels der PepSpot-Analyse konnte eine deutliche Interaktion von Lck-SH3 nur an eine dieser sieben möglichen Bindungsregionen nachgewiesen werden. Somit scheint das Peptid Sam68-1 (AS 34 - 48: PSRQPPLPHRSRGG) die hauptsächliche Bindungsregion für die SH3-Domäne der Lck innerhalb von Sam68 darzustellen.

5.4.3 Lck-SH3 interagiert mit der Aminosäureregion 62 bis 76 des menschlichen FasLiganden, jedoch nicht mit der entsprechenden Region von FasL aus Maus

Das 40 kDa große FasL (=Fas-Ligand) Membranprotein spielt eine wichtige Rolle bei der T-Zell-Homöostase (Li-Weber et al. 2004). FasL wird von cytotoxischen T-Zellen exprimiert und kann an Zellen, die den Rezeptor Fas besitzen, binden und deren programmierten Zelltod herbeiführen. Eine hervorstechende Besonderheit von FasL ist seine sehr prolinreiche cytoplasmatische Sequenz, wobei 16 der 28 Aminosäurereste von konservierten Prolinen besetzt sind.

Für FasL wurden bei der Suche nach dem PxxP-Motiv innerhalb der Proteinsequenz insgesamt fünf potenzielle Bindungsregionen gefunden. Eine Bindung von Lck-SH3 wurde anhand der PepSpot-Analyse nur für einen bestimmten Bereich (FasL-4; AS 62-76: PLPPLPLPPLKKRGN; Abbildung 4-9) des menschlichen FasL nachgewiesen. Dieser Bereich entspricht genau dem Bereich des Maus FasL-Proteins, mit dem Hane et al. (1995) eine direkte Interaktion mit menschlichen Fyn-SH3, aber nicht mit Lck-SH3 zeigen konnten. Vergleicht man die Aminosäure-Sequenz vom menschlichen FasL mit der vom Maus FasL in dieser relevanten Region, so sind einige Unterschiede zu erkennen (Abbildung 5-2). Um die Ergebnisse von Hane und seinen Kollegen (1995) nachzuprüfen bzw. zu verifizieren, wurde nachträglich die Bindung von Lck-SH3 sowohl an menschliches FasL als auch an Maus FasL-Peptid untersucht. Tatsächlich wurde in Übereinstimmung mit Hane et al. (1995) keine Assoziation von Lck-SH3 an Maus FasL-4-Peptid gefunden (Abbildung 4-9 Inlett). Die Bindung an menschliches FasL wurde dagegen bestätigt. Es konnte hier gezeigt werden, dass menschliches FasL-Peptid an Lck-SH3 bindet, nicht jedoch das entsprechende FasL-Peptid aus Maus. Dies zeigt in diesem Beispiel

FasL-4 (Maus): N-LPLPPLTPLKKDHN

FasL-4 (Mensch): N-LPPLPLPPLKKRGNH

Abbildung 5-2: Sequenzvergleich von FasL-4 aus Maus und Mensch.

Die Unterschiede sind grau markiert. Die möglichen PxxP-Motive in der menschlichen FasL-4-Sequenz sind unterstrichen oder durch einen Balken markiert.

eine Spezies spezifische Bindung an. Die unterschiedliche Lck-SH3-Bindung scheint auf die wenigen Unterschiede in der Sequenz zurückzuführen zu sein. Betrachtet man die Sequenz des menschlichen FasL-4-Peptids, so sind zwei potentielle xPxxP-Motive zu erkennen. Innerhalb dieses xPxxP-Motivs unterscheiden sich die beiden Sequenzen um ein bis zwei Aminosäuren. Diese Reste scheinen für die Lck-SH3-Interaktion wichtig zu sein.

5.5 Alle untersuchten nativen Lck-SH3-Bindungspartner können als Klasse-II-Liganden eingestuft werden und binden in entgegen gesetzter Orientierung wie die PD-Peptide

Um eventuelle Gemeinsamkeiten innerhalb der aus den physiologischen Lck-SH3-Bindungspartnern abgeleiteten Peptide erkennen zu können, wurden alle Peptide auf der Basis der in den Peptidsequenzen enthaltenen xPxxP-Motive sortiert (Abbildung 4-10). Es wurden nur Peptidsequenzen ausgewählt, deren zugehörige Peptide eine starke Bindung mit der Lck-SH3 aufweisen. Dabei stellt sich heraus, dass alle Sequenzen ausnahmslos als Klasse-II-Liganden eingestuft werden können. Bei 100 % der Sequenzen ist die Ankerposition P₃ für Klasse-II-Liganden von einem basischen Rest besetzt, wobei bei 80 % (12 von 15) der Sequenzen ein Arginin vorkommt. Wahrscheinlich binden diese Peptide in der Klasse-II-Orientierung an die Lck-SH3-Domäne. Somit kommt es bei Komplexbildung sehr wahrscheinlich zur Ausbildung der typischen Salzbrücke zwischen Ligandenankerrest Arginin oder Lysin und Aspartat 79 der Lck-SH3. Die resultierende Konsensus-Sequenz aus den stark bindenden Peptiden der physiologischen Bindungspartner kann folgendermaßen dargestellt werden: N-gxp(v/p)**PI**(l/p)**PPR**prpr. Die beiden fett markierten Proline sind in allen Sequenzen vorhanden. Groß geschriebene Buchstaben repräsentieren Aminosäurereste, die sehr häufig (57 bis 78 %) an den Positionen vorkommen. Kleine Buchstaben zeigen Reste an, die nur mäßig (29 bis 43 %) konserviert sind (x steht für eine beliebige Aminosäure).

Im Gegensatz zur Konsensus-Sequenz aus den Phagendisplay-Peptiden mit dem konservierten Histidin an P₆, sind hier außerhalb des Kern-Motivs keine dominierenden Aminosäuren zu finden. Zusätzliche Prolin- und Argininreste in der Liganden-Sequenz scheinen wichtig für die Lck-SH3-Bindung zu sein. Auffällig ist, dass bei elf der 15 aufgelisteten Peptide mindestens ein weiterer basische Rest carboxyterminal des eigentlichen Ankerrestes zu finden ist, bei fünf dieser Sequenzen sogar zwei basische Reste. Wahrscheinlich können diese Reste einen positiven Beitrag zur Affinität leisten. Je nach Sequenzkontext, sind diese basischen Reste jedoch nicht obligatorisch für eine starke Bindung, wie die beiden stark bindenden Peptide aus Tip und Tio zeigen, bei denen kein weiterer basischer Rest vorhanden ist. Das vermehrte Vorkommen von Prolinen dürfte hauptsächlich zu einer Stabilisierung der PPII-Helix beitragen. Generell scheint es viele Sequenzmöglichkeiten für eine Lck-SH3-Bindung zu geben.

5.5.1 *In vitro* werden Klasse-I-Liganden selektiert, *in vivo* kommen nur Klasse-II-Liganden vor

Es ist offensichtlich, dass alle nativen Lck-Bindungspartner, für die in dieser Arbeit eine Bindung an die SH3-Domäne der Lck nachgewiesen werden konnte, zu den Klasse-II-Liganden gehören. Im Gegensatz dazu sind alle *in vitro* selektierten PD-Peptide Klasse-I-Liganden. Zudem gehören die PD-Peptide PD1, PD2 und PD4 zu einer speziellen Gruppe von Klasse-I-Liganden, den Lig-I'-Peptiden, die von Fernandez-Ballester et al. (2004) eingeführt wurden. Sie fanden heraus, dass das konservierte Tryptophan in der SH3-Bindungstasche zwei Orientierungen einnehmen kann, anhand dessen sich die entsprechende SH3-Struktur, frei oder im Komplex, in SH3-I und SH3-II einteilen lässt. Dabei wird die Bewegung des konservierten Tryptophans direkt von einem Rest an einer Schlüsselposition beeinflusst. Dieser Rest ist in der Mitte des β d-Stranges lokalisiert und wird von einem konservierten Glycin (G109 bei Lck-SH3) und einer hydrophoben Aminosäure flankiert. Die Lck-SH3-Domäne weist an der Schlüsselposition ein Phenylalanin (F110) auf. Nach den Ergebnissen von Ballester-Fernandez (2004) ist die Bewegung des konservierten Tryptophans der SH3-Domäne im freien Zustand zu beiden Orientierungen möglich, wenn die Schlüsselposition unter anderem von einem aromatischen Rest besetzt wird. Erst nach Bindung eines Liganden wird das konservierte Tryptophan, abhängig von der Eigenschaft des Liganden (Klasse-I oder Klasse-II), entweder in SH3-I- oder SH3-II-Orientierung fixiert. Befindet sich an der Schlüsselposition ein Isoleucin, Threonin, Valin, Methionin, Arginin oder Glutamat, so wird die Bewegung des konservierten Tryptophans schon im freien Zustand der SH3-Domäne eingeschränkt, und sie liegt dann ausschließlich in der

SH3-II-Orientierung vor. Generell binden also Klasse-I-Liganden an SH3-Domänen mit einem SH3-I konservierten Tryptophan und Klasse-II-Liganden an SH3-Domänen mit einer SH3-II-Orientierung des Tryptophans. Die einzige Ausnahme bilden die Lig-I'-Peptide mit einem Leucin an Position P₁ und einem Leucin oder Alanin an der Position P₂. Diese beiden Aminosäuren ermöglichen eine dihedrale Winkelkombination, die für Prolinreste nicht gewährleistet ist, welche meistens in diesen Positionen in Klasse-I-Liganden vorkommen. Die Folge ist, dass das Rückgrat der Lig-I'-Peptide von einer idealen PPII-Helix abweicht und der Bahn eines Klasse-II-Liganden folgt, anstatt eines Klasse-I-Liganden. Somit binden diese Lig-I'-Peptide an SH3-II-Domänen bei Beibehaltung ihrer Typ I-Orientierung.

Für die Lck-SH3 mit F110 als Schlüsselrest kann demnach eine Mischung aus Klasse-I, Klasse-II und Lig-I'-Peptiden als Ergebnis der *in vitro* Phagendisplay-Selektion als auch unter den nativen Peptid-Liganden erwartet werden. Überraschenderweise gehören die PD-Peptide bevorzugt zu den Lig-I'-Peptiden und alle nativen Peptid-Liganden zu den Klasse-II-Liganden. Offensichtlich liegt das konservierte Tryptophan (W97) der Lck-SH3 in einer bevorzugten SH3-II-Orientierung vor. Dieses kann selbstverständlich nur durch die Bestimmung der Komplexstrukturen der Lck-SH3 mit den unterschiedlichen Liganden zweifelsfrei festgestellt werden. Diese Beobachtung wird durch die Tatsache gestützt, dass alle drei verfügbaren Strukturen der freien Lck-SH3-Domäne eine SH3-II-Orientierung aufweisen (PDB-Codes: 1KIK, 1H92 und 1LCK; Eck et al. 1994; Schweimer et al. 2002; Briese et al. 2003). Es ist also wahrscheinlich, dass neben der von Ballester-Fernandez (2004) beschriebene Schlüsselposition noch andere Faktoren für die beobachtete Bevorzugung einer SH3-II-Orientierung des Tryptophans verantwortlich sind. Allerdings ist die SH3-II-Orientierung des Tryptophans nicht obligat, da zum einen PD3 (und PD3-R) zu den klassischen Klasse-I-Liganden zu zählen ist und mittlerweile in unserem Labor durchgeführte weitere Phagendisplay-Experimente mit veränderten Selektionsbedingungen ebenfalls die Anreicherung klassischer Klasse-I-Liganden für die Lck-SH3 ergaben (Daten nicht gezeigt). Die Gründe, weshalb nur unter bestimmten Bedingungen Klasse-I-Liganden der Lck-SH3 *in vitro* selektiert werden können, sind zum jetzigen Zeitpunkt der Forschung noch nicht klar.

Eine wichtige Frage, die sich aufgrund der vorliegenden Ergebnisse stellen lässt, ist, wieso die *in vitro* selektierten Peptide hauptsächlich zu den Lig-I'-Peptiden gehören, aber die Peptidsequenzen aus nativen Lck-SH3-Bindungspartnern alle eine Typ II-Orientierung aufweisen. In diesem Zusammenhang ist es sehr interessant, dass die Mehrzahl der SH3-LigI'-Komplexstrukturen

Lig-I'-Peptide enthalten, die alle aus *in vitro* Studien stammen und an beiden relevanten Positionen (P₋₁ und P₂) einen Leucinrest haben (PDB-Code: 1IO6, 1NLO, 1NLP, 1AWF, 1RLP, 1RLQ). Die einzige Ausnahme bildet die Komplexstruktur von Fyn-SH3 mit einem Lig-I'-Peptid, dessen Sequenz dem natürlichen Bindungspartner p85 PI3K (1AON, 1AZG) entnommen ist. Im Unterschied zu den oben genannten *in vitro* Peptiden enthält dieses Peptid einen Alaninrest an P₂. Weiterhin weisen alle hochaffinen SH3-Bindungspeptide, die durch Phagendisplay-Studien gegen andere Src-Typ SH3-Domänen (Src, Fyn, Lyn und Yes) selektiert wurden (Sparks et al. 1994, Rickles et al. 1994, Sparks et al. 1996), Lig-I'-Eigenschaften auf.

Die unterschiedliche Präferenz der Lck-SH3-Liganden bei der *in vitro* und *in vivo* Selektion könnte möglicherweise durch die unterschiedlichen Bedingungen erklärt werden. Unter *in vitro* Selektionsbedingungen sind die physikalisch-chemischen Parameter für eine Komplexbildung anders als die Situation in lebenden Zellen. *In vitro* wird eine maximale Diffusionsrate der beteiligten Moleküle sowie die Abwesenheit von Kompetitionsproteinen gewährleistet. *In vivo* dagegen ist die Diffusionsrate der beteiligten Moleküle verringert und die Anwesenheit von Proteinen vorhanden, die mit einem gegebenen Liganden konkurrieren. So könnten kinetische Parameter wie die Assoziations- und Dissoziationsrate die beobachtete Lig-I'-Präferenz der Lck-SH3-Bindungspeptide während der Phagendisplay-Selektionsprozedur erklären. Als Konsequenz davon könnten Lig-I'-Peptide gut dazu geeignet sein, mit hoher Affinität an SH3-Domänen zu binden. Doch andererseits könnte ihnen die nötige Spezifität fehlen, die für native Liganden erforderlich ist. Möglicherweise könnten ihnen auch die notwendigen kinetischen Eigenschaften fehlen, die für die effektive Ausbildung und Erhaltung von Komplexen unter nativen Bedingungen nötig wären. Auch die Größe der Liganden ist in den beiden Systemen unterschiedlich. Bei der *in vitro*-Selektion sind Peptid-Liganden vorhanden, die in diesem Fall eine begrenzte Größe von 12 Aminosäureresten haben. *In vivo* dagegen sind größere Proteine und Proteinkomplexe vorhanden. Möglicherweise gehören die meisten nativen Peptid-Liganden zu den Klasse-II-Liganden, da diese eventuell spezifischer, aber schwächer an die Lck-SH3-Domäne binden. Als Teil einer Signalkaskade geht die Lck mit sehr vielen Proteinen eine Bindung ein. Eventuell ist es deshalb von Vorteil, wenn die Wechselwirkungen zwischen Lck und ihrem Ligand nur schwach sind, damit die Komplexe schnell gebildet werden und wieder schnell zerfallen können.

Weitere Untersuchungen sind daher erforderlich, um die Spezifität und Affinität der nativen Peptid-Liganden im Vergleich zu den Lig-I'-Peptiden zu bestimmen.

5.6 PD-Peptide PD1 und PD1-R interagieren mit den SH3-Domänen

Die Interaktion eines mittels des Phagendisplay-Verfahrens selektierten Peptides an die Lck-SH3-Domäne wurde näher charakterisiert. Das Peptid PD1 wurde ausgewählt, weil es bei der Phagendisplay-Selektion mit einer Häufigkeit von über 60 % auftrat und beim Anti-Phagen-ELISA die höchste Affinität aufwies. Die Position des basischen Ankerrestes P₃ ist in diesem Peptid durch einen Tyrosin besetzt. Es ist bekannt, dass die Affinität eines Peptids in den meisten Fällen erhöht wird, wenn der basische Ankerrest von einem Arginin besetzt ist (Rickles et al. 1994; Sparks et al. 1994; Alexandropoulos et al. 1995). Zusätzlich zum Peptid PD1 wurde deshalb die Peptidvariante PD1-R untersucht, die an der Position P₃ statt dem Tyrosin ein Arginin enthält. Mittels der PepSpot-Membran-Analyse konnte eine stärkere Bindung von PD1-R an die Lck-SH3 im Vergleich zu PD1 festgestellt werden (Abbildung 4-6).

Die Bindung des PD-Peptids PD1 und seiner Variante PD1-R an die Lck-SH3-Domäne und an die anderen SH3-Domänen wurde mit verschiedenen spektroskopischen Methoden untersucht. Für die Analyse der Protein- und Peptid-Konformationsänderung bei Bindung wurde die CD-Spektroskopie herangezogen. Für die Untersuchung der Bindungsaffinität wurde die Fluoreszenzspektroskopie angewendet. Mittels NMR-Spektroskopie wurde die Peptidbindungsfläche auf der SH3-Domäne kartiert.

5.6.1 PD1 und PD1-R bilden schon als freie Peptide eine PPII-Helix aus

Die Fern-UV-CD-Spektren von PD1 und PD1-R zeigen ein Minimum bei 200 nm und ein Maximum um 228 nm (Abbildung 4-13). Der Vergleich dieser Spektren mit den in der Literatur beschriebenen Spektren (Manning et al. 1991; Rabanal et al. 1993, Kelly et al. 2001) zeigt, dass PD1 und PD1-R in Lösung eine PPII-Helix-Konformation aufweisen. Das CD-Spektrum einer PPII-Helix ist durch ein Minimum bei ca. 200 nm und einem Maximum um 230 nm gekennzeichnet (Manning et al. 1991; Rabanal et al. 1993, Kelly et al. 2001). Viguera et al. (1994) haben gezeigt, dass einige prolinreiche Peptide schon alleine in Lösung eine PPII-Helixform aufweisen. Renzoni et al. (1996) dagegen konnten zeigen, dass das prolinreiche P2L-Peptid (PPRPLPVAPGSSKT) im freien Zustand unstrukturiert war, und erst durch die Bindung an die Fyn-SH3 die PPII-Helix-Konformation einnimmt. In dieser Arbeit konnte mittels Fern-UV-CD-Analyse gezeigt werden, dass die Peptide PD1 und PD1-R schon im freien Zustand in Lösung die Struktur einer PPII-Helix besitzen.

Die CD-Spektren der freien SH3-Domänen und freien Peptiden verglichen mit den beiden Komponenten bei Bindung zeigen nur leichte Unterschiede (Abbildung 4-14, Kapitel 4.8). Offensichtlich bewirkt die Bindung von SH3-Domänen mit den Peptiden keine großen Konformationsänderungen. Die Differenzspektren zeigen für einige SH3-Domänen (Fyn, Hck, Src) leichte Unterschiede im Bereich zwischen 220 und 230 nm. Wahrscheinlich deutet dies auf eine Umgebungsänderung von aromatischen Resten der SH3-Domäne hin (Viguera et al. 1994). Für fast alle SH3:Peptid-Komplexe ist im Differenzspektrum ein leichter Unterschied im Bereich von 200 bis 210 nm zu erkennen. Yu et al. (1994) konnten mittels NMR-Spektroskopie zeigen, dass sich die Konformation der PI3K-SH3-Domäne bei Ligandenbindung nicht ändert. Womöglich weist die Änderung im Bereich von 200 – 210 nm auf eine Änderung der PPII-Helix-Konformation hin, da eine PPII-Helix durch ein Minimum um 200 nm gekennzeichnet ist. Da eine Bindung die PPII-Helixbildung begünstigt (Renzoni 1996), könnte diese Änderung eine Zunahme der Anteile von PPII-Helix-Konformationen im Peptid bedeuten.

5.6.2 PD1 und PD1-R binden neben Lck-SH3 auch die SH3-Domänen anderer Src-Typ-Kinasen

Um die Bindungsaffinität der Peptide PD1 und PD1-R an die Lck-SH3-Domäne zu bestimmen, wurden intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz-Titrationsen durchgeführt. Es ist bekannt, dass die SH3-Domänen verschiedener Src-Typ Kinasen, zu denen die Lck gehört, häufig die gleichen Liganden binden können. Zum Beispiel bindet Sos und Sam68 an die SH3-Domänen von Src, Fyn, Lck (Park et al. 1998) und Hck (Scott et al. 2002) sowie an Grb2 (Najib et al. 2002) und BTK (Guinamard et al. 1997). Um eine Aussage zur Spezifität von PD1 und PD1-R in Hinblick auf die Lck-SH3 machen zu können, wurden ebenfalls die Affinitäten von PD1 und PD1-R zu den Src-Typ SH3-Domänen von Src, Hck und Fyn sowie zu den nicht Src-Typ SH3-Domänen von Abl- und PI3K bestimmt.

Die K_D -Werte für die Bindung der Peptide PD1 und PD1-R an die SH3-Domänen liegen in der Größenordnung von 0,2 μM bis 112 μM (Tabelle 4-3). Diese Werte liegen in einem Bereich, der auch für andere SH3:Liganden-Wechselwirkungen beschrieben ist (Viguera et al. 1994; Musacchio 2003). PD1 bindet mit einem K_D -Wert von 49 μM und PD1-R mit einem K_D -Wert von 23 μM an die Lck-SH3. Anzumerken ist, dass der K_D -Wert für die Interaktion von PD1 mit der Hck-SH3 mit 0,23 μM zu den bisher affinsten SH3:Peptid-Bindungen zu zählen ist. PD1 und seine abgeleitete Variante PD1-R binden nicht ausschließlich an die SH3-Domäne der Lck, die als Zielprotein in der Selektion eingesetzt wurde. PD1 zeigt mit der Src-SH3 eine zur Lck-SH3

ähnliche Affinität. Die K_D -Werte von PD1 zu den SH3-Domänen von Fyn und Hck sind sogar um mehr als Faktor 10 bzw. 200 größer als zur Lck-SH3. Ähnliches gilt für Peptid PD1-R, das an die SH3-Domänen aus Src und Fyn um etwa Faktor 10 stärker bindet als an Lck-SH3. Mit der SH3-Domäne von Hck zeigt PD1-R eine um etwa Faktor 50 stärkere Bindung als an die Lck-SH3. Eine weitaus schwächere Bindung als an die Lck-SH3 zeigt PD1 zu der SH3-Domäne aus PI3K. Mit Abl-SH3 konnten keine reproduzierbaren Bindungen nachgewiesen werden. Somit zeigen das affinste Peptid der verwendeten Phagenbibliothek, und ebenfalls seine abgeleitete Variante PD1-R, sehr gute Bindungseigenschaften zu weiteren Src-Typ Kinasen, wobei die äußerst affine Bindung zu Hck-SH3 hervorzuheben ist.

Funktionelle Überlappungen zwischen einigen Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) sind häufig berichtet worden (z. B. aus Studien mit *bck^{-/-}fgr^{-/-}* (Lowell et al. 1994) und *fyn^{-/-}lck^{-/-}* (Groves et al. 1996) Doppel-Knockout-Mäusen). Das deutet darauf hin, dass ein einzelner Ligand gewöhnlich mit verschiedenen SH3-Domänen wechselwirken kann. Umgekehrt kann eine SH3-Domäne mit unterschiedlichen Liganden interagieren und somit an verschiedenen Signalwegen beteiligt sein. So gesehen, ist in der Natur eine strikte Interaktion eines Ein-Liganden zu einer Ein-SH3-Domäne nicht vorgesehen, und somit eine *in vitro* Selektion eines Liganden, der nur an die Lck-SH3 bindet, kaum möglich. Von den untersuchten Src-Typ Kinasen zeigt die Src eine weit verbreitete Verteilung in verschiedenen Zelltypen und eine Beteiligung an vielen Signaltransduktionswegen (Hardie et al. 1995; Xu et al. 1997). Die Expression von Lck, Fyn und Hck ist überwiegend in den blutbildenden Zellen vorhanden, wobei Lck und Fyn hauptsächlich in lymphocytischen Zelllinien (T-Zellen) zu finden sind, und Hck fast nur in myeloiden Zellen (Monocyten und Macrophagen) vertreten ist. Es scheint, dass die individuelle Verteilung der Src-Typ Kinasen in den verschiedenen Zellen *in vivo* die teilweise geringe Ligandenspezifität kompensiert. Zum Beispiel bindet das HIV-1-Nef-Protein mit sehr hoher Affinität an die Hck-SH3 ($K_D=0,25 \mu\text{M}$ (Lee et al. 1995) bzw. $K_D=0,6$ (Arold et al. 1998)) und gleichzeitig mäßig gut an die SH3-Domänen von Fyn und Lyn. Da Hck ausschließlich in Makrophagen zu finden ist, und Fyn sowie Lyn in T-Zellen vorhanden sind, erscheint der gemessene Unterschied in den K_D -Werten von mehr als einer Zehnerpotenz nur in solchen Fällen bedeutsam, in welchen die betreffenden Kinasen auch tatsächlich in der selben Zelle bzw. im selben Zellkompartiment miteinander um den Liganden konkurrieren müssen.

Sehr auffällig ist die hohe Bindungsstärke, die die Hck-SH3-Domäne zu den Peptiden PD1 und PD1-R zeigt (Tabelle 4-3). Arold et al. (1998) konnten zeigen, dass die hohe Bindungsstärke von Nef an die Hck-SH3 verglichen mit den anderen SH3-Domänen (Lck, Fyn, Src) auf die

Flexibilität des RT-Loops der Hck-SH3 zurückzuführen ist. Die Flexibilität des RT-Loops erlaubt es der Hck-SH3, eine Bindung mit ihren Liganden einzugehen, ohne dass ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken aufgebrochen werden muss, wie es bei den anderen SH3-Domänen der Fall ist. Dies ist wahrscheinlich der Grund, wieso die Hck-SH3 im Vergleich zu den SH3-Domänen der Lck, Fyn und Src sowohl mit Liganden wie Tip (Schweimer et al. 2002) und Tio (Albrecht et al. 1999) als auch mit den selektierten Peptiden PD1 und PD1-R die höchste Affinität zeigt.

5.6.3 PD1 und PD1-R binden an die für SH3-Liganden typischen Regionen auf der Lck-SH3-Domäne

Prolinreiche Liganden werden an eine hydrophobe, aromatenreiche Region der SH3-Domänen gebunden, die durch Reste geformt werden, die im RT-Loop, n-Src-Loop und in der helikalen Schleife zwischen den Strängen β e und β d liegen (Abbildung 1–4). Die Bindungsregion wird in drei Taschen unterteilt. Die zwei xP-Bindungstaschen interagieren jeweils mit einem xP-Dipeptid des Liganden. In der dritten Tasche (Kompass-Tasche), die meistens einen negativ geladenen Rest enthält, erfolgt eine Interaktion dieses negativen Restes mit dem basischen Rest an Position P₃ des Liganden über eine Salzbrücke (Feng et al. 1995).

Die Kartierung der Lck-SH3:PD-Peptid-Interaktionen erfolgte mittels NMR-Titrations-experimenten. Während der Titration von PD1 bzw. PD1-R ist für die meisten Resonanzen eine stetige Änderung der chemischen Verschiebung der betroffenen Resonanzen vom ungebundenen zur gebundenen Position zu beobachten (Abbildung 4-15). Das weist darauf hin, dass die Dissoziation des Komplexes sehr schnell ist (schneller Austausch). Während der Titration ist deshalb nur ein einzelner Satz an Resonanzen zu beobachten, dessen chemische Verschiebung dem gewichteten Mittelwert der chemischen Verschiebungen der freien und gebundenen Einzelzustände von Lck-SH3 entspricht. Für einige Resonanzen (z. B. E73, L80, W98, F114, N114 beim Komplex Lck-SH3:PD1 und S71, H76, G95, W97, W98, F113, N114 beim Lck-SH3:PD1-R-Komplex) ist ein intermediärer Austausch zu beobachten, welcher durch eine Linienverbreiterung und eine Intensitätsabnahme der NMR-Signale sowie das Wiederauftauchen dieser Signale gekennzeichnet ist. Der intermediäre Austausch tritt auf, wenn die Austauschrate der Differenz der chemischen Verschiebung zwischen den Resonanzen im Komplex und im freien Zustand ähnlich ist (Zuiderweg et al. 2002).

Der Vergleich der Spektren beider Komplexe spiegelt die höhere Affinität von Lck-SH3 zu PD1-R (K_D von 23 μ M) im Vergleich zu PD1 (K_D von 49 μ M) wider. Bei beiden Titrationsen wurde die gleiche Menge an Lck-SH3 vorgelegt (300 μ M) und in gleichen Schritten die PD-Peptide bis zu einer Konzentration von ca. 2 mM zugegeben. Im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum des Komplexes Lck-SH3:PD1-R wurde spätestens beim vorletzten Titrationschritt alle Resonanzen wieder sichtbar, die intermediären Austausch zeigen. Beim Komplex Lck-SH3:PD1 dagegen wurden diese Resonanzen erst im letzten Titrationschritt im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum wieder sichtbar.

Durch die NMR-Titrationsexperimente konnten die Bindungsoberflächen der Peptide PD1 und PD1-R an die SH3-Domäne der Lck kartiert werden (Abbildung 4-17). Die Kartierung der Peptidbindungsregion zeigt, dass durch die Bindungen der Peptide PD1 und PD1-R an die Lck-SH3 ähnliche Reste beeinflusst werden (Abbildung 4-16). In beiden Komplexen finden die deutlichsten Änderungen innerhalb von L69 - L80, S94 - A100 und F113 - N114 der Lck-SH3-Peptidkette statt. Diese drei Regionen entsprechen dem RT-Loop, dem n-Src-Loop und dem helikalen Turn, deren Reste die hydrophobe Bindungsregion für prolinreiche Liganden bildet. Somit scheinen auch die Peptide PD1 und PD1-R an die Lck-SH3-Domäne in gleicher Weise zu binden wie typische prolinreiche SH3-Liganden (Yu et al. 1994). Die Ergebnisse entsprechen gut den Ergebnissen von Schweimer et al. (2002), die die Lck-SH3-Bindungsoberfläche für das Tip-Peptid (AS 173 - 185: GMPTPLPPRPAN), einem Klasse-II-Liganden, kartiert hatten. Auch sie konnten zeigen, dass die Bindung des Tip-Peptids Veränderungen im RT-Loop, im n-Src-Loop und dem helikalen Turn der Lck-SH3 hervorrufen.

Obwohl die Bindung der beiden Peptide PD1 und PD1-R Änderungen im ähnlichen Bereich der Lck-SH3-Peptidkette aufweisen, sind doch konkrete Unterschiede zu erkennen. Diese eindeutigen Unterschiede können den Aminosäureresten S71, H76, S94, G95, W97, A100, F110 und der Seitenkette von W97 zugeordnet werden. Die Bindung der beiden Peptide an die Lck-SH3 erfolgt somit auf leicht verschiedene Weise. Diese Unterschiede werden durch den Austausch des selektierten Tyrosinrestes an Position P₃ zum Arginin verursacht. Wie schon festgestellt, konnte das Peptid PD1 anhand seiner Sequenz zu den Klasse-I-Liganden zugeordnet werden. Dies würde auf jeden Fall auch für das Peptid PD1-R gelten, da es aminoterminal vom xPxxP-Motiv ein Arginin als basischen Anker enthält. PD1-R weist sieben Übereinstimmungen in der Aminosäuren-Sequenz mit dem Klasse-I-Peptid VSL12 (VSLARRPLPLP) auf, das von Rickles et al. (1995) bei der Phagendisplay-Selektion gegen die SH3-Domäne der Src gefunden wurde. Die Lösungsstruktur des VSL12:Src-SH3-Komplexes zeigt, dass das Arginin an der

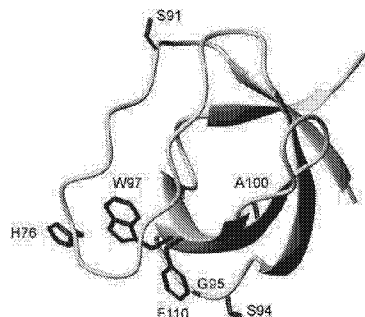


Abbildung 5–3: Struktur der Lck-SH3-Domäne mit wichtigen Aminosäureresten.

In rot sind die Aminosäurereste von Lck-SH3 dargestellt, die bei Bindung von PD1 und PD1-R an die Lck-SH3 unterschiedlich stark betroffen sind.

Salzbrücke mit D99 in der Kompass-Tasche bildet (Feng et al. 1995). Die Aminosäuren D99 und W118 der Src SH3 entsprechen den Aminosäuren D79 und W97 der Lck-SH3. Angenommen, das Peptid PD1-R interagiert auf dieselbe Weise mit der Lck-SH3 wie das Peptid VSL12 mit der Src-SH3, so könnte das Arginin an P_3 von PD1-R mit D79 der Lck-SH3 eine Salzbrücke ausbilden. Da beim Peptid PD1 an dieser Position statt des Arginins ein Tyrosin vorhanden ist, wäre die Ausbildung einer Salzbrücke nicht möglich. Das bedeutet, dass der Bindungsunterschied zwischen den beiden Peptiden hauptsächlich in der Kompass-Tasche zu finden wäre. Und tatsächlich liegen von den sieben Resten, die die größten Differenzen zwischen PD1 und PD1-R bei Bindung an die Lck-SH3 aufweisen, drei Reste (H76, W97, F110) in der Kompass-Tasche (Abbildung 5–3). Auch die deutlich stärkere Änderung der Seitenkette von W97 bei Bindung von PD1-R im Vergleich zu PD1 deutet auf eine unterschiedliche Interaktion in der Kompass-Tasche hin.

5.6.4 PD1 und PD1-R binden im oberen nanomolaren Bereich an die Hck-SH3-Domäne

Die Bestimmung der K_D -Werte von PD1 und PD1-R an verschiedene SH3-Domänen zeigt, dass diese im oberen nanomolaren Bereich an die Hck-SH3-Domäne binden. Damit gehören diese Interaktionen unter den affinsten bisher beschriebenen SH3:Peptid-Interaktionen. Typische SH3:Liganden-Interaktionen haben K_D -Werte im mikro- bis millimolaren Bereich (Viguera et al. 1994; Musacchio 2003). Da die gegen die Lck-SH3 selektierten Peptide eine sehr starke Bindung an die Hck-SH3-Domäne aufweisen, wurden die entsprechenden Komplexe ebenfalls strukturell charakterisiert. Die Charakterisierung der Interaktion von Hck-SH3 mit den PD-Peptiden erfolgte wie beim Lck-SH3:PD-Peptid-Komplex mittels NMR-Titrationsexperimente.

Wenn die Austauschrate zwischen freier und gebundener Zustand des Proteins „schnell“ ist im Vergleich zu der Differenz der chemischen Verschiebung zwischen den Resonanz-Frequenzen des beobachteten Kerns, so ist nur ein NMR-Signal zu beobachten. Dies war für die meisten Resonanzen des Lck-SH3:PD-Peptid-Komplexes der Fall. Sind die Austauschraten klein relativ zum Resonanz-Frequenzunterschied des freien und gebundenen Zustands der SH3-Domäne, so werden gleichzeitig Resonanzen für das freie Protein und für das gebundene Protein detektiert. Die Resonanzen zeigen „langsamen“ Austausch. Während der Titration nehmen die Signalintensitäten der Resonanzen des ungebundenen Proteins ab, wobei zugleich Signale für Resonanzen des gebundenen Proteins sichtbar werden. In der Regel zeigen Interaktionen mit einem K_D -Wert kleiner als 10 μM einen langsamen Austausch. Interaktionen mit einem K_D -Wert größer als 10 μM weisen einen intermediären bzw. schnellen Austausch auf (Zuiderweg et al. 2002).

Aufgrund des geringen K_D -Wertes für die Hck-SH3:Peptid-Komplexe ist ein langsamer Austausch für die Komplexe zu erwarten. Dies wurde durch die NMR-Messung bestätigt. Bei der Interaktion von Hck-SH3 mit PD1 weisen alle betroffenen Resonanzen einen langsamen Austausch auf (Abbildung 4-20). Beim Komplex Hck-SH3:PD1-R wurde dagegen für die Resonanzen eine Mischung aus langsamen und intermediären Austausch beobachtet (Abbildung 4-18). Auch das spiegeln die durch die Fluoreszenz-Titration ermittelten K_D -Werte wider. Der K_D -Wert für den Komplex Hck-SH3:PD1-R liegt bei 0,47 μM und für den Komplex Hck-SH3:PD1 bei 0,23 μM . Anhand der unterschiedlichen Kinetik dieser beiden Komplexe wird deutlich, dass die beiden Peptide unterschiedlich mit der Hck-SH3-Domäne interagieren, obwohl sie sich nur in einer Aminosäuren unterscheiden.

Die Ligandenbindungsregion der Hck-SH3 wurde von Horita et al. (1998) mit dem GAP-Peptid (GFPPLPPPPQLPTLG) mittels NMR-Titration bestimmt, das einen K_D -Wert zwischen 10 μM und 50 μM aufweist. Sie konnten zeigen, dass die Ligandenbindung Reste beeinflusste, die im RT-Loop, im n-Src-Loop und in der 3_{10} -Helix liegen. Für das Peptid PD1-R konnte in dieser Arbeit die bei der Bindung betroffenen Regionen auf der Hck-SH3 kartiert werden. Betrachtet man die bei der Bindung betroffenen Reste, so liegen die meisten Reste im RT-Loop (L86 – L97), im n-Src-Loop (L108), in der 3_{10} -Helix (Y132) sowie auch in den $\beta\text{-C}$ - (I128) und $\beta\text{-D}$ -Strängen (V133), die die 3_{10} -Helix flankieren und im Distal-Loop (L120 & L121) (Abbildung 4-19). Das PD1-R-Peptid scheint an die Hck-SH3-Domäne in gleicher Weise zu binden wie an die Lck-SH3-Domäne. Die Kartierung der Bindungsregion deutet darauf hin, dass PD1 mit Hck-SH3 interagiert wie das GAP-Peptid und typische, prolinreiche Liganden. Auch die Tatsache, dass die Reste, die langsamen Austausch aufweisen, im n-Src-Loop (E110 – E113)

liegen, unterstützt diese Vermutung, da u. a. der n-Src-Loop die Bindungsregion bildet. Die Kartierung der Hck-SH3-Bindungsfläche für das Peptid PD1 war anhand der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren nicht möglich. Alle Resonanzen zeigen langsamen Austausch, so dass der Weg von der freien zur gebundenen Position während der Titration nicht verfolgt werden konnte. Um die Resonanzen im Komplex zuordnen zu können, müssen weitere NMR-Experimente durchgeführt werden. Es ist aber zu erwarten, dass die Bindung von PD1 an die Hck-SH3 ähnliche Regionen wie bei der Bindung mit dem PD1-R-Peptid betreffen müsste.

Mittels des NMR-Titrationsexperimentes ist es möglich, die Bindungsregion eines Liganden an ein Protein zu bestimmen. Durch dieses Experiment können alle Aminosäurereste identifiziert werden, die durch die Bindung beeinflusst werden. Generell liegen die Aminosäuren, die eine starke Änderung bei Bindung zeigen, in der Bindungsregion. Doch nicht alle Aminosäurereste, die bei der Bindung betroffen sind, müssen zwangsläufig in der Bindungstasche liegen. Vermutlich trifft das im Fall des Hck-SH3:PD1-R-Komplexes auf die beiden Reste, die im Distal-Loop (und somit nicht in der Bindungstasche) liegen, zu. Eine Möglichkeit, nur Aminosäurereste zu detektieren, die in der Bindungsregion liegen, ist die Durchführung des „cross-saturation“ NMR-Experimentes (Takahashi et al. 2000). Dafür muss ein Interaktionspartner ^{15}N -isotopenmarkiert und deuteriert sein.

Es stellt sich die Frage, wieso das PD1-Peptid mit einem Tyrosin an der Ankerposition stärker an Hck-SH3 bindet als das Peptid PD1-R mit einem Arginin. Wie die anderen Src-Typ-Kinasen besitzt die Hck-SH3 einen Aspartatrest in der Kompass-Tasche (D96), die eine Ausbildung einer Salzbrücke mit einem basischen Rest ermöglicht. Es ist deshalb zu erwarten, dass Hck-SH3 eine höhere Affinität zu PD1-R zeigt, was nicht der Fall ist. Alle anderen getesteten SH3-Domänen (Lck, Fyn, Src, PI3K), die einen Aspartatrest an dieser Position enthalten, zeigen eine affinere Bindung an PD1-R als PD1 (Tabelle 4-3). Zu diesem Zeitpunkt ist es noch nicht möglich, diese Frage zu klären. Wahrscheinlich wird Tyrosin von der Hck-SH3 bevorzugt, da es evtl. besser in die Bindungstasche passt als Arginin. Eine exakte Aussage ist nur durch die Strukturbestimmung und der Vergleich beider Komplexe möglich.

5.7 Die Strukturbestimmung der SH3:PD-Komplexe ist möglich

Die Voraussetzung für die Strukturbestimmung eines Komplexes mittels NMR ist die Lebensdauer des Komplexes. Die Lebensdauer des gebundenen Zustandes der beiden

Interaktionspartner sollte lang genug sein, damit sich die intermolekularen NOEs detektieren lassen. Dabei ist die Dissoziationsrate (k_{off}) der maßgebliche Faktor. Je kleiner der k_{off} , desto langlebiger ist der Komplexzustand. Die Detektion von NOEs ist die Voraussetzung für die dreidimensionale Bestimmung einer Struktur, da anhand ihrer Signalintensitäten die Proton-Proton-Abstände und somit die Distanzinformationen ermittelt werden. In der Regel ist dies für Dissoziationskonstanten (K_D) im Bereich $10\ \mu\text{M}$ und kleiner der Fall (Zuiderweg 2002).

Beim Komplex Hck-SH3:PD1 mit einem geringen K_D -Wert von $0,2\ \mu\text{M}$ ist zu erwarten, dass dieser Komplex langlebig genug ist, so dass intermolekulare NOEs detektiert werden können. Die Dynamik des langsamen Austausches des Komplexes unterstützt diese Erwartungen. Das wurde durch die Aufnahme eines entsprechenden Filterexperiments bestätigt. Im Fall der Interaktion der Lck-SH3 mit dem Peptid PD1-R, die einen K_D -Wert von $23\ \mu\text{M}$ aufweist, ist nicht klar, ob die Detektion von intermolekularen NOEs möglich wäre. Die Kinetik des Komplexes bestehend aus schnellem und intermediärem Austausch lässt eher das Gegenteil vermuten. Schweimer et al. (2002) konnten für den Komplex Lck-SH3 mit dem Tip-Peptid mit einem K_D -Wert von $30\ \mu\text{M}$ keine intermolekularen NOEs detektieren. Ihrer Meinung nach war dies auf den schnellen Austausch des Komplexes zurückzuführen. Im Gegensatz dazu konnten in dieser Arbeit für den Komplex Lck-SH3 mit dem Peptid PD1-R genauso wie für den Hck-SH3:PD1-Komplex intermolekulare NOEs detektiert werden. Offensichtlich ist beim Komplex Lck-SH3 mit PD1-R die Dissoziationsrate klein genug, so dass der Komplexzustand der beiden Interaktionspartner lange genug existieren kann. Somit sind die Voraussetzungen für eine hochauflösende drei-dimensionale Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie für beide Komplexe Lck-SH3:PD1-R und Hck-SH3:PD1 erfüllt.

Komplexstrukturen von verschiedenen SH3-Domänen mit Peptid-Liganden sind sowohl mittels Röntgenkristallographie als auch mittels NMR-Spektroskopie bestimmt worden, u. a. für die SH3-Domänen von Abl (Musacchio et al. 1994; Pisabarro et al. 1998), Fyn (Musacchio et al. 1994; Morton et al. 1996; Renzoni et al. 1996) und Src (Feng et al. 1994; Feng et al. 1995) sowie BTK (Tzeng et al. 2000) und N-Grb2 (Goudreau et al. 1994; Wittekind et al. 1997). Doch bis heute gibt es noch keine Komplexstrukturen von Lck-SH3 oder Hck-SH3 in Verbindung mit einem Peptid-Liganden. Wie schon erwähnt, konnten Schweimer et al. (2002) für ihr Lck-SH3:Tip-Komplex keine intermolekularen NOEs detektieren. Im Fall der Hck-SH3 wurde nur die Lösungsstruktur der freien SH3-Domäne bestimmt, die Bindungsoberfläche für das GAP-Peptid kartiert und daraus ein Komplex-Modell erstellt (Horita et al. 1998). Wieso Horita und

seine Kollegen die Komplexstruktur nicht bestimmt hatten, lässt sich aus der Literatur nicht ableiten.

Auf der Grundlage der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse werden zurzeit im Rahmen zweier Doktorarbeiten die drei-dimensionale Struktur der Komplexe von Lck-SH3 mit PD1-R sowie Hck-SH3 mit PD1 bestimmt. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Peptide, wie schon vermutet, in der Klasse-I-Orientierung an die SH3-Domänen binden.

5.8 HIV-1-Nef interagiert mit den SH3-Domänen von Lck und Hck

Das Protein HIV-1-Nef enthält in seiner Sequenz einen prolinreichen Abschnitt (P72xxP75), der Ähnlichkeiten mit dem Konsensus xPxxP-Motiv von SH3-Liganden aufweist. Infolgedessen wurden Interaktionen von HIV-1-Nef an SH3-Domänen oder an Proteinen, die eine SH3-Domäne besitzen, mehrfach nachgewiesen. Zu diesen Interaktionspartnern zählen die Hck (Lee et al. 1995; Saksela et al. 1995; Lee et al. 1996; Baur et al. 1997; Briggs et al. 1997; Moarefi et al. 1997; Dutartre et al. 1998; Cheng et al. 1999; Foti et al. 1999; Greenway et al. 1999), Lyn, (Lee et al. 1995; Cheng et al. 1999), Fyn (Lee et al. 1995; Arold et al. 1997; Arold et al. 1998; Cheng et al. 1999), Lck (Greenway et al. 1995; Harris 1995; Collette et al. 1996; Greenway et al. 1996; Baur et al. 1997; Dutartre et al. 1998; Greenway et al. 1999) und Src (Lang et al. 1997). Am besten untersucht ist die Wechselwirkung von Nef mit der Hck-SH3. Es ist beschrieben, dass die Bindung von Nef an Hck-SH3 eine Aktivierung von Hck sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bewirkt (Moarefi et al. 1997, Briggs et al. 1997, Greenway et al. 1999, Briggs et al. 2000). Im Gegensatz zu der eindeutigen Bindung von Nef an Hck-SH3 gibt es im Fall der Lck widersprüchliche Beobachtungen. Greenway et al. (1996) und Collette et al. (1996) berichteten von einer direkten Bindung von Nef an Lck-SH3 über ihr xPxxP-Motiv. Außerdem wurden von Collette et al. (1996) und Dutartre et al. (1998) eine Nef-Bindung an die Lck-SH2-Domäne und eine Phosphorylierung von Nef nachgewiesen. Baur und seine Kollegen (1997) aber beschrieben, dass Nef über seine aminoterminalen α -Helix an Lck bindet. Sie vermuteten aber, dass zusätzliche, über das xPxxP-Motiv vermittelte Interaktionen, vorhanden sein könnten. Eine andere Gruppe berichtete, dass die Kern-Region von Nef und nicht das xPxxP-Motiv für die Nef:Lck-Interaktion wichtig sei (Cheng et al. 1998). Saksela et al. (1995) und Briggs et al. (2000) konnten keine Interaktion von Nef an die Lck nachweisen. Arold et al. (1998) konnten mittels Isothermaler-Titrations-Kalorimetrie einen K_D -Wert von 10,6 μ M für die Interaktion von Lck-SH3 mit dem aminoterminal-deletierten Nef _{Δ 1-57} bestimmen. Im Gegensatz zu der Aktivierung

von Hck scheint das Nef-Protein eine inhibierende Wirkung auf Lck zu haben (Collette et al. 1996, Greenway et al. 1996, Greenway et al. 1999).

Um im Fall der Hck-SH3 die Interaktion mit Nef zu bestätigen und im Fall der Lck-SH3 die Bindung zu überprüfen, wurden NMR-Titrations von unmarkiertem Nef zu ^{15}N -markiertem Hck-SH3 bzw. Lck-SH3 durchgeführt. Für beide SH3-Domänen konnten bei Nef-Zugabe eine Verringerung der Intensitäten der meisten Resonanzen und ein Verbreitern der verbleibenden Resonanzen beobachtet werden. Die Intensitätsverringerung und die Verbreiterung der Lck-SH3- sowie Hck-SH3-Resonanzen bei Nef-Bindung könnte auf die Bindungskinetik der Interaktion zwischen Nef und den SH3-Domänen zurückzuführen sein, die ungünstig für die NMR-Untersuchung ist. Auf jeden Fall weist der offensichtliche Effekt der zunehmenden Nef-Konzentration auf das HSQC-Spektrum der Lck-SH3 und Hck-SH3 auf eine Interaktion dieser SH3-Domänen mit dem rekombinanten Nef-Protein hin.

5.8.1 PD1 und PD1-R verdrängen HIV-1-Nef aus bestehenden Lck-SH3:Nef- und Hck-SH3:Nef-Komplexen

Die Bindung von Nef an die Hck-SH3 bewirkt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Aktivierung der Hck (Moarefi et al. 1997, Briggs et al. 1997, Greenway et al. 1999, Briggs et al. 2000, Choi et al. 2004). Die drei-dimensionale Struktur des Hck-Proteins (Sicher et al. 1997) und des Src-Proteins (Xu et al. 1997) geben einen Einblick in diesen Aktivierungsmechanismus. Die Kristallstrukturen zeigen, dass die Linkerregion zwischen der SH2-Domäne und der Kinase-Domäne eine PPII-Helixstruktur ausbildet und sich an die SH3-Domäne anlagert, so dass eine „geschlossene“ Struktur entsteht. Es wird vermutet, dass diese Struktur den inaktiven Status der Kinasen darstellt. Es ist wahrscheinlich, dass durch die Bindung von Nef an die Hck-SH3-Domäne die Linkerregion verdrängt wird, und dadurch die Kinase in den aktiven Status versetzt wird (Abbildung 5-4).

Da die Expression von Hck auf myeloiden Zellen (u. a. Monocyten und Macrophagen) beschränkt ist, ist die Rolle der Hck-Aktivierung durch Nef noch nicht ganz geklärt. Da die HIV-Replikation überwiegend in CD4^+ -T-Zellen stattfindet, und die Reduktion der CD4^+ -T-Zellen ein wichtiger Aspekt in der Entwicklung von AIDS ist, wurde vermutet, dass die Nef:Hck-Interaktion indirekt die HIV-Infektion in den T-Zellen fördert (Briggs et al. 2000). Die Aktivierung von Hck könnte die Ursache für die Verlängerung der Lebenszeit von HIV-infizierten Makrophagen sein. Diese langlebigen HIV-infizierten Makrophagen könnten eine

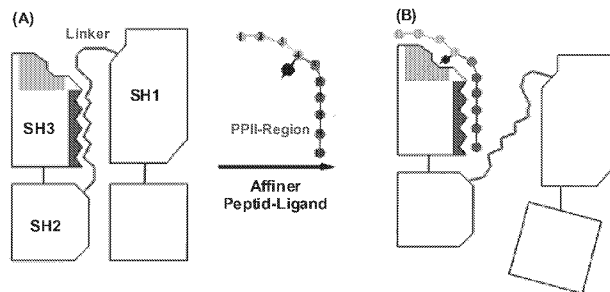


Abbildung 5-4: Modell für die spezifische Kontrolle von SH3-vermittelte Signaltransduktion (modifiziert nach Pisabarro et al. 1998).

(A) Schematische Darstellung der Tyrosin-Kinase. In der geschlossenen oder inaktiven Form ist die SH2-Kinase-Linkerregion (rot) an die SH3-Domäne gebunden. (B) Ein affiner Ligand kann diese Bindung verdrängen und so die Kinase aktivieren (offene Form).

wichtige Rolle bei der Verbreitung des Virus auf ruhende T-Zellen spielen, da sie gleichzeitig ein aktivierendes Signal und den infektiösen Virus liefert (Renkema et al. 2000). Weiterhin könnte eine *Hck*-Stimulierung durch *Nef* eine chronische Aktivierung der infizierten myeloiden Zellen hervorrufen, was wiederum den anormalen Aktivierungsstatus des Immunsystems bewirkt, was auch ein bedeutender Aspekt der AIDS-Pathogenese kennzeichnet (Saksela 2004). Hanna et al. (2001) konnten zeigen, dass die Entwicklung der AIDS-Krankheit in *hck*-Knockout-Mäusen verzögert wurde.

Trotz der strukturellen und funktionellen Homologien von *Src*-Typ Kinasen ist der bisher in der Literatur beschriebene Einfluss der *Nef*-Bindung auf die *Lck* anders als auf die *Hck*. *Nef* hat bei Bindung an *Lck* eine inhibierende Wirkung auf ihre Kinaseaktivität (Collette et al. 1996, Greenway et al. 1996, Greenway et al. 1999). Da *Lck* hauptsächlich in T-Zellen lokalisiert und an der Signaltransduktion beteiligt ist, ist die Inhibition möglicherweise für die Funktionsstörung der infizierten T-Zellen verantwortlich. Weiterhin wurde von Yousefi et al. (2003) gezeigt, dass die Herabregulierung der *Lck*-Aktivität *in vivo* eine Erhöhung der HIV-Replikation bewirkte. Ihrer Meinung nach deuten die Daten darauf hin, dass die Assoziation von *Nef* mit *Lck* eine zentrale Rolle in der Erhöhung der HIV-Replikation spielt. Weiterhin wurde vermutet, dass die Bindung von *Nef* an *Lck* *in vivo* die CD4:*Lck*-Interaktion unterbricht, so dass CD4 anschließend von der Zelloberfläche internalisiert werden kann (Marsh 1999).

Aufgrund der Bedeutung der *Nef*:SH3-Interaktionen könnten Moleküle, die diese Interaktionen blockieren würden, als therapeutische Agenzien eingesetzt werden. Deshalb war es interessant, zu untersuchen, ob die PD-Peptide das *Nef*-Protein von den SH3-Domänen der *Hck* und *Lck*

verdrängen kann. Tatsächlich konnte im verwendeten *in vitro*-System eine Verdrängung des rekombinanten Nef von Lck-SH3 durch das Peptid PD1-R und von der Hck-SH3 durch das PD1-Peptid nachgewiesen werden (Abbildung 4-24 & 4-25).

Der K_D -Wert für die Interaktion des Wildtyp-Nef-Proteins mit der Hck-SH3 ist mit $0,25 \mu\text{M}$ (Lee et al. 1995) und $0,6 \mu\text{M}$ (Arold et al. 1998) als eines der affinsten SH3:Ligand-Interaktion beschrieben. Dieser Wert liegt im ähnlichen Größenbereich wie der in dieser Arbeit bestimmte K_D -Wert für den Komplex Hck-SH3:PD1. Um eine Aussage darüber machen zu können, wie das Bindungsverhältnis dieser beiden Bindungspartner an die Hck-SH3 im Vergleich zueinander ist, wurden NMR-Kompetitionsexperimente durchgeführt und der K_D -Wert bestimmt. Bei Vorgabe des K_D -Wertes von $0,23 \mu\text{M}$ für die Hck-SH3:PD1-Interaktion wurde in diesem Fall ein K_D -Wert von ca. $0,64 \mu\text{M}$ für die Nef:Hck-SH3-Bindung bestimmt (Kapitel 4.9.7). $416 \mu\text{M}$ Nef wird mit einem IC_{50} von $164 \mu\text{M}$ PD1 verdrängt. Somit scheint das selektierte Peptid PD1 um den Faktor von mehr als zwei stärker an die SH3-Domäne von Hck zu binden als das rekombinante, Wildtyp-HIV-1-Nef-Protein.

Aufgrund der hohen Affinität der Hck-SH3:Nef-Wechselwirkung wurde vermutet, dass zusätzlich zum xPxxP-Motiv noch andere Elemente für diese starke Bindung verantwortlich sind. Dies wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass Peptide, die dem xPxxP-Motiv von Nef entsprachen, viel schwächer an SH3-Domänen binden als das Wildtyp-Nef (Lee et al. 1995, Greenway et al. 1996). Tatsächlich zeigt die Komplexstruktur der Nef-Kerndomäne mit der SH3-Domäne von FynR96I (Lee et al. 1996) und von Wildtyp Fyn (Arold et al. 1997) zusätzlich zur xPxxP-Interaktion eine hydrophobe Tasche auf der Oberfläche von Nef, die in die SH3-Bindung involviert ist. Das PD1-Peptid scheint, bezogen auf die klassische Bindungsregion von SH3-Liganden, viel affiner an die Hck-SH3 zu binden als Nef, da es in der Lage ist, das im Verhältnis große Nef-Protein zu verdrängen, obwohl diese noch zusätzliche Interaktionen mit der Hck-SH3 aufweist.

Eine Inhibition der Bindung von Nef mit zellulären Proteinen kann als erster Ansatzpunkt für die Entwicklung von neuen und innovativen anti-AIDS-Medikamenten dienen. Ein erster Schritt dafür wurde in dieser Arbeit getan. Natürlich müssen weitere Untersuchungen folgen, um eine Aussage machen zu können, wie sich die Verdrängung von Nef und somit die Bindung der PD-Peptide an die Lck-SH3 und Hck-SH3 *in vivo* auswirkt.

5.9 Ausblick

Mittels Substitutionsanalyse konnte gezeigt werden, dass für das Peptid PD1-R an der Position P₆ ein Histidin essentiell für eine Lck-SH3-Interaktion ist. Das Histidin an P₆ liegt außerhalb der Kernbindungsregion prolinreicher Liganden. Anhand des NMR-Filterexperimentes konnte gezeigt werden, dass eine Strukturbestimmung des Lck-SH3:PD1-R-Komplexes möglich ist. Die Aufklärung der Komplexstruktur würde Aufschluss darüber geben, wo und wie dieses Histidin mit der SH3-Domäne der Lck wechselwirkt. Ein Vergleich der Lck-SH3:PD1-R-Komplexstruktur mit der von Hck-SH3 mit dem Peptid PD1, für deren Aufklärung die Voraussetzungen in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden konnten, würde z.B. einen Einblick geben können, inwieweit dieses Histidin eine Spezifitäts-Determinante für die Lck-SH3 darstellt.

Da die Regulationsmechanismen für die Protein-Tyrosin-Kinasen noch nicht ganz verstanden sind, ist die Wirkung der Interaktion der PD-Peptide mit der Lck-SH3 und der Hck-SH3 in Bezug auf die Kinaseaktivität (aktivierend/ inhibierend) nicht geklärt. Eine Bestimmung der Kinaseaktivität *in vitro* und *in vivo* bei Zugabe der PD-Peptide könnte Aufschluss darüber geben. In dieser Arbeit konnte *in vitro* eine Verdrängung des rekombinanten HIV-1-Nef-Proteins von der Lck-SH3 und Hck-SH3 durch die PD-Peptide gezeigt werden. Es wäre deshalb sinnvoll, die Untersuchungen der Kinaseaktivität in Anwesenheit der PD-Peptide und HIV-1-Nef durchzuführen, um die Wirkungen beider Interaktionspartner auf die Kinasen vergleichen zu können.

Durch die Substitutionsanalyse konnten Peptide gefunden werden, die zumindest bei dieser qualitativen Methode bessere Bindungseigenschaften als das Peptid PD1-R aufweisen. Als Konsequenz daraus müsste das Peptid mit der Sequenz **HFRRPLPRLPSL** (fett: Änderungen zu PD1-R) sehr affin an Lck-SH3 binden. Dieses müsste durch Bindungsstudien, die quantitativ genaue Daten liefern, bestätigt werden.

Die Phagendisplay-Selektion gegen die Lck-SH3 erzielt Peptid-Liganden, die auch an andere SH3-Domänen gut binden. Durch eine Optimierung der Selektionsbedingungen könnte die Spezifität der Liganden in Bezug auf die Lck-SH3 möglicherweise erhöht werden. Denkbar wäre eine Selektion in Gegenwart von anderen SH3-Domänen, die unspezifische Peptid-Liganden entweder schon vor der Inkubation oder während den Waschschritten abfangen, so dass nur noch für die Lck-SH3-Domäne spezifische Liganden übrig bleiben. Eine andere Möglichkeit wäre eine Selektion in Anwesenheit von affinen Lck-SH3-Liganden, so dass nur noch Peptid-Liganden selektiert werden, die in der Lage sind, die affinen Lck-SH3-Liganden zu verdrängen. Die Kombination beider Möglichkeiten könnte dazu führen, dass sowohl affine als auch

spezifische Lck-SH3-Liganden selektiert werden können. Mittlerweile wurden solche Studien schon in unserem Labor durchgeführt. Die ersten Daten deuten darauf hin, dass bei Einsatz von Kompetitoren tatsächlich spezifischere Liganden gefunden werden konnten. Derzeit wird die Bindung dieser Liganden an die SH3-Domänen näher charakterisiert.

6 Literatur

- Agrawal, V. und K. V. Kishan (2002). "Promiscuous binding nature of SH3 domains to their target proteins." *Protein Pept. Lett.* 9(3): 185-93.
- Aiken, C. und D. Trono (1995). "Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis." *J. Virol.* 69(8): 5048-56.
- Albrecht, J. C., U. Friedrich, C. Kardinal, J. Koehn, B. Fleckenstein, S. M. Feller und B. Biesinger (1999). "Herpesvirus ateles gene product Tio interacts with nonreceptor protein tyrosine kinases." *J. Virol.* 73(6): 4631-9.
- Amrein, K. E., N. Flint, B. Panholzer und P. Burn (1992). "Ras GTPase-activating protein: a substrate and a potential binding protein of the protein-tyrosine kinase p56lck." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(8): 3343-6.
- Arold, S., P. Franken, M. P. Strub, F. Hoh, S. Benichou, R. Benarous und C. Dumas (1997). "The crystal structure of HIV-1 Nef protein bound to the Fyn kinase SH3 domain suggests a role for this complex in altered T cell receptor signaling." *Structure* 5(10): 1361-72.
- Arold, S., R. O'Brien, P. Franken, M. P. Strub, F. Hoh, C. Dumas und J. E. Ladbury (1998). "RT loop flexibility enhances the specificity of Src family SH3 domains for HIV-1 Nef." *Biochemistry* 37(42): 14683-91.
- Arold, S. T. und A. S. Baur (2001). "Dynamic Nef and Nef dynamics: how structure could explain the complex activities of this small HIV protein." *Trends Biochem. Sci.* 26(6): 356-63.
- August, A. und B. Dupont (1996). "Association between mitogen-activated protein kinase and the zeta chain of the T cell receptor (TcR) with the SH2,3 domain of p56lck. Differential regulation by TcR cross-linking." *J. Biol. Chem.* 271(17): 10054-9.
- Baur, A. S., G. Sass, B. Laffert, D. Willbold, C. Cheng Mayer und B. M. Peterlin (1997). "The N-terminus of Nef from HIV-1/SIV associates with a protein complex containing Lck and a serine kinase." *Immunity* 6(3): 283-91.
- Baur, A. S., E. T. Sawai, P. Dazin, W. J. Fantl, C. Cheng Mayer und B. M. Peterlin (1994). "HIV-1 Nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization." *Immunity* 1(5): 373-84.
- Bell, G. M., J. Fargnoli, J. B. Bolen, L. Kish und J. B. Imboden (1996). "The SH3 domain of p56lck binds to proline-rich sequences in the cytoplasmic domain of CD2." *J. Exp. Med.* 183(1): 169-78.
- Benson, R. E., A. Sanfridson, J. S. Ottinger, C. Doyle und B. R. Cullen (1993). "Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection." *J. Exp. Med.* 177(6): 1561-6.
- Biesinger, B., A. Y. Tsygankov, H. Fickenscher, F. Emmrich, B. Fleckenstein, J. B. Bolen und B. M. Broker (1995). "The product of the Herpesvirus saimiri open reading frame 1 (tip) interacts with T cell-specific kinase p56lck in transformed cells." *J. Biol. Chem.* 270(9): 4729-34.

- Brannetti, B., A. Via, G. Cestra, G. Cesareni und M. H. Citterich** (2000). "SH3-SPOT: an algorithm to predict preferred ligands to different members of the SH3 gene family." *J. Mol. Biol.* 298(2): 313-28.
- Briese, L., S. Hoffmann, U. Friedrich, B. Biesinger und D. Willbold** (2001). "Sequence-specific ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments of lymphocyte specific kinase unique and SH3 domains." *J. Biomol. NMR*. 19(2): 193-4.
- Briese, L.** (2002). "Strukturelle Untersuchungen der Lck-Domänen unique und SH3 und ihre Wechselwirkungen mit zellulären und viralen Proteinen." *Doktorarbeit*.
- Briese, L. und D. Willbold** (2003). "Structure determination of human Lck unique and SH3 domains by nuclear magnetic resonance spectroscopy." *BMC Struct. Biol.* 3(1): 3.
- Briggs, S. D., E. C. Lerner und T. E. Smithgall** (2000). "Affinity of Src family kinase SH3 domains for HIV Nef in vitro does not predict kinase activation by Nef in vivo." *Biochemistry* 39(3): 489-95.
- Briggs, S. D., M. Sharkey, M. Stevenson und T. E. Smithgall** (1997). "SH3-mediated Hck tyrosine kinase activation and fibroblast transformation by the Nef protein of HIV-1." *J. Biol. Chem.* 272(29): 17899-902.
- Cestra, G., L. Castagnoli, L. Dente, O. Minenkova, A. Petrelli, N. Migone, U. Hoffmuller, J. Schneider-Mergener und G. Cesareni** (1999). "The SH3 domains of endophilin and amphiphysin bind to the proline-rich region of synaptojanin 1 at distinct sites that display an unconventional binding specificity." *J. Biol. Chem.* 274(45): 32001-7.
- Cheadle, C., Y. Ivashchenko, V. South, G. H. Searfoss, S. French, R. Howk, G. A. Ricca und M. Jaye** (1994). "Identification of a Src SH3 domain binding motif by screening a random phage display library." *J. Biol. Chem.* 269(39): 24034-9.
- Cheng, H., J. P. Hoxie und W. P. Parks** (1999). "The conserved core of human immunodeficiency virus type 1 Nef is essential for association with Lck and for enhanced viral replication in T-lymphocytes." *Virology* 264(1): 5-15.
- Choi, H. J. und T. E. Smithgall** (2004). "Conserved residues in the HIV-1 Nef hydrophobic pocket are essential for recruitment and activation of the Hck tyrosine kinase." *J. Mol. Biol.* 343(5): 1255-68.
- Cicchetti, P., B. J. Mayer, G. Thiel und D. Baltimore** (1992). "Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho." *Science* 257(5071): 803-6.
- Collette, Y., H. Dutartre, A. Benziane, Ramos-Morales, R. Benarous, M. Harris und D. Olive** (1996). "Physical and functional interaction of Nef with Lck. HIV-1 Nef-induced T-cell signaling defects." *J. Biol. Chem.* 271(11): 6333-41.
- Couture, C., M. Deckert, S. Williams, F. O. Russo, A. Altman und T. Mustelin** (1996). "Identification of the site in the Syk protein tyrosine kinase that binds the SH2 domain of Lck." *J. Biol. Chem.* 271(39): 24294-9.
- Dalgarno, D. C., M. C. Botfield und R. J. Rickles** (1997). "SH3 domains and drug design: ligands, structure, and biological function." *Biopolymers* 43(5): 383-400.
- Daniel, M. D., F. Kirchhoff, S. C. Czajak, P. K. Sehgal und R. C. Desrosiers** (1992). "Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene [see comments]." *Science* 258(5090): 1938-41.

- Deacon, N. J., A. Tsykin, A. Solomon, K. Smith, M. Ludford Menting, D. J. Hooker, D. A. McPhee, A. L. Greenway, A. Ellett, C. Chatfield und et al. (1995). "Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients [see comments]." *Science* 270(5238): 988-91.
- Dechwer, W., D. A. Pühler und R. D. Schmid (1999). "Römpf Lexikon Biotechnologie und Gentechnik." *Thieme Verlag, Stuttgart, New York* 2. Auflage.
- Delaglio, F., S. Gresziek, G. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer und A. Bax (1995). "NMRPipe: a multidimensional spectral processing program based on UNIX pipes." *J. Biol. NMR* 6: 277-293.
- Dutartre, H., M. Harris, D. Olive und Y. Collette (1998). "The human immunodeficiency virus type 1 Nef protein binds the Src-related tyrosine kinase Lck SH2 domain through a novel phosphotyrosine independent mechanism." *Virology* 247(2): 200-11.
- Eck, M. J., S. K. Atwell, S. E. Shoelson und S. C. Harrison (1994). "Structure of the regulatory domains of the Src-family tyrosine kinase Lck." *Nature* 368(6473): 764-9.
- Emili, A. Q. und G. Cagney (2000). "Large-scale functional analysis using peptide or protein arrays." *Nat. Biotechnol.* 18(4): 393-7.
- Feng, S., J. K. Chen, H. Yu, J. A. Simon und S. L. Schreiber (1994). "Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions." *Science* 266(5188): 1241-7.
- Feng, S., C. Kasahara, R. J. Rickles und S. L. Schreiber (1995). "Specific interactions outside the proline-rich core of two classes of Src homology 3 ligands." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(26): 12408-15.
- Foti, M., L. Cartier, V. Piguet, D. P. Lew, J. L. Carpentier, D. Trono und K. H. Krause (1999). "The HIV Nef protein alters Ca(2+) signaling in myelomonocytic cells through SH3-mediated protein-protein interactions." *J. Biol. Chem.* 274(49): 34765-72.
- Frank, R. und H. Overwin (1996). "SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes." *Meth. Mol. Biol.* 66: :149-69.
- Frankel, A. D. und J. A. Young (1998). "HIV-1: fifteen proteins and an RNA." *Ann. Rev. Biochem.* 67: 1-25.
- Fumagalli, S., N. F. Totty, J. J. Hsuan und S. A. Courtneidge (1994). "A target for Src in mitosis." *Nature* 368(6474): 871-4.
- Fusaki, N., A. Iwamatsu, M. Iwashima und F. Ji (1997). "Interaction between Sam68 and Src family tyrosine kinases, Fyn and Lck, in T cell receptor signaling." *J. Biol. Chem.* 272(10): 6214-9.
- Garcia, J. V. und A. D. Miller (1992). "Downregulation of cell surface CD4 by nef." *Res. Virol.* 143(1): 52-5.
- Geyer, M., O. T. Fackler und B. M. Peterlin (2001). "Structure-function relationships in HIV-1 Nef." *EMBO.* 2(7): 580-5.
- Gill, S. C. und P. H. von Hippel (1989). "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data." *Anal. Biochem.* 182: 319-326.
- Glaichenhaus, N., N. Shastri, D. R. Littman und J. M. Turner (1991). "Requirement for association of p56lck with CD4 in antigen-specific signal transduction in T cells." *Cell.* 64(3): 511-20.

- Goldsmith, M. A., M. T. Warmerdam, R. E. Atchison, M. D. Miller und W. C. Greene (1995). "Dissociation of the CD4 downregulation and viral infectivity enhancement functions of human immunodeficiency virus type 1 Nef." *J. Virol.* 69(7): 4112-21.
- Gorlach, M., M. Wittekind, R. A. Beckman, L. Mueller und G. Dreyfuss (1992). "Interaction of the RNA-binding domain of the hnRNP C proteins with RNA." *EMBO J.* 11(9): 3289-95.
- Goudreau, N., F. Cornille, M. Duchesne, F. Parker, B. Tocque, C. Garbay und B. P. Roques (1994). "NMR structure of the N-terminal SH3 domain of GRB2 and its complex with a proline-rich peptide from Sos." *Nat. Struct. Biol.* 1(12): 898-907.
- Greenway, A., A. Azad und D. McPhee (1995). "Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein inhibits activation pathways in peripheral blood mononuclear cells and T-cell lines." *J. Virol.* 69(3): 1842-50.
- Greenway, A., A. Azad, J. Mills und D. McPhee (1996). "Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds directly to Lck and mitogen-activated protein kinase, inhibiting kinase activity." *J. Virol.* 70(10): 6701-8.
- Greenway, A. L., H. Dutartre, K. Allen, D. A. McPhee, D. Olive und Y. Collette (1999). "Simian immunodeficiency virus and human immunodeficiency virus type 1 nef proteins show distinct patterns and mechanisms of Src kinase activation." *Journal of virology* 73(7): 6152-8.
- Grodberg, J. und J. J. Dunn (1988). "ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification." *J. Bacteriol.* 170: 1245-1253.
- Grzesiek, S., A. Bax, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, J. S. Hu, J. Kaufman, I. Palmer, S. J. Stahl und P. T. Wingfield (1996). "The solution structure of HIV-1 Nef reveals an unexpected fold and permits delineation of the binding surface for the SH3 domain of Hck tyrosine protein kinase." *Nat. Struct. Biol.* 3(4): 340-5.
- Grzesiek, S., A. Bax, J. S. Hu, J. Kaufman, I. Palmer, S. J. Stahl, N. Tjandra und P. T. Wingfield (1997). "Refined solution structure and backbone dynamics of HIV-1 Nef." *Protein Sci.* 6: 1248-1263.
- Hanada, T., L. Lin, K. G. Chandy, S. S. Oh und A. H. Chishti (1997). "Human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor binds to p56lck tyrosine kinase and Shaker type Kv1.3 potassium channel in T lymphocytes." *J. Biol. Chem.* 272(43): 26899-904.
- Hane, M., B. Lowin, M. Peitsch, K. Becker und J. Tschopp (1995). "Interaction of peptides derived from the Fas ligand with the Fyn-SH3 domain." *FEBS Lett.* 373(3): 265-8.
- Hardie, G. und S. Hanks (1995). "The Protein Kinase." *Academic Press*.
- Harris, M. (1995). "The role of myristoylation in the interactions between human immunodeficiency virus type I Nef and cellular proteins." *Biochem. Soc. Trans.* 23(3): 557-61.
- Hatakeyama, M., T. Kono, N. Kobayashi, A. Kawahara, S. D. Levin, R. M. Perlmutter und T. Taniguchi (1991). "Interaction of the IL-2 receptor with the src-family kinase p56lck: identification of novel intermolecular association." *Science* 252(5012): 1523-8.
- Hawash, I. Y., K. P. Kesavan, A. I. Magee, R. L. Geahlen und M. L. Harrison (2002). "The Lck SH3 domain negatively regulates localization to lipid rafts through an interaction with c-Cbl." *J Biol Chem* 277(7): 5683-91.
- Hiroaki, H., W. Klaus und H. Senn (1996). "Determination of the solution structure of the SH3 domain of human p56 Lck tyrosine kinase." *J. Biomol. NMR* 8(2): 105-22.

- Holdorf, A. D., J. M. Green, S. D. Levin, M. F. Denny, D. B. Straus, V. Link, P. S. Changelian, P. M. Allen und A. S. Shaw (1999). "Proline residues in CD28 and the Src homology (SH)3 domain of Lck are required for T cell costimulation." *J. Exp. Med.* 190(3): 375-84.
- Horita, D. A., D. M. Baldissieri, W. Zhang, A. S. Altieri, T. E. Smithgall, W. H. Gmeiner und R. A. Byrd (1998). "Solution structure of the human Hck SH3 domain and identification of its ligand binding site." *J. Mol. Biol.* 278(1): 253-65.
- Huse, M., M. J. Eck und S. C. Harrison (1998). "A Zn^{2+} ion links the cytoplasmic tail of CD4 and the N-terminal region of Lck." *J. Biol. Chem.* 273(30): 18729-33.
- Iafrate, A. J., S. Bronson und J. Skowronski (1997). "Separable functions of Nef disrupt two aspects of T cell receptor machinery: CD4 expression and CD3 signaling." *EMBO J.* 16(4): 673-84.
- Isakov, N. (1998). "Role of immunoreceptor tyrosine-based activation motif in signal transduction from antigen and Fc receptors." *Adv. Immunol.* 69: 183-247.
- Janeway, C. A. und P. Travers (1995). Immunologie. Heidelberg, *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*.
- Jessee, J. (1986). "New subcloning efficiency competent cells: 106 transformants/ μ g." *Focus* 8/4: 9-10.
- Johnson, B. A. und R. A. Blevins (1994). "NMRView: A computer program for the visualization and analysis of NMR data." *J. Biomol. NMR* 4: 603-614.
- June, C. H., M. C. Fletcher, J. A. Ledbetter und L. E. Samelson (1990). "Increases in tyrosine phosphorylation are detectable before phospholipase C activation after T cell receptor stimulation." *J. Immunol.* 144(5): 1591-9.
- Keane, M. M., O. M. Rivero-Lezcano, J. A. Mitchell, K. C. Robbins und S. Lipkowitz (1995). "Cloning and characterization of cbl-b: a SH3 binding protein with homology to the c-cbl proto-oncogene." *Oncogene* 10(12): 2367-77.
- Kelly, M. A., B. W. Chellgren, A. L. Rucker, J. M. Troutman, M. G. Fried, A. F. Miller und T. P. Creamer (2001). "Host-guest study of left-handed polyproline II helix formation." *Biochemistry* 40(48): 14376-83.
- Kestler, H. W. d., D. J. Ringler, K. Mori, D. L. Panicali, P. K. Sehgal, M. D. Daniel und R. C. Desrosiers (1991). "Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS." *Cell* 65(4): 651-62.
- Kim, P. W., Z. Y. Sun, S. C. Blacklow, G. Wagner und M. J. Eck (2003). "A zinc clasp structure tethers Lck to T cell coreceptors CD4 and CD8." *Science* 301(5640): 1725-8.
- Kirchhoff, F., T. C. Greenough, D. B. Brettler, J. L. Sullivan und R. C. Desrosiers (1995). "Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection [see comments]." *N. Engl. J. Med.* 332(4): 228-32.
- Korth, C., B. Stierli, P. Streit, M. Moser, O. Schaller, R. Fischer, W. Schulz-Schaeffer, H. Kretzschmar, A. Raeber, U. Braun, et al. (1997). "Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody." *Nature* 390(6655): 74-7.
- Krauss, G. (1997). "Biochemie der Regulation und Signaltransduktion", *WILEY-VCH*.
- Kuriyan, J. und D. Cowburn (1997). "Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling." *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26: 259-88.

- Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227: 680-685.
- Lang, S. M., A. J. Iafrate, C. Stahl-Hennig, E. M. Kuhn, T. Nisslein, F. J. Kaup, M. Haupt, G. Hunsmann, J. Skowronski und F. Kirchhoff** (1997). "Association of simian immunodeficiency virus Nef with cellular serine/threonine kinases is dispensable for the development of AIDS in rhesus macaques." *Nature Med.* 3(8): 860-5.
- Lawrence, D. S. und J. Niu** (1998). "Protein kinase inhibitors: the tyrosine-specific protein kinases." *Pharmacol Ther* 77(2): 81-114.
- Lee, C. H., B. Leung, M. A. Lemmon, J. Zheng, D. Cowburn, J. Kuriyan und K. Saksela** (1995). "A single amino acid in the SH3 domain of Hck determines its high affinity and specificity in binding to HIV-1 Nef protein." *EMBO J.* 14(20): 5006-15.
- Lee, C. H., K. Saksela, U. A. Mirza, B. T. Chait und J. Kuriyan** (1996). "Crystal structure of the conserved core of HIV-1 Nef complexed with a Src family SH3 domain." *Cell* 85(6): 931-42.
- Lemaster, D. M.** (1994). "Isotope labeling in solution protein assignment and structural analysis." *Progr. NMR Spectr.* 26: 371-419.
- Lim, W. A., F. M. Richards und R. O. Fox** (1994). "Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains." *Nature* 372(6504): 375-9.
- Lin, R. S., C. Rodriguez, A. Veillette und H. F. Lodish** (1998). "Zinc is essential for binding of p56(lck) to CD4 and CD8alpha." *J. Biol. Chem.* 273(49): 32878-82.
- Li-Weber, M., M. Giaisi, S. Baumann, K. Palfi und P. H. Krammer** (2004). "NF-kappa B synergizes with NF-AT and NF-IL6 in activation of the IL-4 gene in T cells." *Eur. J Immunol.* 34(4): 1111-8.
- Lottspeich, F. und H. Zorbas** (1998). "Bioanalytik." *Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg - Berlin.*
- Luciw, P. A., C. Cheng Mayer und J. A. Levy** (1987). "Mutational analysis of the human immunodeficiency virus: the orf-B region down-regulates virus replication." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84(5): 1434-8.
- Luria, S., I. Chambers und P. Berg** (1991). "Expression of the type 1 human immunodeficiency virus Nef protein in T cells prevents antigen receptor-mediated induction of interleukin 2 mRNA." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88(12): 5326-30.
- Macdonald, A., K. Crowder, A. Street, C. McCormick und M. Harris** (2004). "The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity." *J. Gen. Virol.* 85(Pt 3): 721-9.
- Manning, M. C. und R. W. Woody** (1991). "Theoretical CD studies of polypeptide helices: examination of important electronic and geometric factors." *Biopolymers* 31(5): 569-86.
- Marsh, J. W.** (1999). "The numerous effector functions of Nef." *Arch. Biochem. Biophys.* 365(2): 192-8.
- Miller, M. D., M. T. Warmerdam, I. Gaston, W. C. Greene und M. B. Feinberg** (1994). "The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages." *J. Exp. Med.* 179(1): 101-13.

- Miller, M. D., M. T. Warmerdam, K. A. Page, M. B. Feinberg und W. C. Greene (1995). "Expression of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nef gene during HIV-1 production increases progeny particle infectivity independently of gp160 or viral entry." *J. Virol.* 69(1): 579-84.
- Moarefi, I., M. LaFevre Bernt, F. Sicheri, M. Huse, C. H. Lee, J. Kuriyan und W. T. Miller (1997). "Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement [see comments]." *Nature* 385(6617): 650-3.
- Mongiovi, A. M., P. R. Romano, S. Panni, M. Mendoza, W. T. Wong, A. Musacchio, G. Cesareni und P. P. Di Fiore (1999). "A novel peptide-SH3 interaction." *EMBO J.* 18(19): 5300-9.
- Morton, C. J., D. J. Pugh, E. L. Brown, J. D. Kahmann, D. A. Renzoni und I. D. Campbell (1996). "Solution structure and peptide binding of the SH3 domain from human Fyn." *Structure* 4(6): 705-14.
- Mullis, K. B. und F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* 155: 335-50.
- Musacchio, A. (2003). "How SH3 domains recognize proline." *Adv. Protein Chem.* 61: 211-68.
- Musacchio, A., M. Saraste und M. Wilmanns (1994). "High-resolution crystal structures of tyrosine kinase SH3 domains complexed with proline-rich peptides." *Nat. Struct. Biol.* 1(8): 546-51.
- Nagata, Y., M. Borghi, G. H. Fisher und D. A. A (1995). "Free D-serine concentration in normal and Alzheimer human brain." *Brain Res Bull* 38(2): 181-3.
- Otting, G. und K. Wuthrich (1990). "Heteronuclear filters in two-dimensional [1H,1H]-NMR spectroscopy: combined use with isotope labelling for studies of macromolecular conformation and intermolecular interactions." *Quart. Rev. Biophys.* 23(1): 39-96.
- Pandori, M. W., N. J. Fitch, H. M. Craig, D. D. Richman, C. A. Spina und J. C. Guatelli (1996). "Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein." *J. Virol.* 70(7): 4283-90.
- Park, C., Y. Choi und Y. Yun (1998). "Son of sevenless binds to the SH3 domain of src-type tyrosine kinase." *Mol. Cells.* 8(5): 518-23.
- Pawson, T. und J. Schlessingert (1993). "SH2 and SH3 domains." *Curr. Biol.* 3(7): 434-42.
- Perlmutter, R. M., J. D. Marth, D. B. Lewis, R. Peet, S. F. Ziegler und C. B. Wilson (1988). "Structure and expression of lck transcripts in human lymphoid cells." *J. Cell. Biochem.* 38(2): 117-26.
- Piguet, V. und D. Trono (1999). "The Nef protein of primate lentiviruses." *Rev. Med. Virol.* 9(2): 111-20.
- Pisabarro, M. T., L. Serrano und M. Wilmanns (1998). "Crystal structure of the abl-SH3 domain complexed with a designed high-affinity peptide ligand: implications for SH3-ligand interactions." *J. Mol. Biol.* 281(3): 513-21.
- Poghosyan, Z., S. M. Robbins, M. D. Houslay, A. Webster, G. Murphy und D. R. Edwards (2002). "Phosphorylation-dependent interactions between ADAM15 cytoplasmic domain and Src family protein-tyrosine kinases." *J Biol Chem* 277(7): 4999-5007.

- Prasad, K. V., R. Kapeller, O. Janssen, H. Repke, J. S. Duke-Cohan, L. C. Cantley und C. E. Rudd (1993). "Phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and PI 4-kinase binding to the CD4-p56lck complex: the p56lck SH3 domain binds to PI 3-kinase but not PI 4-kinase." *Mol. Cell. Biol.* 13(12): 7708-17.
- Rabanal, F., M. D. Ludevid, M. Pons und E. Giralt (1993). "CD of proline-rich polypeptides: application to the study of the repetitive domain of maize glutelin-2." *Biopolymers* 33(7): 1019-28.
- Raulin, J. (2002). "Human immunodeficiency virus and host cell lipids. Interesting pathways in research for a new HIV therapy." *Prog Lipid Res* 41(1): 27-65.
- Reedquist, K. A., T. Fukazawa, B. Druker, G. Panchamoorthy, S. E. Shoelson und H. Band (1994). "Rapid T-cell receptor-mediated tyrosine phosphorylation of p120, an Fyn/Lck Src homology 3 domain-binding protein." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(10): 4135-9.
- Reinecke, U., R. Volkmer-Engert und J. Schneider-Mergener (2001). "Application of peptide arrays prepared by the SPOT-technology." *Curr. Op. Biotechnol.* 12: 59-64.
- Reinecke, U., A. Kramer und J. Schneider-Mergener (1999). "Antigen sequence- and library-based mapping of linear and discontinuous protein-protein-interaction sites by spot synthesis." *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 243: 23-36.
- Ren, R., B. J. Mayer, P. Cicchetti und D. Baltimore (1993). "Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site." *Science* 259(5098): 1157-61.
- Renkema, H. G. und K. Saksela (2000). "Interactions of HIV-1 NEF with cellular signal transducing proteins." *Front. Biosci.* 5: D268-83.
- Renzoni, D. A., D. J. Pugh, G. Siligardi, P. Das, C. J. Morton, C. Rossi, M. D. Waterfield, I. D. Campbell und J. E. Ladbury (1996). "Structural and thermodynamic characterization of the interaction of the SH3 domain from Fyn with the proline-rich binding site on the p85 subunit of PI3-kinase." *Biochemistry* 35(49): 15646-53.
- Rickles, R. J., M. C. Botfield, Z. Weng, J. A. Taylor, O. M. Green, J. S. Brugge und M. J. Zoller (1994). "Identification of Src, Fyn, Lyn, PI3K and Abl SH3 domain ligands using phage display libraries." *EMBO J.* 13(23): 5598-604.
- Rickles, R. J., M. C. Botfield, X. M. Zhou, P. A. Henry, J. S. Brugge und M. J. Zoller (1995). "Phage display selection of ligand residues important for Src homology 3 domain binding specificity." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(24): 10909-13.
- Roskoski, R., Jr. (2004). "Src protein-tyrosine kinase structure and regulation." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324(4): 1155-64.
- Rudd, C. E., P. Anderson, C. Morimoto, M. Streuli und S. F. Schlossman (1989). "Molecular interactions, T-cell subsets and a role of the CD4/CD8:p56lck complex in human T-cell activation." *Immunol. Rev.* 111: 225-66.
- Rudd, C. E., J. M. Trevillyan, J. D. Dasgupta, L. L. Wong und S. F. Schlossman (1988). "The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein-tyrosine kinase (pp58) from human T lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci USA* 85(14): 5190-4.
- Saksela, K. (2004). "Therapeutic targeting of interactions between Nef and host cell proteins." *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 4(4): 315-9.

- Saksela, K., G. Cheng und D. Baltimore (1995). "Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef+ viruses but not for down-regulation of CD4." *EMBO J.* 14(3): 484-91.
- Salghetti, S., R. Mariani und J. Skowronski (1995). "Human immunodeficiency virus type 1 Nef and p56lck protein-tyrosine kinase interact with a common element in CD4 cytoplasmic tail." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92(2): 349-53.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York, *Cold Spring Harbor Laboratory*.
- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 74: 5463-5467.
- Sanzenbacher, R., D. Kabelitz und O. Janssen (1999). "SLP-76 binding to p56lck: a role for SLP-76 in CD4-induced desensitization of the TCR/CD3 signaling complex." *J. Immunol.* 163(6): 3143-52.
- Schweimer, K., S. Hoffmann, F. Bauer, U. Friedrich, C. Kardinal, S. M. Feller, B. Biesinger und H. Sticht (2002). "Structural investigation of the binding of a herpesviral protein to the SH3 domain of tyrosine kinase Lck." *Biochemistry* 41(16): 5120-30.
- Sefton, B. M. (1991). "The lck tyrosine protein kinase." *Oncogene* 6(5): 683-6.
- Shaw, A. S., K. E. Amrein, C. Hammond, D. F. Stern, B. M. Sefton und J. K. Rose (1989). "The lck tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain." *cell* 59(4): 627-36.
- Shaw, A. S., J. Chalupny, J. A. Whitney, C. Hammond, K. E. Amrein, P. Kavathas, B. M. Sefton und J. K. Rose (1990). "Short related sequences in the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 mediate binding to the amino-terminal domain of the p56lck tyrosine protein kinase." *Mol. Cell. Biol.* 10(5): 1853-62.
- Sicheri, F. und J. Kuriyan (1997). "Structures of Src-family tyrosine kinases." *Curr. Op. Struc. Biol.* 7(6): 777-85.
- Smith, G. P. (1985). "Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." *Science* 228: 1315-1317.
- Sparks, A. B., N. B. Adey, L. A. Quilliam, J. M. Thorn und B. K. Kay (1995). "Screening phage-displayed random peptide libraries for SH3 ligands." *Meth. Enzymol.* 255: 498-509.
- Sparks, A. B., L. A. Quilliam, J. M. Thorn, C. J. Der und B. K. Kay (1994). "Identification and characterisation of Src SH3 ligands from phage -displayed random peptide libraries." *J. Biol. Chem.* 269: 23853-23856.
- Sparks, A. B., J. E. Rider, N. G. Hoffman, D. M. Fowlkes, L. A. Quilliam und B. K. Kay (1996). "Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2." *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93(4): 1540-4.
- Sparks, A. B., J. E. Rider und B. K. Kay (1998). "Mapping the specificity of SH3 domains with phage-displayed random-peptide libraries." *Meth. Mol. Biol.* 84: 87-103.
- Stefanova, I., V. Horejsi, I. J. Ansotegui, W. Knapp und H. Stockinger (1991). "GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases." *Science* 254(5034): 1016-9.
- Straus, D. B. und A. Weiss (1992). "Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor." *Cell.* 70(4): 585-93.

- Susa, M., D. Rohner und S. Bichsel (1996). "Differences in binding of PI 3-kinase to the src-homology domains 2 and 3 of p56 lck and p59 fyn tyrosine kinases." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220(3): 729-34.
- Takahashi, H., T. Nakanishi, K. Kami, Y. Arata und I. Shimada (2000). "A novel NMR method for determining the interfaces of large protein-protein complexes." *Nat. Struct. Biol.* 7(3): 220-3.
- Takemoto, Y., M. Furuta, X. K. Li, W. J. Strong-Sparks und Y. Hashimoto (1995). "LckBP1, a proline-rich protein expressed in haematopoietic lineage cells, directly associates with the SH3 domain of protein tyrosine kinase p56lck." *EMBO J.* 14(14): 3403-14.
- Taylor, S. J. und D. Shalloway (1994). "An RNA-binding protein associated with Src through its SH2 and SH3 domains in mitosis." *Nature* 368(6474): 867-71.
- Tzeng, S. R., Y. C. Lou, M. T. Pai, M. L. Jain und J. W. Cheng (2000). "Solution structure of the human BTK SH3 domain complexed with a proline-rich peptide from p120cbl." *J. Biomol. NMR.* 16(4): 303-12.
- Veillette, A., M. A. Bookman, E. M. Horak und J. B. Bolen (1988). "The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck." *Cell* 55(2): 301-8.
- Viguera, A. R., J. L. Arrondo, A. Musacchio, M. Saraste und L. Serrano (1994). "Characterization of the interaction of natural proline-rich peptides with five different SH3 domains." *Biochemistry* 33(36): 10925-33.
- Wang, Y. S., D. Liu und D. F. Wyss (2004). "Competition STD NMR for the detection of high-affinity ligands and NMR-based screening." *Magn. Reson. Chem.* 42(6): 485-9.
- Wang, Z. X. (1995). "An exact mathematical expression for describing competitive binding of two different ligands to a protein molecule." *FEBS Lett.* 360(2): 111-4.
- Wiesehan, K. (2003). "Identifizierung und Charakterisierung eines spezifischen Liganden für das Alzheimer Amyloid- β -Peptid (A β)." *Doktorarbeit*.
- Wiskerchen, M. und C. Cheng-Mayer (1996). "HIV-1 Nef association with cellular serine kinase correlates with enhanced virion infectivity and efficient proviral DNA synthesis." *Virology* 224(1): 292-301.
- Wittekind, M., C. Mapelli, V. Lee, V. Goldfarb, M. S. Friedrichs, C. A. Meyers und L. Mueller (1997). "Solution structure of the Grb2 N-terminal SH3 domain complexed with a ten-residue peptide derived from SOS: direct refinement against NOEs, J-couplings and ^1H and ^{13}C chemical shifts." *J. Mol. Biol.* 267(4): 933-52.
- Xu, W., S. C. Harrison und M. J. Eck (1997). "Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src." *Nature* 385(6617): 595-602.
- Yamaguchi, H. und W. A. Hendrickson (1996). "Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation." *Nature* 384(6608): 484-9.
- Yu, H., J. K. Chen, S. Feng, D. C. Dalgarno, A. W. Brauer und S. L. Schreiber (1994). "Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains." *Cell* 76(5): 933-45.
- Zhu, Q., C. Watanabe, T. Liu, D. Hollenbaugh, R. M. Blaese, S. B. Kanner, A. Aruffo und H. D. Ochs (1997). "Wiskott-Aldrich syndrome/X-linked thrombocytopenia: WASP gene mutations, protein expression, and phenotype." *Blood* 90(7): 2680-9.

- Zuiderweg, E. R.** (2002). "Mapping protein-protein interactions in solution by NMR spectroscopy." *Biochemistry* 41(1): 1-7.
- Zwahlen, C., P. Legault, S. J. F. Vincent, J. Greenblatt, R. Konrat und L. E. Kay** (1997). "Methods for measurement of intermolecular NOEs by multinuclear NMR spectroscopy: application to a bacteriophage I N-peptide/boxB RNA complex." *J. Am. Chem. Soc.* 119: 6711-6721.

7 Anhang

7.1 Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

A_{xxx}	Extinktion bei xxx nm
AIDS	Erworbenes Immunschwäche-Syndrom („acquired immunodeficiency syndrome“)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BCR	B-Zell-Rezeptor
BIS-TRIS	Bis(2-hydroxyethyl)-amino-tris(hydroxymethyl)methan
c	Konzentration
CD	Circulardichroismus
d	Durchmesser
D₂O	Deuteriumoxid; ² H ₂ O
Da	Dalton; Molekulargewichtsangabe für Biopolymere
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
et al.	und andere („et alis“)
FCS	Fetales Kälberserum
h	Stunde
HIV-1	Humanes Immundefizienzvirus Typ 1 („human immunodeficiency virus type 1“)
HSQC	heteronukleare Einquantenkohärenz („heteronuclear single quantum coherence“)
ID	Innendurchmesser
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITAM	“immunoreceptor tyrosine-based activation motif“
kb	Kilobasen
K_D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani Medium

M	Mol/Liter
μM	Mikromol/Liter
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimol/Liter
M9-Medium	künstliches Minimalmedium (zur Isotopenmarkierung)
MOLMOL	„molecule analysis and molecule display“, Computerprogramm zur Darstellung und Analyse von 3D Molekülkoordinaten
MWCO	Molekulargewichts-Ausschlussgrenze für die Passage durch Membranen („molecular weight cut-off“)
Na-EDTA	Dinatrium-ethylendinitrilotetraessigsäure („acetic acid“)
nm	Nanometer
NMR	Kernmagnetische Resonanz („nuclear magnetic resonance“)
NMRPipe	Computerprogramm zur Prozessierung von NMR-Spektren
NOE	Kern-Overhauser-Effekt („nuclear Overhauser effect (enhancement)“)
NOESY	NOE-Spektroskopie („NOE spectroscopy“)
nt	Nukleotide
OD_{xxx}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von xxx nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PDB	„Protein Data Bank“
ppm	„parts per million“, hier für die Angabe der NMR-chemische Verschiebung
rpm	Umdrehung pro Minute („rotations per minute“)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecylsulfate“)
SH1, SH2, SH3	Src Homologie 1, 2, 3
TCR	T-Zell-Rezeptor
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit („unit“)
μl	Mikroliter
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen

WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
°C	Grad Celsius
δ	chemische Verschiebung
$[\Theta]_{MRW}$	mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest
ϵ_{xxx}	Extinktionskoeffizient bei xxx nm

Einbuchstaben-Aminosäure-Code

A	Alanin	I	Isoleucin	R	Arginin
C	Cystein	K	Lysin	S	Serin
D	Aspartat	L	Leucin	T	Threonin
E	Gluatamat	M	Methionin	V	Valin
F	Phenylalanin	N	Asparagin	W	Tryptophan
G	Glycin	P	Prolin	Y	Tyrosin
H	Histidin	Q	Glutamin		

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1–1: Schematische Darstellung des T-Zell-Rezeptor (TCR)-Komplexes einer CD4-T-Zelle.	3
Abbildung 1–2: Kristallstruktur der Src-Typ Tyrosin-Kinase im inaktiven Zustand.	5
Abbildung 1–3: Struktur der Lck.	7
Abbildung 1–4: Struktur der Lck-SH3-Domäne.	8
Abbildung 1–5: Struktur einer PPII-Helix bestehend aus Prolinen.	9
Abbildung 1–6: Schematische Darstellung der Bindung der PPII-Helix an die SH3-Domäne und Konsensus-Sequenz der Klasse-I- und Klasse-II-Liganden in Bezug auf die Aminosäure-Position.	10
Abbildung 1–7: Struktur von HIV-1-Ncf.	13
Abbildung 1–8: Prinzip des Phagendisplay.	15
Abbildung 1–9: Schematische Darstellung eines M13-Phagen mit dem fusionierten Peptid am Hüllprotein III.	15
Abbildung 2–1: Sequenz der randomisierten Bibliothek.	21
Abbildung 3–1: Genkarte der konstruierten und verwendeten SH3-Konstrukte.	35
Abbildung 4–1: Aminosäure-Sequenz der verwendeten SH3-Domänen.	53
Abbildung 4–2: Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose.	54
Abbildung 4–3: Spaltung und Größenausschlusschromatographie von GST-Src-SH3.	55
Abbildung 4–4: Peptidsequenzen aus der Phagendisplay-Selektion gegen die Lck-SH3-Domäne.	56
Abbildung 4–5: Relative Bindung der Phagendisplay-Peptide mittels anti-Phagen ELISA.	57
Abbildung 4–6: Bindungsanalyse der mittels Phagendisplay selektierten Peptide PD1, PD2, PD3, PD4 und deren Varianten an die Lck-SH3.	59
Abbildung 4–7: Analyse der Bindungsspezifität der mittels Phagendisplay selektierten Peptide PD1, PD2, PD3, PD4 und deren Varianten.	61
Abbildung 4–8: Substitutionsanalyse des Peptids PD1-R.	63
Abbildung 4–9: Bindung von Lck-SH3 an Peptidsequenzen aus natürlichen Lck-SH3-Interaktions-partnern.	67
Abbildung 4–10: Alignment der an die Lck-SH3-Domäne bindenden Peptidsequenzen aus physiologischen Interaktionspartnern.	69
Abbildung 4–11: Bindungseigenschaften von Lck-SH3 und den Kontroll-SH3-Domänen an verschiedenen Konsensus-Liganden.	70

Abbildung 4–12: Fluoreszenz-Titration von PD1 und PD1-R zur SH3-Domäne von Lck, Fyn, Hck, Src, Abl und PI3K.	73
Abbildung 4–13: Fern-UV-CD-Spektren der Peptide PD1 und PD1-R sowie der sechs verwendeten SH3-Domänen.	74
Abbildung 4–14: Fern-UV-CD-Analyse der Komplexe zwischen den Peptiden PD1 und PD1-R und den SH3-Domänen.	76
Abbildung 4–15: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Lck-SH3 während der Titration mit PD1 und PD1-R.	79
Abbildung 4–16: Darstellung der Lck-SH3-Sequenz und der Differenz der chemischen Verschiebung bei Bindung der Peptide PD1 und PD1-R.	80
Abbildung 4–17: Ribbon- und Moleküloberflächendarstellung der Lck-SH3-Domäne bei Bindung von PD1 und PD1-R.	81
Abbildung 4–18: NMR-Titration von PD1-R an die Hck-SH3-Domäne.	83
Abbildung 4–19: Differenz der chemischen Verschiebung, Ribbon- und Oberflächendarstellung der Hck-SH3-Domäne bei Bindung des Peptids PD1-R.	84
Abbildung 4–20: NMR-Titration von PD1 an die Hck-SH3-Domäne.	86
Abbildung 4–21: Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren der Hck-SH3 im freien Zustand und bei Bindung von PD1 und PD1-R.	86
Abbildung 4–22: 2D-(^{13}C , ^{15}N)-F1-gefiltertes/F2-editiertes NOE-Spektrum vom Lck-SH3:PD1-R-Komplex und Hck-SH3:PD1-Komplex.	88
Abbildung 4–23: Bindung von HIV-1-Nef an die Lck- und Hck-SH3-Domäne.	90
Abbildung 4–24: Verdrängung von HIV-1-Nef aus dem vorgelegten Lck-SH3:Nef-Komplex durch PD1-R.	91
Abbildung 4–25: Verdrängung von HIV-1-Nef vom HIV-1-Nef:Hck-SH3-Komplex durch PD1-R.	93
Abbildung 4–26: K_D -Bestimmung für die HIV-1 Nef-Hck SH3 Interaktion anhand der NMR-Kompetitionsexperimente.	94
Abbildung 5–1: SH3-Domänen im Komplex mit Klasse-I- und Klasse-II-Liganden sowie Lig-I'-Peptide.	100
Abbildung 5–2: Sequenzvergleich von FasL-4 aus Maus und Mensch.	109
Abbildung 5–3: Struktur der Lck-SH3-Domäne mit wichtigen Aminosäureresten.	118
Abbildung 5–4: Modell für die spezifische Kontrolle von SH3-vermittelte Signaltransduktion.	124

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1:	Name, Genotyp und Referenz aller in dieser Arbeit verwendeten Stämme.	21
Tabelle 2-2:	Name der Konstrukte und zugehöriger IMAGE-cDNA-Klon.	22
Tabelle 2-3:	Name und DNA-Sequenz der verwendeten Oligonukleotide.	22
Tabelle 2-4:	Name und Aminosäuresequenz der verwendeten Peptide.	23
Tabelle 2-5:	Name, Resistenz, Eigenschaften und Quelle der verwendeten und konstruierten Plasmide.	23
Tabelle 2-6:	Enzyme, Proteine und Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden.	24
Tabelle 3-1:	Klonierung der SH3-Domänen. Bei der PCR verwendete Template-DNA und Primer.	34
Tabelle 4-1:	Sequenzen der auf der PepSpot-Membran immobilisierten PD-Peptide und deren Varianten.	58
Tabelle 4-2:	Peptidsequenzen mit potenziellen SH3-Bindungsmotive aus Sequenzen natürlicher Lck-SH3 Interaktionspartner.	65
Tabelle 4-3:	Dissoziationskonstanten (K_D -Werte) der SH3-Domänen mit den Peptiden PD1 und PD1-R.	73

7.4 DNA- und Proteinsequenzen

7.4.1 Abl-SH3

1	gga	tcc	AGT	GAA	AAT	GAC	CCG	AAC	CTG	TTC	GTT	GCA	CTG	TAT	GAT	45
1	G	S	S	E	N	D	P	N	L	F	V	A	L	Y	D	15
46	TTT	GTG	GCC	AGT	GGA	GAT	AAC	ACT	CTA	AGC	ATA	ACT	AAA	GGT	GAA	90
16	F	V	A	S	G	D	N	T	L	S	I	T	K	G	E	30
91	AAG	CTC	CGG	GTC	TTA	GGC	TAT	AAT	CAC	AAT	GGG	GAA	TGG	TGT	GAA	135
31	K	L	R	V	L	G	Y	N	H	N	G	E	W	C	E	45
136	GCC	CAA	ACC	AAA	AAT	GGC	CAA	GGC	TGG	GTC	CCA	AGC	AAC	TAC	ATC	180
46	A	Q	T	K	N	G	Q	G	W	V	P	S	N	Y	I	60
181	ACG	CCA	GTC	AAC	AGT	CTG	GAG	AAA	CAC	TCC						210
61	T	P	V	N	S	L	E	K	H	S						70

7.4.2 Fyn-SH3

1	gga	tcc	GGT	GGT	ACA	GGA	GTG	ACA	CTC	TTT	GTG	GCC	CTT	TAT	GAC	45
1	G	S	G	G	T	G	V	T	L	F	V	A	L	Y	D	15
46	TAT	GAA	GCA	CGG	ACA	GAA	GAT	GAC	CTG	AGT	TTT	CAC	AAA	GGA	GAA	90
16	Y	E	A	R	T	E	D	L	S	F	H	K	G	E		30
91	AAA	TTT	CAA	ATA	TTG	AAC	AGC	TCG	GAA	GGA	GAT	TGG	TGG	GAA	GCC	135
31	K	F	Q	I	L	N	S	E	G	D	W	W	E	A		45
136	CGC	TCC	TTG	ACA	ACT	GGA	GAG	ACA	GGT	TAC	ATT	CCC	AGC	AAT	TAT	180
46	R	S	L	T	T	G	E	T	G	Y	I	P	S	N	Y	60
181	GTG	GCT	CCA	GTT	GAC	agc	att	cag	gcg							207
61	V	A	P	V	D	S	I	Q	A							69

7.4.3 Hck-SH3

1	gga	tct	CCG	GGG	CCT	AAT	AGC	CAC	AAC	AGC	AAC	ACA	CCA	GGA	ATC	45
1	G	S	P	G	P	N	S	H	N	S	N	T	P	G	I	15
46	AGG	GAG	GCA	GGC	TCT	GAG	GAC	ATC	ATC	GTG	GTT	GCC	CTG	TAT	GAT	90
16	R	E	A	G	S	E	D	I	I	V	V	A	L	Y	D	30
91	TAC	GAG	GCC	ATT	CAC	CAC	GAA	GAC	CTC	AGC	TTC	CAG	AAG	GGG	GAC	135
31	Y	E	A	I	H	H	E	D	L	S	F	Q	K	G	D	45
136	CAG	ATG	GTG	GTC	CTA	GAG	GAA	TCC	GGG	GAG	TGG	TGG	AAG	GCT	CGA	180
46	Q	M	V	V	L	E	E	S	G	E	W	W	K	A	R	60
181	TCC	CTG	GCC	ACC	CGG	AAG	GAG	GGC	TAC	ATC	CCA	AGC	AAC	TAT	GTC	225
61	S	L	A	T	R	K	E	G	Y	I	P	S	N	Y	V	75
226	GCC	CGC	GTT	GAC	TCT	CTG	GAG	ACA								249
76	A	R	V	D	S	L	E	T								83

7.4.4 Lck-SH3

1	gga	TCC	CCA	CTG	CAA	GAC	AAC	CTG	GTT	ATC	GCT	CTG	CAC	AGC	TAT	45
1	G	S	P	L	Q	D	N	L	V	I	A	L	H	S	Y	15
46	GAG	CCC	TCT	CAC	GAC	GGA	GAT	CTG	GGC	TTT	GAG	AAG	GGG	GAA	CAG	90
16	E	P	S	H	D	G	D	L	G	F	E	K	G	E	Q	30
91	CTC	CGC	ATC	CTG	GAG	CAG	AGC	GGC	GAG	TGG	TGG	AAG	GCG	CAG	TCC	135
31	L	R	I	L	E	Q	S	G	E	W	W	K	A	Q	S	45
136	CTG	ACC	ACG	GGC	CAG	GAA	GGC	TTC	ATC	CCC	TTC	AAT	TTT	GTG	GCC	180
46	L	T	T	G	Q	E	G	F	I	P	F	N	F	V	A	60
181	AAA	GCG	AAC													189
61	K	A	N													63

7.4.5 PI3K-SH3

1	gga	tcc	ATG	AGT	GCT	GAG	GGG	TAC	CAG	TAC	AGA	GCG	CTG	TAT	GAT	45
1	G	S	M	S	A	E	G	Y	Q	Y	R	A	L	Y	D	15
46	TAT	AAA	AAG	GAA	AGA	GAA	GAA	GAT	ATT	GAC	TTG	CAC	TTG	GGT	GAC	90
16	Y	K	K	E	R	E	E	D	I	D	L	H	L	G	D	30
91	ATA	TTG	ACT	GTG	AAT	AAA	GGG	TCC	TTA	GTA	GCT	CTT	GGA	TTC	AGT	135
31	I	L	T	V	N	K	G	S	L	V	A	L	G	F	S	45
136	GAT	GGA	CAG	GAA	GCC	AGG	CCT	GAA	GAA	ATT	GGC	TGG	TTA	AAT	GGC	180
46	D	G	Q	E	A	R	P	E	E	I	G	W	L	N	G	60
181	TAT	AAT	GAA	ACC	ACA	GGG	GAA	AGG	GGG	GAC	TTT	CCG	GGA	ACT	TAC	225
61	Y	N	E	T	T	G	E	R	G	D	F	P	G	T	Y	75
226	GTA	GAA	TAT	ATT	GGA	AGG	AAA	AAA	ATC	TCG						255
76	V	E	Y	I	G	R	K	K	I	S						85

7.4.6 Src-SH3

1	gga	tcc	gcg	ggt	ccg	ctg	GCC	GGT	GGA	GTG	ACC	ACC	TTT	GTG	GCC	45
1	G	S	A	G	P	L	A	G	G	V	T	T	F	V	A	15
46	CTC	TAT	GAC	TAT	GAG	TCT	AGG	ACG	GAG	ACA	GAC	CTG	TCC	TTC	AAG	90
16	L	Y	D	Y	E	S	R	T	E	T	D	L	S	F	K	30
91	AAA	GGC	GAG	CGG	CTC	CAG	ATT	GTC	AAC	AAC	ACA	GAG	GGA	GAC	TGG	135
31	K	G	E	R	L	Q	I	V	N	N	T	E	G	D	W	45
136	TGG	CTG	GCC	CAC	TCG	CTC	AGC	ACA	GGA	CAG	ACA	GGC	TAC	ATC	CCC	180
46	W	L	A	H	S	L	S	T	G	Q	T	G	Y	I	P	60
181	AGC	AAC	TAC	GTG	GCG	CCC	TCC	GAC	TCC	ATC	CAG	GCT	GAG	GAG		222
61	S	N	Y	V	A	P	S	D	S	I	Q	A	E	E		74

1. **Toxizitätsprüfungen in Zellkulturen für eine Vorhersage der akuten Toxizität (LD50) zur Einsparung von Tierversuchen**
von W. Halle (1998), 92 Seiten
ISBN: 3-89336-221-5
2. **Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung**
von D. Weuster-Botz (1999), II, 320 Seiten
ISBN: 3-89336-245-2
3. **Cell Culture Models as Alternatives to Animal Experimentation for the Testing of Neuroprotective Compounds in Stroke Research**
Practical Handbook of Methods
edited by A. J. Carter, H. Kettenmann (1999), 144 pages
ISBN: 3-89336-250-9
4. **Action and Visuo-Spatial Attention**
Neurobiological Bases and Disorders
Book of Abstracts
collected by P. H. Weiss (2000), XIV, 56 pages
ISBN: 3-89336-272-X
5. **Genomweite Genexpressionsanalysen mit DNA-Chips zur Charakterisierung des Glucose-Überflussmetabolismus von *Escherichia coli***
von T. Polen (2003), 100 Seiten
ISBN: 3-89336-337-8
6. **Auslegung des Detektorsystems für einen hochauflösenden Positronen-Emissions-Tomographen mit hoher Sensitivität**
von U. Heinrichs (2003), IV, 238 Seiten
ISBN: 3-89336-340-8
7. **Biological Principles Applied to Technical Asymmetric Catalysis**
by A. Liese (2003), VI, 206 pages
ISBN: 3-89336-344-0
8. **Designstudie eines μ CT-Zusatzes für einen hochauflösenden Positronen-Emissions-Tomographen: Beispiel für ein multimodales bildgebendes System**
von M. Khodaverdi (2004), III, 162 Seiten
ISBN: 3-89336-360-2
9. **Bioprocess Development for the Generation of Monocyte-Derived Dendritic Cells: Applicability in Breast Cancer Immunotherapy**
by H.R. Bohnenkamp (2004), XLII, 128 pages
ISBN: 3-89336-364-5

10. **Regulation der *clp*-Genexpression durch ClgR und Definition des ClgR-Regulons aus *Corynebacterium glutamicum***
by S. Engels (2004), V, 125 pages
ISBN: 3-89336-379-3
11. **Metabolomanalyse zur Untersuchung der Dynamik im Aromatenbiosyntheseweg in L-Phenylalanin Produzenten von *Escherichia coli***
by M. Oldiges (2005), XVI, 181 pages
ISBN: 3-89336-380-7
12. **Identifizierung und Charakterisierung eines Transkriptionsregulators der Aconitase von *Corynebacterium glutamicum***
by A. Krug (2005), VI, 122 pages
ISBN: 3-89336-382-3
13. **Prozessentwicklung der elektroenzymatischen Sulfoxidation mit Chloroperoxidase**
by S. Lütz (2005), XIV, 178 pages
ISBN: 3-89336-387-4
14. **Export von Proteinen mit Zwillingsarginin-Signalsequenzen über den Tat-Weg in *Escherichia coli***
by P. J. Kreutzenbeck (2005), 118 pages
ISBN: 3-89336-388-2
15. **Untersuchungen zur Fettsäure- und Zellwandsynthese sowie zur Glutamatbildung mit *Corynebacterium glutamicum***
by E. Radmacher (2005), 130 pages
ISBN: 3-89336-389-0
16. **Monomodale und multimodale Registrierung von autoradiographischen und histologischen Bilddaten**
by A. Vieten (2005), 116 pages
ISBN: 3-89336-390-4
17. **Biosynthese von Phosphonaten: Charakterisierung des rekombinanten Enzyms Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494**
von S. Johnen (2005), ca. 140 Seiten
ISBN: 3-89336-400-5
18. **Ex-vivo Generierung von neutrophilen Zellen zur Prävention und Therapie der Sepsis**
von R. Herbold (2005), ca. 204 Seiten
ISBN: 3-89336-407-2

19. **Entwicklung eines Donor/Akzeptor-Konzeptes für die asymmetrische Synthese unsymmetrischer Benzoine mit Hilfe ThDP-abhängiger Enzyme**
von P. Dünkelfmann (2005), ca. 228 Seiten
ISBN: 3-89336-408-0
20. **Analyse der Bindungsspezifität der humanen Lck-SH3-Domäne anhand artifiziereller und physiologischer Peptid-Liganden und strukturelle Charakterisierung dieser Peptide im Komplex mit SH3-Domänen**
von T. T. Tran (2005), 155 Seiten
ISBN: 3-89336-412-9

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Band / Volume 20
ISBN 3-89336-412-9

Lebenswissenschaften
Life Sciences