

Biochemische Charakterisierung der Oligomerisierung
des Interferon-gamma-induzierten
humanen Guanylat-bindenden Proteins I

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dipl. Biol.

Utz Benseid

aus Wermelskirchen

Düsseldorf 2006

Aus dem Institut für Molekulare Parasitologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. F. Wunderlich
1. Koreferent: Prof. Dr. A. W. Alfermann
2. Koreferent: Prof. Dr. Ch. Herrmann

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2006

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	5
1.1	Die Immunabwehr	5
1.2	Cytokine	7
1.3	Der JAK-STAT-Signalweg	8
1.4	Die Interferon induzierte intrazelluläre Immunantwort	10
1.4.1	Die dsRNA-abhängige Protein Kinase (PKR)	10
1.4.2	Das 2'-5'-Oligoadenylat Synthetase System (OAS)	10
1.5	Allgemeine Eigenschaften der GTP-bindenden Proteine	11
1.5.1	Sequenzmotive der G-Domäne	11
1.5.2	Der GTPase-Zyklus der GTP-bindenden Proteine	12
1.6	Große GTP-bindende Proteine	13
1.6.1	Dynamin	15
1.6.2	Dynamin-verwandte Proteine	18
1.6.3	Mx-Proteine	21
1.6.4	Guanylat-bindende Proteine (GBP)	22
1.7	Zielsetzung dieser Arbeit	32
2	METHODEN	33
2.1	Molekularbiologische Methoden	33
2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA	33
2.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen	34
2.1.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	34
2.1.4	Agarosegelelektrophorese	35
2.1.5	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	35
2.1.6	Restriktion doppelsträngiger DNA	36
2.1.7	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	36
2.1.8	Ligation von DNA-Fragmenten	36
2.1.9	Darstellung kompetenter E. coli Zellen	36
2.1.10	Transformation von kompetenten E. coli Zellen mit zirkulärer DNA	37

2.1.11	DNA-Sequenzierung	37
2.1.12	Testexpression	38
2.1.13	Transformation 2-Hybrid-Interaktionstest	38
2.1.14	Quantifizierung mit dem β -Galaktosidase-Assay	39
2.1.15	Screen einer cDNA-Bank im Zwei-Hybrid-System	39
2.2	Proteinchemische Methoden	40
2.2.1	Zellanzucht und Zellaufschluss	40
2.2.2	Affinitätschromatographie	41
2.2.3	Größenausschlusschromatographie	42
2.2.4	Aufkonzentrierung von Proteinlösungen	43
2.2.5	Bestimmung der Proteinkonzentration	43
2.2.6	Elektrophorese von Proteinen	44
2.2.7	Western-Blot	46
2.3	Biophysikalische Methoden	46
2.3.1	Circulardichroismus	46
2.3.2	Massenspektrometrie	47
2.3.3	Differential Scanning Calorimetry (DSC)	50
2.3.4	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)	50
2.3.5	Cross-linking Analysen	51
2.3.6	GTP-Hydrolyse-Assay	52
2.3.7	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	52
3	ERGEBNISSE	54
3.1	Analyse der hGBP1 Oligomerisierung mit dem Zwei-Hybrid-System	54
3.1.1	Der Einfluss der GTPase-Domäne und des CaaX-Motivs	57
3.1.2	Beiträge der globulären und helikalen Domänen zur Dimerisierung	59
3.2	Bestimmung der Interaktionsstärke	62
3.3	Reinigung von hGBP1 Wildtyp und den Domänen	64
3.3.1	Reinigung von hGBP1 Wildtyp und der G-Domänen	64
3.3.2	Reinigung der helikalen Domänen	64
3.3.3	Reinigung der C589S-Mutante	65
3.3.4	Massenspektrometrische Analyse der gereinigten Proteine	66
3.4	Die Sekundärstruktur von hGBP1 und seinen Domänen	67

3.5	Die thermische Denaturierung des Wildtyp-Proteins und der Domänen	70
3.6	Die Thermische Denaturierung der Subdomäne \square 12-13	73
3.7	Die Oligomerisierung des Wildtyp-Proteins und seiner Domänen	75
3.7.1	Analytische Größenausschlusschromatographie	75
3.7.2	Dynamische Lichtstreuung	78
3.8	Untersuchung der Oligomerisierung von hGBP1 durch chemisches „Cross linking“	81
3.8.1	Die nukleotidabhängige Oligomerisierung des Wildtyps von hGBP1	84
3.8.2	Untersuchung der nukleotidabhängigen Oligomerisierung der isolierten G-Domäne	87
3.8.3	Die Oligomerisierung der isolierten helikalen Domänen	89
3.8.4	Die GTP-Hydrolyse-Aktivität des kovalent verknüpften Wildtyp-Proteins von hGBP1	91
3.9	Kalorimetrische Charakterisierung der Proteindomänen von hGBP1	93
3.9.1	Aufnahme und Analyse von DSC Daten	93
3.9.2	Analyse von Komplexen mit Hilfe der DSC	95
3.9.3	Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D mit Hilfe der ITC	97
3.10	Mit welchen Proteinen interagiert hGBP1?	99
3.11	Interagiert hGBP1 mit einem Kernkörperprotein?	102
4	DISKUSSION	104
4.1	Die Oligomerisierung von hGBP1	104
4.1.1	Der Einfluss der Nukleotidbindung und der Nukleotidhydrolyse	105
4.1.2	Die Farnesylierung	106
4.1.3	Welche Domänen von hGBP1 sind an der Interaktion beteiligt?	107
4.2	In welcher Form assemblieren die helikalen Domänen?	109
4.3	Modell der Tetramerisierung von hGBP1	110
4.4	GTP- Hydrolyse im kovalent verknüpftem hGBP1	113
4.5	Die helikale Domäne stabilisiert die G-Domäne	114
4.6	Gibt es einen Interaktionspartner von hGBP1?	115
5	ZUSAMMENFASSUNG	116

6	LITERATURVERZEICHNIS	118
7	ANHANG	133
7.1	Abkürzungen	133
7.2	Kalorimetrische Messungen	135
7.2.1	Differential Scanning Calorimetry	135
7.2.2	Isotherme Titrationskalorimetrie	138
7.3	Materialien	140
7.3.1	Geräte	140
7.3.2	Chemikalien	140
7.3.3	Mikroorganismen	141
7.3.4	Medien	141
7.3.5	Puffer	142
7.3.6	Stammlösungen	143
7.3.7	Verbrauchsmaterialien	143
7.3.8	Reagenzienkits	143
7.3.9	Säulenmaterialien	143
7.3.10	Enzyme	144
7.3.11	Proteinmarker	144
7.3.12	Vektoren	144
7.3.13	Antibiotika	145
7.3.14	Oligonukleotide	145
8	DANKSAGUNG	147
9	LEBENS LAUF	148

1 Einleitung

1.1 Die Immunabwehr

Jeder vielzellige Organismus wird permanent von einer Vielzahl von pathogenen Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten bedroht. Diese Pathogene werden über die Atmung und die Nahrung aufgenommen oder sie versuchen die Außenhülle des Wirtes zu kolonisieren bzw. sie zu durchdringen. Ohne ein Immunsystem würden viele dieser Pathogene in den Zellen oder den sie umgebenden Flüssigkeiten gedeihen ^{1,2}. Die Abwehr von Krankheitserregern und Parasiten ist somit ein ständiger Prozess.

Die Virulenz eines Pathogens für seinen Wirt beruht auf einer Vielzahl von Faktoren wie z.B. Endotoxinen, Exotoxinen ³. Die Bedrohung durch Krankheitserreger führte im Laufe der Evolution zu der Entwicklung einer Vielzahl von Abwehrmechanismen. Dabei kam es zu einer Co-Evolution zwischen den Infektionsmechanismen der Pathogene und den Abwehrmechanismen der Wirte ⁴⁻⁷.

Um sich vor Krankheitserregern und Parasiten zu schützen muss der Organismus diese erkennen und eliminieren können.

Beim Menschen erfolgt die Immunantwort durch zwei parallel wirkende, jedoch miteinander verflochtene Systeme: die unspezifische Resistenz und die spezifische Immunität. Die Systeme unterscheiden sich vor allem in ihrer Aktivierungszeit und ihrer Lernfähigkeit. An beiden Abwehrmechanismen sind sowohl zelluläre als auch humorale Faktoren beteiligt.

Die unspezifische Resistenz ist angeboren und richtet sich gegen alle „Fremdlinge“ im Körper. Diese angeborene Immunität ist ein System, das im Laufe der Evolution schon sehr früh entstanden ist. Es bildet die erste Linie bei der Abwehr von Pathogenen ⁸. Die angeborene Immunität besteht unter anderem aus mechanischen und chemischen Sperrn, die eine Infektion verhindern sollen. Die Effektorsysteme der angeborenen Immunität bestehen aus zirkulierenden Molekülen und Abwehrzellen, die direkt nach dem Eindringen eines pathogenen Organismus aktiviert werden. Die Erkennung von Fremdkörpern erfolgt anhand von konservierten molekularen Mustern, die mit den Pathogenen assoziiert werden (PAMPs: pathogen-associated molecular patterns) wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS) oder bakterielle CpG DNA ⁹. Die PAMPs werden von spezifischen Rezeptoren erkannt (PRRs: pattern recognition receptors) wie z.B. den TOLL-ähnlichen Rezeptor. Dieser konservierte Rezeptor konnte in *Drosophila* und in Säugern nachgewiesen werden ⁹.

Die humorale Abwehr der angeborenen Immunität wird von einer Vielzahl löslicher Proteine wie dem Lysozym und den Cytokinen übernommen. Die Cytokine werden von den Monozyten und den Makrophagen produziert und induzieren als Immunbotenstoffe u.a. die vermehrte Bildung von Abwehrzellen. Zu den Cytokinen gehören u.a. die Interferone und die Interleukine. Für die unspezifische zelluläre

Immunantwort sind die neutrophilen Granulozyten, die Monozyten und die Makrophagen verantwortlich. Diese werden durch chemische Botenstoffe zu einer Infektion oder Wunde gelockt und phagozytieren die Fremdstoffe.

Bei Vertebraten gibt es zusätzlich eine spezifische Abwehr, die aus einer erworbenen, adaptiven Immunität besteht. Diese zeichnet sich durch die Generierung und Aktivierung von antigenspezifischen T- und B-Zellen aus. Die spezifische Abwehr wird durch den Kontakt mit dem Krankheitserreger erworben.

Bei der spezifischen Immunität bilden die B-Lymphozyten und die von ihnen gebildeten Antikörper die Grundlage der humoralen Immunantwort. Diese Antikörper erkennen extrazelluläre Pathogene und körperfremde Stoffe und können diese eliminieren. Wenn die B-Lymphozyten über das Blut und die Lymphbahnen auf einen Fremdkörper treffen und ihn als Antigen erkennen, wandeln sie sich in Plasmazellen um und beginnen mit der Produktion von Antikörpern. Nach der Abwehr der Infektion bleiben einige B-Zellen, als Teil der erworbenen Immunität, als B-Gedächtniszellen erhalten.

Infektionen durch intrazelluläre Krankheitserreger können durch die spezifische humorale Immunantwort nicht erkannt werden. Sie werden durch die zelluläre, adaptive Immunantwort bekämpft, bei der die T-Lymphozyten eine wichtige Rolle spielen. Die T-Lymphozyten werden im Thymus gebildet und zirkulieren in den Blut- und Lymphbahnen. Sie tragen auf ihrer Zelloberfläche strukturspezifische Rezeptoren, mit denen sie an antigenpräsentierende Zellen andocken. Wenn eine Zelle körperfremde Peptide präsentiert, beginnt sich der angedockte T-Lymphozyt zu teilen und spezielle T-Zellen (cytotoxische T-Zellen, T-Helferzellen und T-Suppressorzellen) zu bilden. Die cytotoxischen T-Zellen sind auf die Abwehr von Viren spezialisiert. Sie lysieren Zellen, die von Viren befallen wurden. Die T-Helferzellen sind sowohl an der humoralen als auch an der zellulären Abwehr beteiligt. Sie beginnen mit der Produktion und dem ausschütten von Cytokinen und stimulieren die Differenzierung und Vermehrung geeigneter B-Zellen und cytotoxischer T-Zellen sowie die Bildung langlebiger T-Gedächtniszellen. Die T-Suppressorzellen kontrollieren die Immunreaktion und können sie bei Bedarf hemmen und die Ausschüttung der Cytokine reduzieren.

Sowohl die unspezifische als auch die spezifische Abwehr verfolgen dasselbe Ziel. Sie unterscheiden sich jedoch deutlich in ihrer Aktivierungszeit und ihren Aktivierungsmechanismen. Die Systeme der angeborenen Immunität werden innerhalb von Sekunden und Minuten nach Eindringen eines Organismus aktiv. Diese Reaktionen laufen bei allen weiteren Kontakten in der gleichen Reihenfolge und Geschwindigkeit ab. Die adaptive Immunreaktion wird beim ersten Kontakt mit einem Erreger oder Antigen erst nach Tagen oder Wochen aktiv. Durch die Erinnerungsfähigkeit der spezifischen Immunität wird die Reaktion mit jedem weiteren Kontakt spezifischer und schneller. Die Erinnerungsfähigkeit beruht auf der Bereitstellung langlebiger Gedächtniszellen.

Die angeborene und die erworbene Immunität sind durch Effektorzellen verknüpft, die bei beiden Systemen aktiviert werden⁹⁻¹¹.

1.2 Cytokine

Die Cytokine bilden eine Familie von Botenstoffen, zu der unter anderem die Interleukine, Interferone und die Tumor Nekrosefaktoren gehören. Es sind Proteine, die nach einem entsprechenden Stimulus von Zellen synthetisiert und sezerniert werden. Die Cytokine steuern eine Vielzahl von lebenswichtigen Vorgängen, zu denen die Hämatopoese, die Angiogenese, die Embryogenese, die Chemotaxis und die Koordination der Immunantwort gehören. So wird zum Beispiel der komplexe Vorgang der Reifung der B- und T-Lymphozyten maßgeblich durch Cytokine dirigiert¹². Sie können sowohl eine stimulierende als auch eine abschwächende, regulatorische Funktion haben. Dies ist oft davon abhängig, mit welchem Zelltyp die Cytokine in Wechselwirkung treten¹³.

Die Koordination und Regulierung der angeborenen Immunität erfolgt u.a. durch die Aktivierung der Interferone des Typ I, dem Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) und den Interleukinen IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15. Die adaptive Immunität wird u.a. durch die Interleukine IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IL-16, IL-17 sowie Interferon des Typs II stimuliert^{12,14,15}.

Eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr von Viren und anderen intrazellulären Pathogenen haben die Interferone. Die Interferone werden in zwei Typen aufgeteilt, die unterschiedliche Funktionen in der Immunabwehr haben¹⁶. Die Interferone- α , - β , - ω und - τ werden als Type I und das Interferon- γ als Type II bezeichnet. Die Unterscheidung der Interferone basiert auf ihrer Proteinsequenz, ihrer zellulären Herkunft, sowie auf den unterschiedlichen Rezeptoren. Durch beide Typen von Interferon wird ein antiviraler Zustand in ihren Zielzellen stimuliert. Dadurch wird die Replikation des Virus blockiert oder herabgesetzt, während die Synthese von Enzymen stimuliert wird, die mit viralen Prozessen interferieren^{17,18}. Außerdem können sie das Wachstum ihrer Zielzellen verlangsamen und sie anfälliger für die Apoptose machen.

Virale, doppelsträngige RNA löst in den infizierten Zellen die Ausschüttung von Interferonen des Typs I aus. Dieses wird während einer Infektion vor allem durch eine Subpopulation von unreifen dendritischen Zellen gebildet¹⁹⁻²¹. Bei Interferon- α handelt es sich um eine Familie von zehn eng verwandten Proteinen. Von den drei anderen Interferonen des Typs I ist bisher nur jeweils eine Form des Proteins bekannt. Interferon β wurde bei Menschen und Mäusen, Interferon ω nur beim Menschen sowie Interferon τ bei Wiederkäuern nachgewiesen.

Die Funktion der Interferone des Typs I (IFN I) ist die Inhibierung der viralen Replikation sowie die Induktion des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Klasse I (MHC-I) bei nicht infizierten Zellen. Es induziert die Ausschüttung von Interleukin-15, das die Entwicklung der T-Gedächtniszellen und die der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) fördert. Außerdem stimuliert sie beim Menschen die Differenzierung von T_H1-Helferzellen (einer Subpopulation der T-Helferzellen)¹².

Das Interferon γ (IFN- γ) ist das einzige des Typs II. In Zellen, die dieses Signal empfangen, wird unter anderem die Herstellung von Proteinen induziert, die eine wichtige Funktion bei der Immunabwehr ausüben. Zu den am stärksten exprimierten Proteinen gehören die Guanylat-bindenden Proteine der 47-kDa und die der 65-kDa Familie wie zum Beispiel das humane Guanylat-bindende Protein 1²². Das IFN- γ induziert antivirale Funktionen und aktiviert Makrophagen, welche bei der Abwehr von Mikroorganismen die stärksten Mitglieder der angeborenen Immunität sind²³. Anders als die Interferone des Typs I wird Interferon- γ nur von aktivierten NK-Zellen, den T_H1-Zellen und in Präsenz der Immunbotenstoffe Interleukin IL-12, IL-18 sowie des Tumornekrosefaktors- α (TNF- α) durch aktivierte dendritische Zellen und Makrophagen produziert. Dabei stellt die Expression von IFN- γ durch die T_H1-Zellen ein wichtiges Verbindungsglied zwischen der erworbenen Immunität und der auf Makrophagen basierenden angeborenen Immunität dar^{15,18,24}.

Die Aktivierung der Transkription der Resistenzgene erfolgt bei den beiden Interferon Typen über den JAK-STAT-Signalweg²⁵.

1.3 Der JAK-STAT-Signalweg

Eine gemeinsame Eigenschaft der Interferone des Typs I und II ist es, über den JAK-STAT-Signalweg (JAK: Janus-Kinase, STAT: signal transducer and activators of transcription) eine direkte Signalweiterleitung in den Nukleus zu ermöglichen²⁵. Dies führt zu einer schnellen Änderung des Expressionsmusters einer Vielzahl von Genen, die an der angeborenen und erworbenen Immunität beteiligt sind^{17,18,22,26-29}.

Die Abbildung 1 zeigt die Signalwege für die Interferone des Typs 1 und 2. Die Interferone des Typs I binden an einen Klasse II Cytokine Rezeptor, der aus je einem Proteinmolekül des IFN- α -Rezeptors 1 (IFNAR 1) und des IFN- α -Rezeptors 2 (IFNAR 2) gebildet wird. Diese sind mit den Janus-Kinasen TYK2 bzw. JAK1 assoziiert. Die Bindung eines Interferons des Typs I führt zu einer Heterodimerisierung der Rezeptoren IFNAR1 und IFNAR2 und zu einer Aktivierung der Janus-Kinasen. Die aktivierten Janus-Kinasen phosphorylieren den Rezeptor. Dadurch entsteht eine Bindungsstelle für die SH2-Domänen von nachgeschalteten Signalproteinen wie den STAT-Proteinen 1 und 2. Die gebundenen STAT-Proteine werden phosphoryliert und dimerisieren als STAT1-Homodimere oder STAT1-STAT2-Heterodimere. Die Dimere dissoziieren von dem Rezeptor und werden in den Nukleus importiert. Die STAT1-STAT2-Heterodimere bilden mit dem DNA-bindendem-Protein IRF9 (Interferon Regulatory Factor) einen heterotrimeren Transkriptionsfaktoren-Komplex, der ISGF3 genannt wird. Dieses ISGF3 bindet die DNA an das ISRE, dem Interferon-Stimulated Response Element. Das STAT1-Homodimer bindet als Transkriptionsfaktor-Komplex die DNA an das GAS-Element der Interferon- γ -active site.

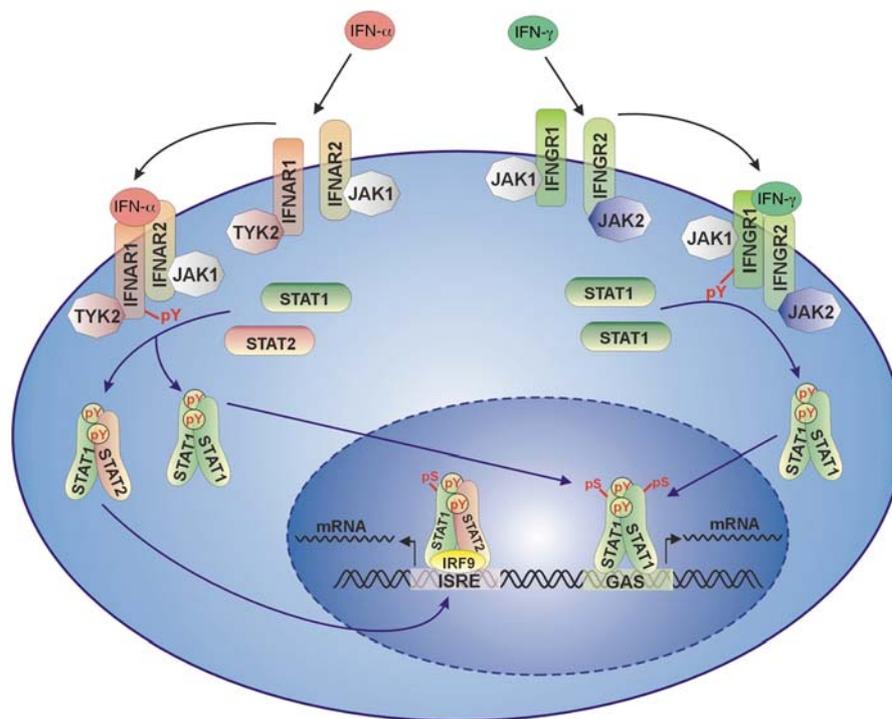


Abbildung 1: Die Interferone des Typs I und II aktivieren beide den JAK-STAT-Signalweg ²⁶. Die Interferone des Typs I bzw. II binden an ihre jeweiligen Rezeptoren (IFNAR 1 bzw. 2, IFNGR 1 bzw. 2) und aktivieren die an den Interferon-Rezeptor gebundenen Janus-Kinasen (JAK1, JAK2 oder TYK2). Die Janus-Kinase phosphoryliert ein Tyrosin einer Untereinheit des Rezeptors. Durch die Phosphorylierung entsteht eine Bindungsstelle für die SH2-Domäne von nachgeschalteten Signalproteinen wie den STAT-Proteinen (Signal Transducer and Activators of Transcription). Diese werden phosphoryliert, dissoziieren und bilden Dimere. Am Rezeptor der Typ I Interferone (IFNAR 1) binden STAT1 und STAT2. Die phosphorylierten Proteine bilden STAT1-Homodimere sowie STAT1-STAT2-Heterodimere. Am Rezeptor für die Typ II Interferone (IFNGR 2) binden nur STAT1-Proteine. Die phosphorylierten Proteine dissoziieren und bilden Homodimere. Die STAT-Dimere werden in den Zellkern importiert. Im Nucleus interagieren die STAT1-STAT2-Heterodimere mit dem IRF9-Protein und binden die DNA an das ISRE (Interferon-stimulated Response Element). Die STAT1-Homodimere binden die DNA an der GAS-Sequenz (Interferon- γ -activated site).

Das Interferon- γ (IFN- γ) bindet an einen Rezeptorkomplex, der durch die Dimerisierung je eines Proteinmoleküls des Interferon- γ -Rezeptors 1 (IFNGR1) und des Interferon- γ -Rezeptors 2 (IFNGR2) gebildet wird. Diese sind mit den Janus-Kinasen JAK1 bzw. JAK2 assoziiert. Die Bindung eines Interferons des Typs II führt zu einer Heterodimerisierung der Rezeptoren IFNGR1 und IFNGR2 und zu einer Aktivierung der Janus-Kinasen. Die aktivierten Janus-Kinasen phosphorylieren den Rezeptor. Dadurch wird eine Bindungsstelle für die SH2-Domänen des STAT1-Proteins gebildet. Die gebundenen STAT1-Proteine werden phosphoryliert und dimerisieren als STAT1-Homodimere. Die Dimere dissoziieren von dem Rezeptor und werden in den Nucleus importiert. Dort binden sie, wie die durch den Signalweg der Interferone des Typs I gebildeten STAT1-Homodimere, die DNA an das GAS-Element.

1.4 Die Interferon induzierte intrazelluläre Immunantwort

Neben der Immunabwehr, die auf Zell-Zell-Interaktionen basiert, gibt es eine unabhängige Immunantwort, die innerhalb einer Zelle stattfindet. Diese beruht auf einer durch Interferon induzierten, intrazellulären Inaktivierung der Pathogene.

Bei der intrazellulären Immunantwort werden verschiedene antivirale Proteine aktiviert, die über verschiedene Reaktionswege die Transkription und die Translation von Viren blockiert²⁶. Zu den antiviralen Proteinen, deren Eigenschaften besonders gut charakterisiert sind, gehören die dsRNA-abhängige Protein Kinase (PKR), das 2'-5'-Oligoadenylat Synthetase System (OAS), die Mx-Proteine sowie die 47-kDa und die 65-kDa Familien der Guanylat-bindenden Proteine^{18,22,29-31}. Die Eigenschaften der PKR und der OAS werden in den folgenden Abschnitten zusammengefasst. Die Beschreibung der Mx-Proteine und der GBPs erfolgt in dem Abschnitt über die GTP-bindenden Proteine.

1.4.1 Die dsRNA-abhängige Protein Kinase (PKR)

Die PKR ist eine Serin/Threonin Kinase, die durch die Interferone des Typs I und II induziert wird. Durch die Bindung von dsRNA wird die PKR aktiviert. Dabei kommt es zu einer Konformationsänderung, bei der eine katalytische Domäne zugänglich wird. Die aktivierte PKR dimerisiert und es erfolgt eine Phosphorylierung der interagierenden Proteinmoleküle. Die PKR katalysiert die intermolekulare Phosphorylierung von sechs Proteinsubstraten. Dazu gehört die α -Untereinheit des Initiationsfaktors der Translation eIF2. Die Phosphorylierung von eIF2 α führt zu einer schnellen Inhibierung der Translation^{18,29}. Der antiproliferative Effekt von Interferon- α ist zum Teil auf die PKR zurückzuführen.

1.4.2 Das 2'-5'-Oligoadenylat Synthetase System (OAS)

Das 2'-5'-Oligoadenylat Synthetase System (OAS) wird durch die Bindung von dsRNA aktiviert. Die Bindung von dsRNA induziert die Synthese von kurzen 2'-5'-Oligoadenylaten. Die 2'-5'-Oligoadenylate binden mit einer hohen Affinität an die Endoribonuklease L (RNaseL). Die RNaseL wird dadurch aktiviert und dimerisiert. Die aktivierte RNaseL induziert die Spaltung von einzelsträngiger RNA (ssRNA) einschließlich mRNA. Außerdem wird die 28S ribosomale RNA gespalten. Die Spaltung der ssRNA und der 28S ribosomalen RNA verhindert die Translation^{18,29}.

1.5 Allgemeine Eigenschaften der GTP-bindenden Proteine

Die Familie der GTP-bindenden Proteine besitzt eine zentrale Rolle bei vielen zellulären Prozessen. Dazu gehören die Proteinbiosynthese, die intrazelluläre Signalweiterleitung, der vesikuläre Transport und die Kontrolle des Wachstums und der Differenzierung der Zelle ³².

Die GTP-bindenden Proteine können anhand ihrer Funktion und von Sequenzhomologien in fünf Superfamilien eingeteilt werden. Dies sind: die α -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine ($G\alpha$), die kleinen GTPasen der Ras-Superfamilie (Ras, Rho, Ran, Rab, Arf, etc), die Translationsfaktoren der Proteinbiosynthese (IF-2, EF-Tu, EF-G, RF-3), der Signalerkennungspartikel SRP und sein Rezeptor SR, sowie die großen GTP-bindenden Proteine (z. B. Dynamin, GBP, Mx). Zusätzlich gibt es GTP-bindende Proteine, die sich keiner dieser Familien zuordnen lassen (z. B. Septine, Fuzzy Onions (Fzo1), p190-RhoGAP). Einige Mitglieder der Familie der GTP-bindenden Proteine, wie die Mx-Proteine und die GBPs, gehören zu den Proteinen, deren Expression durch die Interferone induziert wird.

1.5.1 Sequenzmotive der G-Domäne

Zwei Eigenschaften haben alle GTP-bindenden Proteine gemeinsam: die Mg^{2+} -abhängige Bindung von GTP und die Hydrolyse von GTP zu GDP und Orthophosphat. Diese Eigenschaften werden durch die in Abbildung 2 gezeigten konservierten Sequenzmotive vermittelt ³³.



Abbildung 2: Konservierte Sequenzmotive von GTP-bindenden Proteinen. Die α -, β - und γ -Phosphate des Nukleotids werden durch das G1-Motiv kontaktiert. Das Mg^{2+} wird durch das G1-Motiv und das nachfolgende Threonin (G2) koordiniert. Das γ -Phosphat wird zusätzlich durch das Glycin des dritten Sequenzmotives (G3) kontaktiert. Für die spezifische Erkennung der Guaninbase sind die Motive G4 und G5 verantwortlich. Das fünfte Motiv ist nur in der Ras-Familie konserviert. (x: beliebige Aminosäure)

Das Motiv G1 ³³ (GxxxxGK(S/T)) wird auch als P-Schleife ³⁴ oder Walker A Motiv ³⁵ bezeichnet. Die P-Schleife kontaktiert das α -, β - und γ -Phosphat des Nukleotids. Der Kontakt erfolgt über mehrere Amidwasserstoffbrücken der Hauptkette sowie über die ϵ -Aminogruppe des Lysins. Die Koordination des Mg^{2+} -Ions der GTP- und GDP-gebundenen Form erfolgt über die Hydroxylgruppe des Serins oder des Threonins. Das zweite Motiv (G2) ist ein hoch konserviertes Threonin, das im Schalter I-Bereich bzw. in der Effektorregion der kleinen GTP-bindenden Proteine liegt ³⁶. Die Hydroxylgruppe dieses Threonins ist an der

Koordination des Mg^{2+} -Ion beteiligt. Zusätzlich kontaktiert es mit dem Amidwasserstoff seiner Hauptkette das γ -Phosphat des Nukleotids. Das als G3 bezeichnete dritte streng konservierte Bindungsmotiv DxxG liegt im Schalter II (*switch II*). Durch das Glycin des G3-Motives wird das γ -Phosphat des Nukleotids kontaktiert.

Die Interaktionen der Motive G2 und G3 finden nur in der GTP-gebundenen Form statt. Durch die Interaktionen des hoch konservativen Threonins und des Glycins mit dem γ -Phosphat wird die Nukleotidhydrolyse in eine Konformationsänderung umgesetzt³⁷⁻⁴⁰.

Für die spezifische Erkennung der Guaninbase ist das Motiv G4 ((N/T)KxD) verantwortlich. Das Motiv G4 bindet die Base, indem es zwei Wasserstoffbrücken zwischen der Seitenkette des Aspartats und der Base bildet. Die Struktur der Nukleotidbindungsstelle wird von den beiden anderen konservierten Resten des Motivs G4 stabilisiert. Die Stabilisierung erfolgt durch Kontakte zur P-Schleife.

Das Motiv G5 (SAK) ist nur in der Ras-Familie konserviert und ist dort an der Erkennung der Guaninbase beteiligt. Das Amidproton des Alanins ist entscheidend an der Diskriminierung der Adeninbase beteiligt⁴¹.

Die GTP-bindenden Proteine, deren dreidimensionale Struktur aufgeklärt ist, haben eine überraschend einheitliche zentrale nukleotidbindende Domäne. Die Strukturen von Ras^{38,42,43}, den Ras-homologen Proteinen wie Rho⁴⁴, Rab⁴⁵ und Arf⁴⁶, sowie anderen GTP-bindenden Proteinen wie der α -Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins G_i ⁴⁷, Transducin⁴⁸, dem Elongationsfaktor Tu aus *E. coli*⁴⁹, hGBP1⁵⁰, sowie FtsY und Ffh^{51,52} weisen auf ein gemeinsames Ursprungprotein hin. Die Faltungseinheit dieses Proteins, die so genannte G-Domäne, wurde während der Evolution konserviert.

1.5.2 Der GTPase-Zyklus der GTP-bindenden Proteine

Viele der fundamentalen zellulären Prozesse werden durch GTP-bindende Proteine reguliert. Der GTPase-Zyklus dieser Proteine verläuft nach einem gemeinsamen Prinzip von GTP-Bindung und Hydrolyse^{32,33}.

Bei den meisten GTP-bindenden Proteinen wird die biologische Aktivität durch einen Zyklus zwischen einer GTP- und einer GDP-gebundenen Form reguliert. Im GDP-gebundenen Zustand sind die Proteine in der Regel inaktiv. Durch den Austausch von GDP gegen GTP werden die Proteine in einen aktiven Zustand überführt. Die Hydrolyse des GTP zu GDP und Orthophosphat inaktiviert das Protein wieder.

Wie lange sich das Protein im aktiven Zustand befindet wird damit durch die Geschwindigkeit der GTP-Hydrolyse bestimmt.

Die Abbildung 3 zeigt am Beispiel der kleinen GTPase Ras den GTPase-Zyklus der meisten GTP-bindenden Proteine.

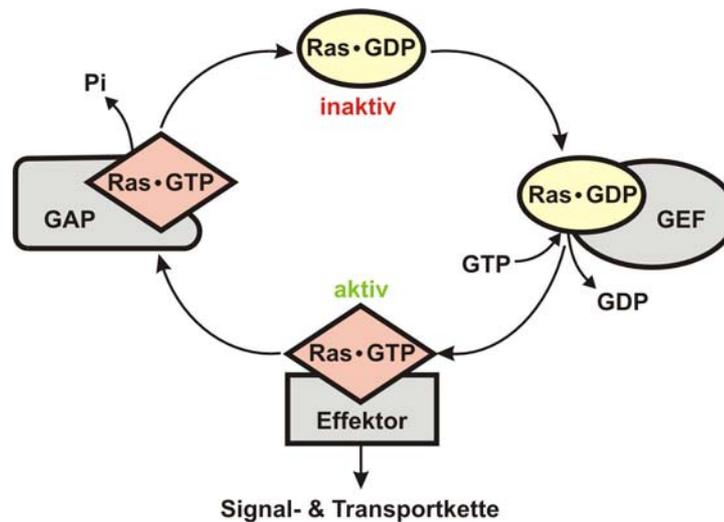


Abbildung 3: Der GTPase-Zyklus von GTP-bindenden Proteinen. Ein GTP-bindendes Protein wie z.B. Ras wird durch den Austausch des Nukleotids vom GDP-gebundenen in den GTP-gebundenen Zustand überführt. Durch den Nukleotidaustausch wird das Protein in den aktiven Zustand überführt. Der Austausch von Guanidin-Diphosphat (GDP) gegen Guanidin-Triphosphat (GTP) wird durch Guanidinnukleotid-Austausch-Faktoren (GEF) katalysiert. Der Austausch bewirkt eine Konformationsänderung und aktiviert die GTPase. Das aktive GTP-bindende Protein kann an seine Effektorproteine binden. Die Hydrolyse von GTP zu GDP und Orthophosphat (P_i) kann durch GTPase-aktivierende Proteine (GAP) beschleunigt werden. Durch die Hydrolyse wird das Protein inaktiviert.

Der Austausch von GDP gegen GTP wird durch einen Guanidinnukleotid-Austausch-Faktor (GEF) katalysiert. Der Austausch des Nukleotids führt zu einer Konformationsänderung und der Aktivierung des Proteins. Das aktive GTP-gebundene Protein kann mit Effektorproteinen interagieren. Die Inaktivierung der GTP-bindenden Proteine erfolgt durch die Hydrolyse des GTP zu GDP und Orthophosphat. Die Hydrolyse kann durch GTPase-aktivierende Proteine (GAP) beschleunigt werden.

1.6 Große GTP-bindende Proteine

In der Dynaminfamilie werden einige der großen GTP-bindenden Proteine zusammengefasst⁵³. Als Dynamamin-verwandte Proteine werden unter anderem folgende Proteine bezeichnet: das Vacuolar-Protein-Sorting-1-Protein (Vps1p), das Dynamamin-related-Protein (Dnm1p), das Mitochondrial Genome Maintenance 1-Protein (Mgm1p), das Arabidopsis-Dynamamin like Protein 1 (ADL1), das Mx-Protein und die Guanylat-bindenden Proteine (GBP).

Die Proteine der Dynaminfamilie besitzen einige gemeinsame Merkmale, die sie von anderen GTPasen unterscheiden. Die Größe dieser Proteine liegt zwischen 60 und 100 kDa. Die Abbildung 4 zeigt ein weiteres Merkmal dieser Familie. Sie besitzen alle eine GTPase-Domäne (G-Domäne), eine Mitteldomäne und eine GTPase-Effektor-Domäne (GED). Die GTPase-Effektor-Domäne (GED) wurde ursprünglich als

Coiled-coil-Domäne bezeichnet. Die echten Dynamine haben zwischen der GTPase-Domäne und der Mitteldomäne eine PH-Domäne (Pleckstrin Homology). An ihrem C-Terminus besitzen sie eine prolin- und argininreiche Domäne (PRD-Domäne).

Die Proteine der Dynaminfamilie unterscheiden sich in ihren biochemischen Eigenschaften von anderen GTP-bindenden Proteinen. Charakteristisch für die großen GTP-bindenden Proteine ist eine niedrige Nukleotidaffinität und eine hohe konzentrationsabhängige GTPase-Aktivität⁵⁴. Die GTPase-Aktivität wird durch eine nukleotidabhängige Oligomerisierung stimuliert. Ihre biochemischen Eigenschaften versetzen die Proteine der Dynaminfamilie in die Lage, den GTPase-Zyklus schnell zu durchlaufen. Sie sind vermutlich nicht auf die Mithilfe von GAPs oder GEFs angewiesen. Für Dynamin konnte nachgewiesen werden, dass die GTPase-Effektor-Domäne (GED) die GTP-Hydrolyse stimuliert^{55,56}.



Abbildung 4: Domänenstruktur von Mitgliedern der Dynaminfamilie der großen GTP-bindenden Proteine. Alle Mitglieder enthalten eine GTPase-, eine Mittel- und eine GTPase-Effektor-Domäne. Echte Dynamine haben zwischen der Mitteldomäne und der GED eine PH-Domäne und am C-Terminus eine Prolin- und Argininreiche Domäne (PRD). Andere Mitglieder verfügen über abweichende Segmente. Bis auf hGBP1 weisen die anderen Mitglieder eine hohe Primärsequenzhomologie in der GTPase- und Mitteldomäne auf. Abkürzungen: h., *Homo sapiens*, s., *Saccharomyces cerevisiae*, c., *Caenorhabditis elegans*. (übernommen nach (Praefcke, 2001)⁵⁷)

Es sind bisher erst wenige Proteine bekannt, die mit einem Protein der Dynaminfamilie interagieren.

Für die Mitglieder der Dynaminfamilie konnte eine Funktion bei der Endocytose oder der Abwehr viraler und mikrobieller Pathogene nachgewiesen werden. Es konnte jedoch bisher nicht geklärt werden, ob es sich bei Dynamin und den Dynamin-verwandten Proteinen um molekulare Regulatoren oder um chemo-mechanische Enzyme handelt⁵⁸.

1.6.1 Dynamin

Dynamin ist zuerst als ein Mikrotubuli-bindendes Protein aus Rindergehirnen extrahiert worden^{59,60}. Eine Vernetzung und Bündelung von Mikrotubuli durch Dynamin ist *in vitro*, jedoch nicht *in vivo* nachweisbar⁶¹⁻⁶³.

Menschen verfügen über drei Dynamingene, die in verschiedenen Geweben exprimiert werden. Das Dynamin 1 wird spezifisch in neuronalem Gewebe exprimiert. Dynamin 2 ist ubiquitär, während Dynamin 3 vor allem in den Hoden, der Lunge und im Gehirn exprimiert wird⁶³⁻⁶⁵.

Im Vergleich zu den kleinen GTP-bindenden Proteinen besitzt Dynamin eine hohe intrinsische GTPase-Aktivität und eine niedrige Affinität zu GTP⁶⁶. Das nukleotidfreie Dynamin liegt bei einer physiologischen Ionenstärke in einem Gleichgewicht aus Mono- und Tetrameren vor⁶⁷. *In vitro* lagern sich bei einer niedrigen Ionenstärke die Tetramere zu gestaffelten Ringen und Spiralen zusammen⁶⁸. Die Zusammenlagerung der Tetramere zu Ringen wird unter physiologischer Ionenstärke durch die Zugabe von GDP und Aluminium- oder Berylliumfluorid induziert⁶⁹. Unter Bedingungen, welche die Oligomerisierung von Dynamin fördern, kann die GTPase-Aktivität von Dynamin um das fünfzehnfache gesteigert werden⁷⁰⁻⁷².

Die Röntgenstrukturanalyse der isolierten GTPase-Domäne von Dynamin A aus *Dictyostelium discoideum* zeigt, dass die GTPase-Domäne das klassische Kernmotiv der G-Proteine einschließt, welches der GTPase-Domäne von Ras ähnelt⁷³. Die GTPase-Domänen von Dynamin A und Ras unterscheiden sich in einigen Punkten. So besteht sie nicht aus einem sechssträngigen β -Faltblatt, sondern aus einem zentralen achtsträngigem β -Faltblatt mit einer Insertion von 55 zusätzlichen Aminosäuren. Ein weiterer Unterschied ist die zusätzliche N-terminale Helix αA . Diese interagiert mit dem C-terminalen Ende der Helix $\alpha 5$, die am Ende der GTPase-Domäne liegt⁷³. Die beiden Helices bilden eine hydrophobe Furche.

Die Mitteldomäne interagiert mit der GED^{55,74,75}. Über die PH-Domäne interagiert Dynamin mit verschiedenen Phospholipiden. Die stärkste Interaktion erfolgt mit PI(4,5)P₂⁷⁶⁻⁷⁸. Die PH-Domäne ist essentiell für die Endocytose^{79,80}. Sie ist an der Homotetramerisierung nicht beteiligt und ist *in vitro* ein negativer Regulator für die GTPase-Aktivität⁵⁵.

Die GED interagiert mit der GTPase-Domäne und der Mitteldomäne und bildet Dimere oder Tetramere^{55,56,74,75}. Die Strukturdaten suggerieren, dass die hydrophobe Furche der GTPase-Domäne die Kontaktstelle für die GED sein könnte⁷³. Die Interaktion der isolierten GED mit Dynamin führt zu einer Erhöhung der basalen GTPase-Aktivität, was eine Funktion der GED als GAP nahe legt⁵⁶.

Die PRD enthält Bindungsstellen für die SH3-Domänen einer Vielzahl von Proteinen⁸¹⁻⁸⁸. Diese Interaktionen sind für die Endocytose essentiell, da Dynamin durch diese Interaktion zu den Clathrin umhüllten Vertiefungen der Membran gebracht wird⁸⁹. Durch die Interaktion der PRD mit der SH3-Domäne verschiedener Proteine wie z.B. GRB2 sowie durch die Bindung von Phospholipiden durch die PH-Domäne wird die GTPase-Aktivität stimuliert⁹⁰.

Die cDNA von Dynamin ist zu 81 % homolog zu dem *shibire* Locus in *Drosophila melanogaster*^{91,92}. Die temperatursensitive Mutante *shibire* führt bei der nicht permissiven Temperatur zu einer schnellen und reversiblen Lähmung der adulten Drosophila⁹³. Die Lähmung kann auf einen Defekt bei der Endocytose zurückgeführt werden⁹⁴⁻⁹⁶, bei dem es an der Plasmamembran zu einer Akkumulation von Clathrin umhüllten Vertiefungen (*coated pits*) kommt⁹⁵. Dies führt zu einer Verarmung der Synapsen an Vesikeln⁹⁴. Die essentielle Funktion von Dynamin bei der Clathrin vermittelten Endocytose wird durch Dynamin-Mutanten bestätigt. In Zellkulturexperimenten wird die Endocytose blockiert, wenn die Zellen mit Dynamin-Mutanten transfiziert werden, die GTP nur schwach binden und hydrolysieren⁹⁷⁻⁹⁹. Die Mutation führt zu einer gleichmäßigen Verteilung von Dynamin an den Clathrin umhüllten Vertiefungen. Dynamin akkumuliert bei den Zellen der *shibire* Mutante sowie bei Zellen, die mit dem schwer hydrolysierbaren GTP-Analog GTP γ S behandelt werden, an den Hälsen der sich bildenden Clathrin umhüllten Vertiefungen^{94,100}. Eine Anlagerung von Dynamin an die Clathrin umhüllten Vertiefungen wird verhindert, wenn die Interaktion der PRD von Dynamin mit den SH3-Domänen anderer Proteine blockiert ist^{89,101}. Isoliertes Dynamin lagert sich *in vitro* an anionische Liposome an und formt diese in einer helikalen Struktur zu geordneten Röhren. Eine Verengung des Durchmessers der Dynamin-Lipidröhren bis hin zu einer Abschnürung von Vesikeln kann durch die Zugabe von GTP, nicht aber von GDP oder GTP-Analoga induziert werden¹⁰². Der genaue Mechanismus der Vesikelabschnürung ist unklar.

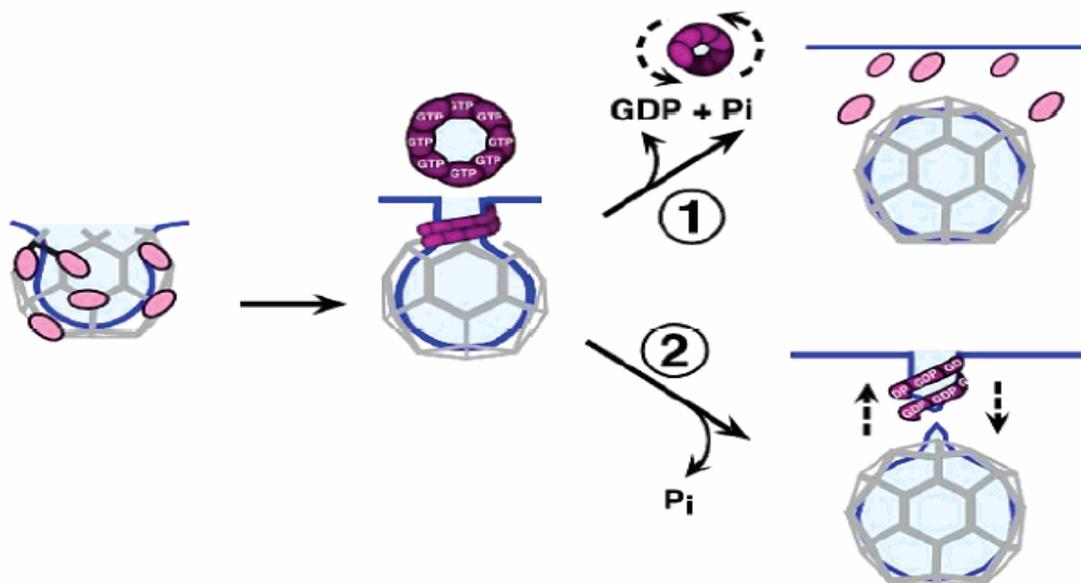


Abbildung 5: Dynamin als mechanochemische GTPase (nach Song & Schmid, 2003⁵⁸). Dynamin lagert sich an die Clathrin umhüllte Vertiefung an und sammelt sich am Hals des sich einschnürenden Vesikels. Die Abbildung zeigt zwei verschiedene Modelle der Abschnürung. Beim ersten Modell (1) erfolgt die Abschnürung des Vesikels durch eine Verengung des Dynamin-Helix-Rings. Bei einem zweiten Modell (2) erfolgt die Abschnürung durch eine Vergrößerung der Ganghöhe der Dynamin-Helix.

Die Abbildung 5 zeigt zwei der möglichen Modelle, wie Dynamin als mechanochemische GTPase an der Abschnürung der Vesikel beteiligt ist. In einem vorgeschlagenen Modell (Abbildung 5 (1)) führt die Ver-

engung der Dynamin-Helix um die Lipidröhre zur Vesikelbildung^{102,103}. In einem zweiten Modell (Abbildung 5 (2)) lagert sich Dynamin in Spiralen um die Lipidröhren und bewirkt eine schnelle Vergrößerung der Ganghöhe, die zu einer Vesikelabschnürung führt¹⁰⁴. Die Streckung der Helix könnte auch zusammen mit der Verengung der Lipidröhre zu einer Vesikelabschnürung führen^{105,106}. Ein weiteres Modell ist, dass die Plasmamembran durch Dynamin direkt destabilisiert wird, da die Insertion von Dynamin in die Membran die Oberflächenspannung verändert¹⁰⁷.

Die Abbildung 6 zeigt, dass Dynamin wie die GTPasen der Ras- und G α -Familien die Funktion eines molekularen Schalters haben könnte. Die GTP-gebundene Form von Dynamin bindet an die Clathrin umhüllten Vertiefungen. Es wird angenommen, dass die biologisch aktive Form von Dynamin die GTP-gebundene Form ist. Im GTP-gebundenen Zustand rekrutiert oder aktiviert Dynamin die eigentliche Spaltungsmaschinerie, welche zur Abschnürung des Vesikels führt⁵⁶.



Abbildung 6: Dynamin als eine regulatorische GTPase (nach Song & Schmid⁵⁸). Die GTP-gebundene Form von Dynamin lagert sich an die Clathrin umhüllten Vertiefungen an. In einem zweiten Schritt rekrutiert oder aktiviert Dynamin Effektormoleküle, die für die Abschnürung des Vesikels benötigt werden.

Die typischen regulatorischen GTPasen interagieren mit einem GTPase-Aktivierendem-Protein (GAP). Die GED von Dynamin beeinflusst die GTP-Hydrolyse als ein intramolekulares GAP. Den Einfluss der GTPase-Aktivität und der GED auf die Endocytose zeigen die Mutation eines konservierten Arginins und eines konservierten Lysins in der GED. Die Stimulierung der GTPase-Aktivität durch die GED wird durch die Mutation eines konservierten Arginins in der GED inhibiert⁵⁶. Die verlangsamte GTPase-Aktivität führt zu einer schnelleren Einschnürung der Vesikelhalse, während die eigentliche Abschnürung blockiert ist^{56,108}. Die Mutation des Lysins beeinflusst die Selbstassemblierung des Dynamins und blockiert die Einschnürung der Vesikelhalse^{56,108}.

Bei dem Recycling synaptischer Vesikel gibt es eine Verbindung zwischen Dynamin und der *Nucleoside Diphosphate Kinase* (NDPK)¹⁰⁹. Dynamin hat eine niedrige Affinität für GTP und eine hohe GTP-Hydrolyserate. Dynamin benötigt eine hohe zelluläre Konzentration von GTP um optimal funktionieren zu können. Die hohen Konzentrationen von GTP können entweder durch eine cytosolische Aktivität oder durch die räumliche Nähe der NDPK bereitgestellt werden. Eine Interaktion der PRD von Dynamin 1 mit

der NDPK ist *in vitro* nachweisbar ¹¹⁰. Die Abbildung 7 zeigt ein mögliches Modell für die Wechselwirkung von Dynamin und der NDP-Kinase.

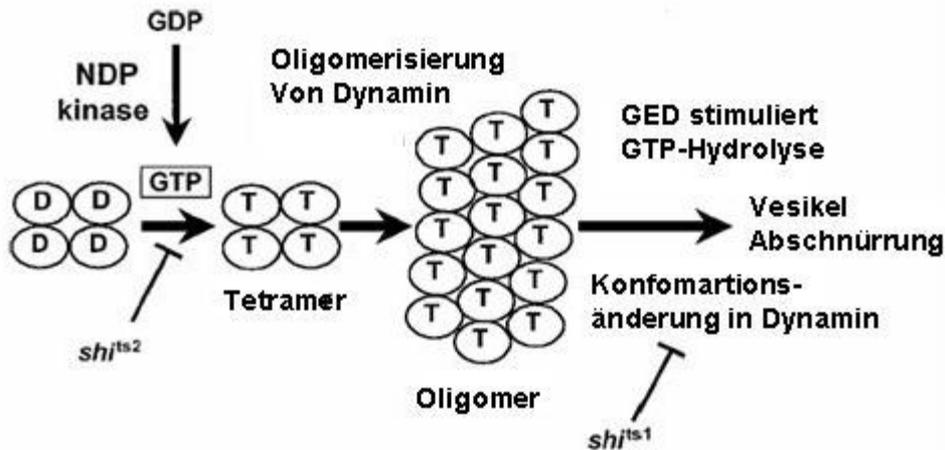


Abbildung 7: Modell für die Regulierung der Funktion von Dynamin (nach Narayanan ¹¹¹). Dynamin liegt in der GDP-gebundenen Form als Tetramer vor. Das GTP wird durch NDP Kinase gegen GDP ausgetauscht und die GTP-gebundene Form von Dynamin oligomerisiert. Die GTP-Hydrolyse wird durch die Intramolekulare GAP-Aktivität der GED stimuliert ⁵⁶ und bewirkt in Dynamin eine Konformationsänderung ¹¹², die zur Abschnürung des Vesikels führt.

Dynamin liegt in der GDP-gebundenen Form als Tetramer vor. Der Austausch von GDP gegen GTP ermöglicht eine Oligomerisierung von Dynamin. Die GED stimuliert die GTP-Hydrolyse und bewirkt eine Konformationsänderung, die zur Abschnürung eines Vesikels führt.

In *Drosophila melanogaster* führt die Mutation des NDPK Gens in den temperatur-sensitiven *shibire* Mutanten (*shi^{ts2}*) zu einer Verringerung der Temperatur, bei der die Lähmung auftritt ¹⁰⁹. Es wird angenommen, dass *shi^{ts2}* einen Defekt bei der Bindung von GTP hat ¹¹⁴. Es wird postuliert, dass die NDP-Kinase für Dynamin ein Guaninnukleotid-Austausch-Faktor (GEF) ist ¹¹¹.

1.6.2 Dynamin-verwandte Proteine

Neben den echten Dynaminen gibt es mehrere Dynamin-verwandte Proteine. Diese sind sich strukturell ähnlich, unterscheiden sich jedoch in ihrer Funktion ^{53,54}. In ihrer Struktur unterscheiden sich die Dynamin-verwandten Proteine von den Dynaminen durch das Fehlen der PH-Domäne und der PRD (Abbildung 4). Bei einigen der Dynamin-verwandten Proteine gibt es statt der PH-Domäne zwischen der Mitteldomäne und der GED eine Region mit unterschiedlicher Länge und Sequenz ⁵³.

Auf Grund ihrer unterschiedlichen Funktion werden die Dynamin-verwandten Proteine in vier Gruppen aufgeteilt ^{53,54}.

In der ersten Gruppe werden die Proteine zusammengefasst, die wie Dynamin am Vesikeltransport beteiligt sind ^{53,54}. Zu ihnen gehören VPS1p aus *S. cerevisiae* ¹¹³ und *dyn-1* aus *C. elegans* ¹¹⁴.

Die Proteine der zweiten Gruppe sind in die Teilung der Mitochondrien involviert^{53,54}. Obwohl die Teilung der äußeren und inneren Membran der Mitochondrien zusammenhängen, sind zwei eigenständige Gruppen von Dynamin-verwandten Proteinen involviert⁵⁴. Die erste Untergruppe besteht aus den Proteinen, die an der Teilung der äußeren Membran beteiligt sind. Dazu gehören Dnm1p in *S. cerevisiae*¹¹⁵, DRP-1 in *C. elegans*¹¹⁶ und Drp1/DLP1^{117,118} in Säugetieren. Die Homologe Mgm1 aus *S. cerevisiae*¹¹⁹, Msp1 aus *S. pombe*^{120,121} und das humane OPA1^{122,123} regulieren möglicherweise die Teilung der inneren Mitochondrienmembran.

In der dritten Gruppe werden die pflanzlichen Vertreter der Dynamin-verwandten Proteine zusammengefasst⁵⁴. Dazu gehören das Phragmoplastin/PDL^{124,125} aus der Sojabohne und die Proteine ADL1, ADL2a, ADL2b und ADL3 aus *Arabidopsis thaliana*¹²⁶⁻¹²⁸.

Die letzte Gruppe besteht aus den Dynamin-verwandten Proteinen, die mit Interferon induziert werden können⁵⁴. Dies sind das Mx-Protein^{129,130}, die p47-Guanylat-bindenden Proteine (p47-GBPs) und die p67-GBPs²².

Die Primärsequenzen der Proteine der letzten Gruppe weisen nur geringe Homologien auf. Auf der Ebene der Primärsequenz sind nur die Mx-Proteine eindeutig mit den Dynaminen verwandt.

1.6.2.1 Vps1p

Das Dynamin-verwandte *Vacuolar-Protein-Sorting-1-Protein* (Vps1p) ist zuerst in *S. cerevisiae* nachgewiesen worden¹¹³. Die GTPase-Domäne beeinflusst den Transport von Proteinen zur Vakuole, während die C-terminale Domäne mit der Golgi-Membran interagiert¹³¹⁻¹³³. Vps1p scheint im *trans*-Golgi-Netzwerk in die Clathrin-vermittelte Bildung von Vesikeln involviert zu sein und dabei mit dem Protein Mvp1 zu interagieren^{134,135}. Eine weitere Funktion von Vps1p ist die Regulation der Anzahl der Peroxisomen. Durch eine Mutation von Vps1p wird die Anzahl der Peroxisomen auf ein bis zwei reduziert, die jedoch größere sind¹³⁶.

1.6.2.2 Dnm1p

Das Dnm1-Protein (*Dynamin related*) aus *S. cerevisiae* ist anhand seiner zu Vps1p, und Dynamin homologen Primärsequenz als Dynamin-verwandtes Protein identifiziert worden¹¹⁵. Das mit Dnm1p homologe Protein in Säugern ist Dlp1 (*Dynamin-like-Protein 1*)¹¹⁸. Es ist auch als Drp1 (*Dynamin-related protein*)¹¹⁶ identifiziert worden. Weitere homologe Sequenzen sind aus *C. elegans* und *S. pombe* bekannt^{116,120}. Genetische und morphologische Studien zeigen, dass Dnm1 und Dlp1/Drp1 an der Kontrolle der Morphologie und der Teilung der Mitochondrien beteiligt sind¹³⁷⁻¹⁴¹.

Dnm1p besteht aus einer GTPase-Domäne, einer Mitteldomäne und einer GED. Eine intakte GTPase-Domäne ist essentiell für die Teilung der Mitochondrien¹³⁸. Die Oligomerisierung von Dnm1p erfolgt durch die Interaktion der C-terminalen Domänen¹⁴². Die isolierte Mitteldomäne und die isolierte GED

bilden im Zwei-Hybrid-System Homodimere¹⁴². Biochemisch zeigt Drp1/Dlp1 starke Ähnlichkeiten zu Dynamin. Es liegt bei physiologischen Bedingungen als Tetramer vor. Im Zwei-Hybrid-System interagieren die GTPase- und die Mitteldomäne mit der C-terminalen GED¹⁴³.

Mit Hilfe von Lokalisationsstudien kann gezeigt werden, dass ein Teil des Dnm1p und des Drp1/Dlp1 im Cytosol verbleibt. Das restliche Dnm1p und Drp1/Dlp1 bindet an die äußere Membran der Mitochondrien^{116,117,138,144}. Die Spaltung der Mitochondrien erfolgt an den Stellen der Membran, an denen Gruppen von Dnm1 oder Drp1/Dlp1 binden^{137,139,145-148}. Das an die Membran gebundene Dnm1 interagiert mit Net2p¹⁴⁹. Die Interaktion ist abhängig von der Nukleotidbindung¹⁴⁹.

Die Spaltung der Mitochondrien besteht möglicherweise aus zwei unabhängigen Schritten. Bei dem ersten Schritt kommt es zu einer Einschnürung der Membran, auf die eine Anlagerung von Dnm1 und die Spaltung folgt¹⁵⁰.

Das Protein Drp1/Dlp1 ist nicht nur an der Morphogenese und Spaltung der Mitochondrien beteiligt. Eine weitere Funktion liegt in der Spaltung von Peroxisomen¹⁵¹.

1.6.2.3 Mgm1p

Das Dynamin-verwandte Protein Mgm1p (*Mitochondrial Genome Maintenance 1-Protein*) wurde zuerst in *S. cerevisiae* Mutanten nachgewiesen, die unfähig sind, ihre mtDNA zu erhalten¹¹⁹. Homologe Proteine sind das Msp1p in *Schizosaccharomyces pombe*¹²⁰ und das menschliche Opa1 (*Optic atrophy type 1*)^{122,123}. Die Bindung und Hydrolyse von GTP sowie die Oligomerisierung des Proteins sind essentiell für die Funktion von Mgm1p¹⁵². Es wurde ursprünglich an der Oberfläche der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert^{152,153}. In anderen Studien wird es im Intermembranraum lokalisiert, wobei es fest an die innere Mitochondrienmembran gebunden ist¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Lokalisationsstudien von Msp1 zeigen, dass es auf der Matrixseite mit der inneren Mitochondrienmembran interagiert¹²¹. Das menschliche Homolog Opa1 ist im Intermembranraum lokalisiert, wobei es an der inneren Mitochondrienmembran verankert ist¹⁵⁷.

Mgm1p und seine Interaktionspartner Fzo1p und Ugo1p sind an der Fusion sowohl der inneren als auch der äußeren Mitochondrienmembranen beteiligt^{153,154,156}. Die Fusion der inneren und der äußeren Mitochondrienmembran sind gekoppelt. Bei Hefezellen, die kein Mgm1p bilden, kommt es zu einer Fragmentierung der Mitochondrien. Der Verlust der GTPase-Aktivität von Mgm1p verhindert ebenfalls die Fusion der Mitochondrien¹⁵³.

Von Mgm1 entstehen durch proteolytischen Verdau zwei unterschiedlich lange Isoformen. Für die Morphologie der Mitochondrien und die Erhaltung der mtDNA ist die Bildung beider Isoformen notwendig

¹⁵⁴.

1.6.2.4 Pflanzliche Dynamamin-verwandte Proteine

Phragmoplastin/PDL ist das erste Dynamamin-verwandte Protein, das in Landpflanzen wie der Sojabohne, in einigen Algen und im Teichlebermoos nachgewiesen wurde^{124,125,158}. Während der Zellteilung ist es spezifisch mit den vom Golgi-Apparat abstammenden Vesikeln der Zellplatte assoziiert^{124,125}. Phragmoplastin fehlt wie den anderen Dynamamin-verwandten Proteinen die PRD und die PH-Domäne¹⁵⁹. Über die Interaktion der GTPase-Domäne und der Mitteldomäne benachbarter Moleküle oligomerisiert Phragmoplastin in helikalen Strukturen. In Gegenwart von GTP dissoziieren die Oligomere¹⁵⁹.

Das ARC5-Protein aus *A. thaliana* ist ein Dynamamin-verwandtes Protein, das eine spezifische Funktion bei der Teilung von Plastiden hat¹⁶⁰. Während der Teilung der Plastiden ist ARC5 als eine ringförmige Struktur auf der Oberfläche der äußeren Membran lokalisiert¹⁶⁰. Da in Prokaryonten kein homologes Protein für ARC5 nachgewiesen ist, könnte es evolutionär aus einem eukaryotischen Dynamamin-verwandten Protein entstanden sein¹⁶⁰.

Die in *A. thaliana* gefundenen ADL-Proteine (*Arabidopsis-Dynamamin like Protein*) ADL1, ADL2a, ADL2b, ADL3 und ADL6 unterscheiden sich in ihrer Funktion und ihrer Lokalisation in der Zelle.

Das ADL2a Protein ist in membrangebundenen Kompartimenten der Chloroplasten lokalisiert¹²⁶. Abhängig von dem gebundenen Guaninnukleotid oligomerisiert es zu verschiedenen Strukturen¹⁶¹. Das ADL2b gehört zu den Dynamamin-verwandten Proteinen, die an der Teilung der Mitochondrien beteiligt sind¹⁶².

Die GTP-bindende Domäne von ADL3 zeigt nur wenige Homologien zu der GTP-bindenden Domäne anderer pflanzlicher Dynamamin-verwandter Proteine. Anders als ADL1, ADL2a und ADL2b verfügt es jedoch wie ADL6 über eine PH-Domäne¹⁶³.

Das ADL6-Protein besitzt wie Dynamamin eine PRD und eine Domäne, die möglicherweise der PH-Domäne der Dynamine entspricht¹⁶⁴. Es ist im *trans*-Golgi-Netzwerk lokalisiert und am Vesikeltransport zur Vakuole beteiligt^{164,165}.

1.6.3 Mx-Proteine

Die Gene für die Mx-Proteine sind bei vielen Vertebraten vorhanden. Sie sind bei Fischen, Vögeln und Säugern nachgewiesen worden^{130,166-170}. Sie alle besitzen die für Dynamamin-verwandte Proteine typischen drei Domänen: GTPase-Domäne, Mitteldomäne und GED. Zwischen der Mitteldomäne und der GED befindet sich eine relativ kurze Region, die möglicherweise ungeordnet ist. Anders als Dynamamin und andere Dynamamin-verwandte Proteine sind die Mx-Proteine nicht an eine Membran gebunden.

Die Mx-Proteine werden durch Interferon α und β induziert¹²⁹. An Mx-transgenen Mäusen wurde nachgewiesen, dass sie eine kritische Funktion bei der Immunabwehr von RNA-Viren haben¹⁷¹⁻¹⁷³. Die meisten Vertebraten besitzen zwei bis drei verschiedene Isoformen des Mx-Proteins, die verschiedene antivirale Fähigkeiten besitzen. Nagetiere exprimieren sowohl cytosolische als auch nukleäre Isoformen der

Mx-Proteine, während die meisten anderen Vertebraten ausschließlich cytoplasmatische Mx-Proteine besitzen.

Der molekulare Mechanismus der antiviralen Funktion von Mx scheint davon abhängig zu sein, ob es sich um eine cytosolische oder nukleäre Form des Proteins handelt. Das nukleäre Mx1-Protein aus Mäusen und Ratten blockiert die Replikation des Influenzavirus^{174,175}. Im Zwei-Hybrid-System interagiert Mx1 mit verschiedenen Kernkörperproteinen wie Sp100, Daxx und SUMO-1¹⁷⁶. Das cytoplasmatische Mx2-Protein inhibiert das *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV) jedoch keine Influenza Viren^{174,177}.

Es wurden bisher zwei Mx-Proteine im Menschen nachgewiesen. Das cytoplasmatische MxA-Protein verleiht eine Resistenz gegen das Influenzavirus, das Thogotovirus, das Masernvirus, das La Crosse Virus und gegen VSV^{169,172,178,179}. Die antivirale Aktivität des Proteins variiert dabei je nach Art des Virus. MxA inhibiert die Primärtranskription des VSV und des Masernvirus. Von beiden Viren ist bekannt, dass sie ihr Genom im Cytoplasma transkribieren¹⁸⁰. Die Primärtranskription des Thogotovirus erfolgt im Kern. MxA verhindert die Replikation des Virus, indem es direkt mit dem Nucleocapsid des Virus interagiert und so verhindert, dass es in den Zellkern importiert wird. In der GTP-gebundenen Form interagiert der Wildtyp von MxA über das C-terminale Ende mit dem Nucleocapsid des Thogotovirus. Die GTPase-Aktivität wird dabei erhöht¹⁸¹⁻¹⁸⁴.

Wie bei Dynamin interagiert bei MxA die GED mit der GTPase-Domäne und der Mitteldomäne^{185,186}. Die Oligomerisierung des Proteins stimuliert die GTPase-Aktivität von MxA und verlangsamt die proteolytische Spaltung des Proteins^{182,187}. Unter physiologischen Bedingungen und in Gegenwart von GDP bildet MxA ringförmige Strukturen. Diese Ringe werden durch die Bindung von GTP in Spiralen umgewandelt¹⁸⁸. Die Homooligomere von MxA repräsentieren möglicherweise eine Depotform, während die MxA Monomere die antivirale aktive Form des Proteins ist^{187,188}.

Für das Mx3-Protein aus Nagetieren und für das humane MxB-Protein konnte bisher keine antivirale Wirkung nachgewiesen werden^{169,174}.

1.6.4 Guanylat-bindende Proteine (GBP)

Zwei Familien von GTP-bindenden Proteinen dominieren die zelluläre Antwort auf die Induktion der Genexpression mit Interferon- γ : die p67-kDa und die p47-kDa Familie der Guanylat-bindenden Proteine²². In humanen Fibroblasten, die mit Interferon- γ behandelt wurden, wurde die Synthese von mehreren Proteinen mit einer Größe von 44 kDa bis 68 kDa zuerst nachgewiesen¹⁸⁹.

Zwei dieser Proteine konnten dadurch charakterisiert werden, dass sie an Agarose-immobilisierte Guannukleotide binden, jedoch nicht an andere Nukleotide¹⁹⁰. Diese Proteine binden GTP-, GDP- und GMP-Agarose und zeigen keine Unterschiede bei der Stärke der Bindung. Nach ihren Eigenschaften wurden sie *Guanylate-Binding-Proteins* (GBP) genannt. Die Bindung von Guanylaten ist auch in Lösung spezifisch¹⁹¹.

In Nagetieren wurden zweiundzwanzig und im Menschen ein GTP-bindendes Protein identifiziert, die auf Grund ihrer Primärsequenz und ihrer Struktur in der p47-Familie zusammengefasst werden. Sie besitzen alle das GTP-Bindungsmotiv^{32,33}. Alle Mitglieder der p47-GBP sind durch IFN- γ induzierbar und dominieren mit den p67-GBPs die zelluläre Immunantwort auf IFN- γ ²². Zu ihnen gehören IRG-47, LRG-47, GTPI, IGTP, zwei Isoformen von TGTP/Mg21, fünf Isoformen von IIGP sowie mCINEMA und sein menschliches Homolog hCINEMA^{22,192-196}. Drei der Proteine (LRG-47, IGTP und GTPI) werden in der GMS-Unterfamilie zusammengefasst²². Sie unterscheiden sich von den anderen Proteinen durch einen Austausch in der P-Schleife (GxxxxGKS). Das bei allen anderen GTP-bindenden Proteinen konservierte Lysin ist bei diesen Proteinen durch ein Methionin ersetzt worden²².

Die biochemische Charakterisierung von IIGP1 zeigt, dass IIGP1 wie Dynamamin, Mx oder hGBP1 eine niedrige Affinität für Guaninnukleotide besitzt¹⁹⁷. IIGP1 besitzt eine sehr niedrige, konzentrationsabhängige GTPase-Aktivität¹⁹⁷. Die Oligomerisierung von IIGP1 ist nukleotidabhängig¹⁹⁷.

Die p47-GBPs inhibieren die Vermehrung von intrazellulären Pathogenen. Mäuse die kein LRG-47 exprimieren, sind anfälliger für eine Infektion mit *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocystis* und *Mycobacterium tuberculosis*^{198,199}. In die Immunabwehr gegen *Toxoplasma gondii* sind auch die Proteine IGTP und IRG-47 involviert^{198,200,201}. Die Infektion mit *Listeria monocytogenes* induziert auch die Expression von IIGP²⁰². Für TGTP konnte eine antivirale Wirkung gegen das *Vesicular Stomatitis Virus* nachgewiesen werden¹⁹². Der molekulare Mechanismus der Immunabwehr durch die p47-GBPs ist bisher unbekannt.

1.6.4.1 Biologische Eigenschaften der p67 GBPs

Durch die Klonierung von cDNA konnten bisher fünf verschiedene GBPs im Menschen nachgewiesen werden. Zuerst die beiden Isoformen hGBP1 und hGBP2²⁰³, sowie später die Isoformen hGBP3 (Atlastin 1)^{204,205} und hGBP4 und hGBP5. Während die ersten drei Isoformen biochemisch charakterisiert sind, wurden die letzten beiden Isoformen nur genetisch identifiziert. Die Guanylat-bindenden Proteine konnten nicht nur im Menschen sondern auch in der Maus, in der Ratte und im Huhn nachgewiesen werden. In der Maus wurden fünf Proteine identifiziert, die zu den humanen GBPs homolog sind: mGBP1²⁰³, mGBP2²⁰⁶, mGBP3²⁰⁷, mGBP5²⁰⁸ sowie mag2²⁰⁹. In der Ratte²¹⁰ und im Huhn²¹¹ wurde je ein homologes Protein nachgewiesen.

Die GBPs werden durch die Interferone des Typs I und II, die Interleukine IL-1 α und IL-1 β sowie durch den Tumornekrosefaktor TNF- α induziert. Die Induktion mit IFN- γ ist jedoch sehr viel stärker als durch andere Cytokine^{190,212-214}.

Beim Vergleich der Primärsequenzen zeigt sich, dass es zwischen den GBPs und den anderen großen GTP-bindenden Proteinen der Dynaminfamilie nur eine geringe Homologie gibt. Die GBPs werden jedoch aufgrund struktureller und biochemischer Ähnlichkeiten in die Dynaminfamilie eingeordnet^{50,215}.

In dem Kapitel 1.5.1 wurden die Sequenzmotive der GTP-bindenden Proteine beschrieben. Charakteristisch für die Guanylat-bindenden Proteine ist, dass das für die spezifische Erkennung der Guaninbase verantwortliche vierte Bindungsmotiv abweichend konserviert ist. In den GBPs lautet das konservierte Bindungsmotiv nicht (N/T)KxD sondern (T/A)aRD²¹⁵. Der auf das dritte Bindungsmotiv (DxxG) folgende Rest ist bei GBP wie bei den anderen Mitgliedern der Dynaminfamilie hydrophob. Dieser hydrophobe Rest unterscheidet die Dynaminfamilie von anderen GTP-bindenden Proteinen wie den Proteinen der G α - und der Ras-Familie. Bei diesen folgt auf das dritte Bindungsmotiv ein hydrophiler Rest, meistens ein Glutamin. Der hydrophile Rest beeinflusst die Stärke der GTPase-Aktivität. Wenn durch eine Mutation die hydrophile Aminosäure gegen eine hydrophobe ausgetauscht wird, verringert sich die GTPase-Aktivität. Die Proteine befinden sich nun dauerhaft im aktiven Zustand, was bei Ras zur unkontrollierten Proliferation führt. Die basale GTPase-Aktivität ist bei den Proteinen der Dynaminfamilie erheblich höher als bei den Proteinen der G α - und der Ras-Familie. Dieser Unterschied deutet darauf hin, dass die GTP-Hydrolyse nach einem anderen Mechanismus verläuft.

In ihren biochemischen Fähigkeiten unterscheiden sich die Guanylat-bindenden Proteine deutlich von den anderen GTP-bindenden Proteinen. Sie hydrolysieren GTP zu GDP wie auch zu GMP, wobei das Produktverhältnis von GDP zu GMP temperaturabhängig ist^{211,216,217}. Für die verschiedenen GBPs konnten unterschiedliche Produktverhältnisse nachgewiesen werden. Bei 37 °C hydrolysiert hGBP1 85 % des GTP zu GMP und 15 % zu GDP. Bei 15 °C verschiebt sich das Produktverhältnis zu 44 % GMP und zu 56 % GDP²¹⁵. Die Hydrolyse kann durch die Zugabe von GMP, GDP, GTP γ S und GppNHp, nicht jedoch durch die Zugabe von ATP, CTP, UTP oder cGMP gehemmt werden. Obwohl die GBPs in Lösung befindliches GDP binden, wird es nicht hydrolysiert^{215,216}. Das Produktverhältnis von hGBP1 und hGBP2 unterscheidet sich deutlich. Bei 37 °C hydrolysiert hGBP2 87 % des GTPs zu GDP. In Lösung befindliches GDP, GTP γ S und GppNHp werden durch hGBP2 nicht hydrolysiert²¹⁶. Bei dem aus der Maus isolierten Protein mGBP3 konnte eine Produktion von GMP nicht nachgewiesen werden²⁰⁷. Das aus Hühnern isolierte chGBP hydrolysiert 87 % des GTPs zu GDP und 13 % zu GMP. Damit entspricht sein Produktverhältnis dem von hGBP2²¹¹.

Über die zelluläre Lokalisation der GBPs ist wenig bekannt. Mit Ausnahme der aus Mäusen isolierten Proteine mag2 und mGBP3 besitzen alle GBPs an ihrem C-Terminus ein CaaX-Motiv. Am CaaX-Motiv können die GBPs durch eine Isoprenylierung posttranslational modifiziert werden. Die Form der Isoprenylierung unterscheidet hGBP1 von den anderen GBPs. Bis auf hGBP1 besitzen alle GBPs ein CaaL-Motiv, das eine Geranylgeranylierung signalisiert. Dagegen signalisiert das CaaS-Motiv von hGBP1 eine Farnesylierung. Die Isoprenylierung des CaaX-Motives konnte nicht bei allen GBPs *in vivo* nachgewiesen werden. Eine Isoprenylierung konnte für hGBP1, mGBP1, mGBP2 und für das aus der Ratte isolierte p67 GBP nachgewiesen werden^{206,218-220}. Über das bei der Isoprenylierung des CaaX-Motives an das Protein gebundene Isoprenoid werden viele Proteine an die Zellmembran oder die Kernmembran gebunden. Bei

Lokalisationsstudien wurden viele der GBPs trotz ihrer Isoprenylierung im Cytoplasma und nicht an eine Membran gebunden nachgewiesen^{213,218}. Die unvollständige Membranassoziation von mGBP1 ist nur zum Teil auf die unvollständige Modifikation zurückzuführen²¹⁹. Das effizienter modifizierte mGBP2 wird sowohl durch punktierte cytoplasmatische Strukturen als auch durch vesikuläre Strukturen gebunden^{214,219,221}.

Über die biologische Funktion der Guanylat-bindenden Proteine ist bisher wenig bekannt. Durch die fehlende Expression von mGBP1 wird die Anfälligkeit von Mäusen für virale Infektionen oder maligne Transformationen nicht erhöht²²².

In HeLa-Zellen wird die Vermehrung des *Vesicular Stomatitis Virus* und des *Encephalomyocarditis Virus* durch die stabile oder die transiente Transfektion mit humanen GBP1 gehemmt. Der antivirale Effekt von Interferon- γ wird durch die Expression von *anti-sense* RNA von hGBP1 aufgehoben³¹. Im Vergleich mit dem Mx-Protein ist der antivirale Effekt von hGBP1 jedoch deutlich geringer.

In Endothelzellen, die mit inflammatorischen Cytokinen induziert werden, hat hGBP1 eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung des antiproliferativen Effektes²¹². Die Expression von hGBP1 wird in micro- und macrovasculären Endothelzellen sowie in Endothelzellen des Kaposi's Sarcom durch die inflammatorischen Cytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ induziert. Der anti-proliferative Effekt dieser Cytokine korreliert mit der Expression von hGBP1. Die Transfektion mit der helikalen Domäne jedoch nicht die Transfektion mit der GTPase-Domäne zeigt einen antiproliferativen Effekt. Er ist unabhängig von der GTPase-Aktivität. Die Funktion der helikalen Domäne von hGBP1 könnte die Vermittlung des antiproliferativen Effektes von inflammatorischen Cytokinen auf Endothelzellen sein²¹².

Neben der Proliferation ist das Eindringen von Endothelzellen in die extrazelluläre Matrix eine Schlüsselfunktion der Angiogenese. Das Eindringen der Endothelzellen ist ein Mehrstufenprozess, bei dem die Beweglichkeit der Zellen und die Proteolyse miteinander verknüpft sind^{223,224}. Die angiogenetische Proteolyse ist abhängig von den Matrix Metalloproteinasen (MMPs)²²⁵. In Endothelzellen ist *in vivo* und *in vitro* die Expression von hGBP1 und MMP-1 (Collagenase-1) invers verknüpft²²⁶⁻²²⁸. Die MMP-1 Expression ist die erste identifizierte zelluläre Funktion, deren Regulation durch hGBP1 vermittelt wird. Anders als bei dem antiproliferativen Effekt ist für den anti-angiogenetischen Effekt die GTPase-Aktivität des hGBP1 Wildtyp-Proteins notwendig²²⁷.

Für das Mausprotein mGBP2 wird ebenfalls eine Rolle bei der Proliferation vorgeschlagen. In IFN- γ induzierten Fibroblasten steigert mGBP2 die Proliferation. Die proliferative Wirkung von mGBP2 ist abhängig von der GTPase Aktivität des Proteins²²¹.

Das humane GBP3 wird vor allem im Gehirn exprimiert, wo es sich im Hippocampus und im cerebralen Kortex anreichert. Die N-terminale Region von hGBP3 interagiert mit der C-Terminalen, regulatorischen Domäne von NIK/HGK (NCK-interacting kinase/HPK/GCK-like kinase)²²⁹. Die Interaktion von hGBP3 und NIK/HGK suggeriert einen möglichen Einfluss des JNK Signalwegs bei Interferon induzierten, antiviralen Prozessen. Inzwischen wird hGBP3 zusammen mit verschiedenen humanen Isoformen in eine

eigene Familie eingeordnet und als *Atlastin1* bezeichnet²⁰⁵. Damit besitzt innerhalb der *Dynaminfamilie* die *Atlastin-Familie* die größte Ähnlichkeit zu den *GBPs*.

1.6.4.2 Charakterisierung des humanen Guanylat-bindenden Proteins 1 (hGBP1)

In der Familie der Guanylat-bindenden Proteine ist hGBP1 das Protein, dessen biochemischen und strukturellen Eigenschaften am besten charakterisiert sind.

Die Bindung der Guaninnukleotide GTP, GDP und GMP durch hGBP1 erfolgt mit einer relativ schwachen Affinität, die für diese drei Guanylate im mikromolaren Bereich liegen²¹⁵.

Während die Assoziationskonstanten von hGBP1 und die anderer GTPasen wie Ras und $G\alpha$ ungefähr gleich sind, gibt es deutliche Unterschiede bei den Dissoziationskonstanten. GTP bzw. GDP dissoziieren schneller von hGBP1 als von anderen GTPasen wie Ras und $G\alpha$ ²¹⁵.

HGBP1 besitzt eine intrinsische GTPase-Aktivität, die abhängig von der Proteinkonzentration ist^{50,57}. Das kooperative Verhalten bei der GTP-Hydrolyse deutet auf eine intermolekulare Interaktion der hGBP1-Moleküle hin.

Die nukleotidabhängige Oligomerisierung von hGBP1 ist mit Hilfe der analytischen Größenausschlusschromatographie und der analytischen Ultrazentrifugation nachweisbar^{50,57}. In der analytischen Größenausschlusschromatographie liegt hGBP1 in der nukleotidfreien, in der GMP-gebundenen und der GDP-gebundenen Form als Monomer vor. In Gegenwart von GTP oder seinen Analoga GppNHp oder GTP γ S bildet es ein Dimer. In Gegenwart von GDP und Aluminiumfluorid bildet hGBP1 Komplexe die einem Tri- oder Tetramer entsprechen^{50,57}. In Gegenwart von Aluminiumfluorid bildet hGBP1 keine Komplexe. Die Oligomerisierung kann damit nicht auf den Einfluss des Aluminiumfluorids zurückgeführt werden.

Die mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation bestimmten Sedimentationskoeffizienten für den nukleotidfreien bzw. GppNHp-gebundenen Zustand von hGBP1 bestätigen die analytische Größenausschlusschromatographie.

Die Guanylat-bindenden Proteine unterscheiden sich von allen anderen GTPasen darin, dass sie GTP nicht nur zu GDP sondern auch zu GMP hydrolysieren^{211,216,217}. Die verschiedenen charakterisierten Isoformen unterscheiden sich in dem Verhältnis der Reaktionsprodukte, die abhängig von der Reaktionstemperatur gebildet werden. Von den charakterisierten GBPs zeigt hGBP1 die höchste GMP-Produktion. Bei physiologischen Temperaturen hydrolysiert hGBP1 85 Prozent des GTP zu GMP, während bei 25 °C nur 40 Prozent zu GMP hydrolysiert werden⁵⁷.

Die *single turnover* Kinetik der GTP-Hydrolyse zeigt, dass nicht nur das Dimer, sondern auch das Monomer von hGBP1 katalytisch aktiv ist²³⁰.

Die Quenched Flow Technik zeigt, dass bei der Hydrolyse von GTP kein Pyrophosphat gebildet wird. Es wird eindeutig GDP als Intermediat der Hydrolyse gebildet. Obwohl hGBP1 in der Lage ist, GDP aus der Lösung zu binden, ist es nicht in der Lage es zu hydrolysieren. Bei der GTP-Hydrolyse (Abbildung 8) wird nur ein Teil des gebildeten GDPs weiter zu GMP hydrolysiert, da die weitere Hydrolyse mit einer irreversiblen Inaktivierung des GDP-gebundenen Intermediats konkurriert^{57,230}.

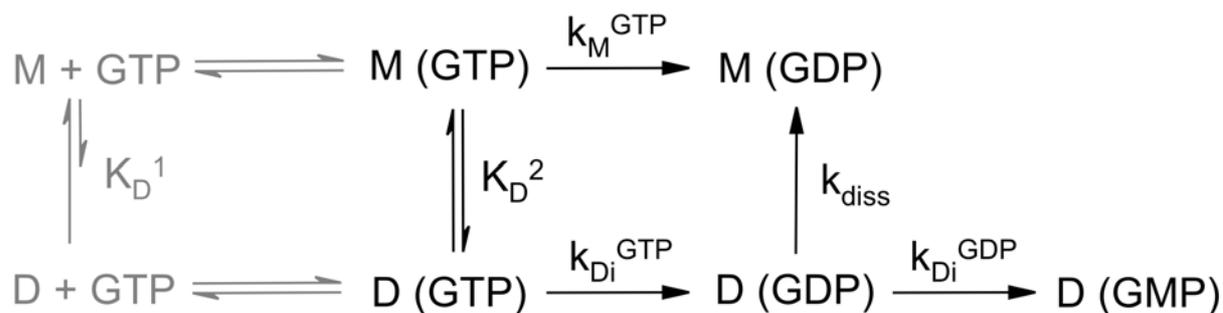


Abbildung 8: Reaktionsschema der GTP Hydrolyse durch hGBP1 (nach Kunzelmann, verändert²³⁰). Das Monomer von hGBP1 wird als M, das Dimer als D bezeichnet. $K_D^{1,2}$ sind die Monomer-Dimer-Gleichgewichte, k_M und k_{Di} die Geschwindigkeitskonstanten der Hydrolyse durch das Monomer und das Dimer. Die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation des Dimers ist k_{diss} . Die Nucleotidbindung ist grau unterlegt.

Die Bildung von tri- oder tetrameren Komplexen von hGBP1 mit GDP und Aluminiumfluorid zeigt, dass bei der GTP-Hydrolyse möglicherweise auch höhere Oligomere beteiligt sind⁵⁰.

Die mit der Röntgenkristallographie bestimmte dreidimensionale Struktur von hGBP1 ist die erste bekannte Struktur eines Mitglieds der Dynamin-Familie (Abbildung 9). Es ist sowohl die nukleotidfreie als auch die GppNHp-gebundene Form bekannt^{50,231}. Die Struktur umfasst die Aminosäurereste 6 bis 583 und zeigt, dass hGBP1 aus zwei Domänen besteht. Jedes Molekül besteht aus einer N-terminalen globulären α/β -GTPase Domäne und einer gestreckten, rein α -helikalen Domäne.

Die Topologie der GTPase-Domäne von hGBP1 und Ras ist ähnlich. Die GTPase-Domäne von hGBP1 ist jedoch um 100 Aminosäuren größer und wird deshalb als LG-Domäne (*large GTP-binding*) bezeichnet⁵⁰. Die LG-Domäne besteht aus einem achtsträngigem β -Faltblatt, umgeben von neun α -Helices. Die GTPase-Domäne von Ras besteht aus einem sechssträngigem β -Faltblatt und fünf α -Helices.

Die Nomenklatur der Sekundärstruktur von hGBP1 beruht auf der von Ras. N-terminal ist die Nomenklatur um die α -Helix α_0 und die β -Stränge β_1 und β_0 sowie C-terminal um die α -Helix α_6 und die β -Stränge β_7 und β_8 erweitert. In der G-Domäne befinden sich fünf Insertionen (I1 bis I5). Die Insertion I1, I2 und I5 vergrößern die Schleife zwischen α_1 und β_2 , zwischen β_3 und α_2 und zwischen β_6 und α_5 . Die Insertion I3 bildet die α -Helix α_3' und I4 bildet α_4' .

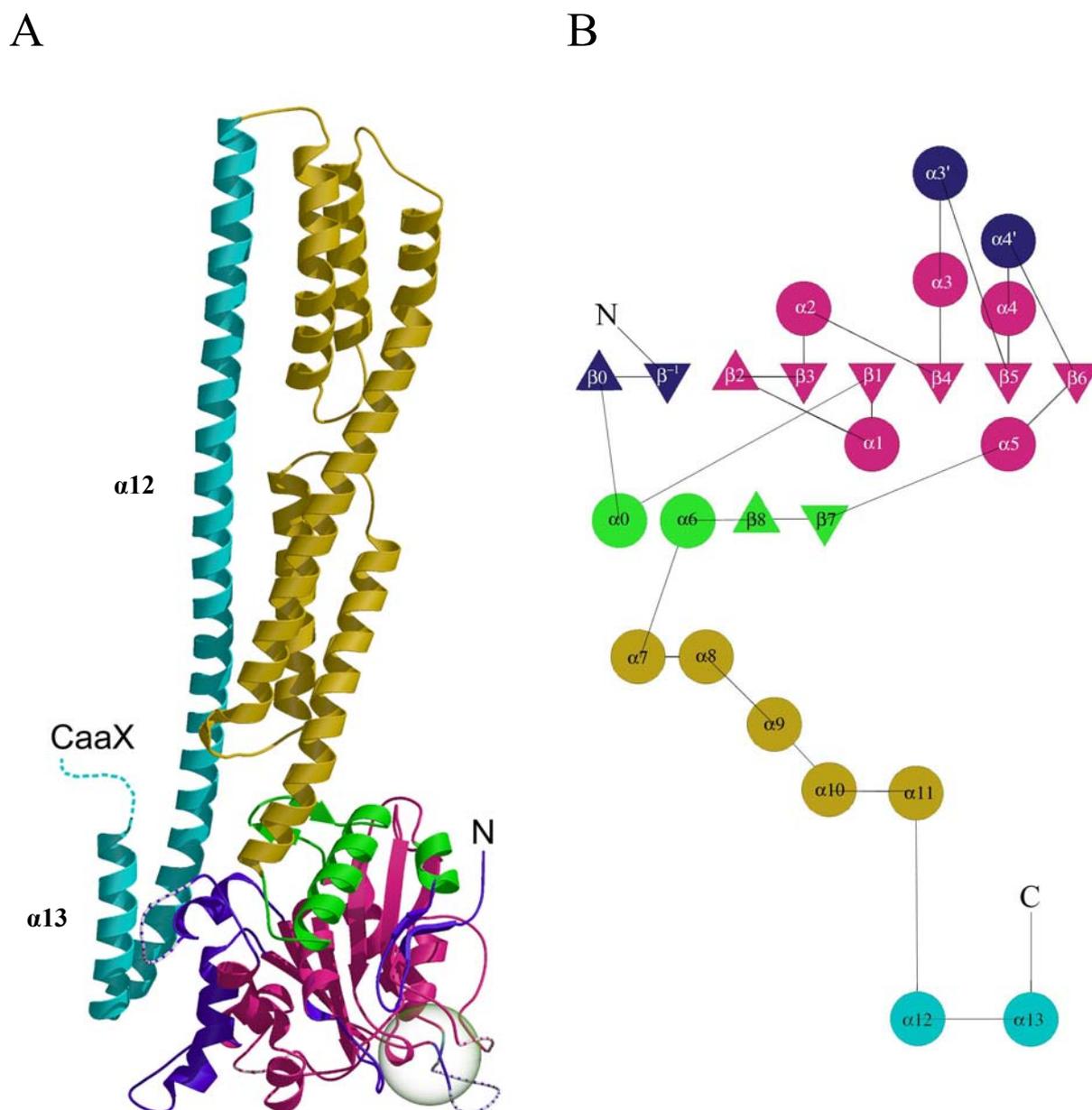


Abbildung 9: Struktur von nukleotidfreiem hGBP1. A: Struktur von nukleotidfreiem hGBP1 in der Bänderdarstellung. Die G-Domäne ist rot, mit den Additionen und Insertionen violett und grün. Die gestreckte α -helikale Domäne wird farblich in ihre Subdomänen unterschieden: die Mitteldomäne ist gelb und die GED blau dargestellt. Gestrichelte Linien zeigen ungeordnete Bereiche an, die Bindungsstelle für Nukleotide liegt in dem als Kugel dargestellten Bereich. B: Topologie von hGBP1 mit den gleichen Farben wie in A. Dreiecke stellen β -Stränge und Kreise α -Helices dar⁵⁰.

Die helikale Domäne wird in zwei Subdomänen unterteilt⁵⁰. Die erste Subdomäne besteht aus den α -Helices 7 bis 11 und die zweite aus den α -Helices 12 und 13. Die α -Helices 7 bis 11 bilden zwei Bündel aus je drei Helices, von denen eine an beiden Bündeln beteiligt ist. Die Helix $\alpha 12$ der zweiten Subdomäne ist sehr lang und führt vom C-terminalen Ende der ersten Subdomäne zurück zur G-Domäne. Die Helix $\alpha 13$ bildet mit dem Ende von $\alpha 12$ eine coiled-coil Struktur⁵⁰. Es gibt nur relativ wenige Wechsel-

wirkungen zwischen $\alpha 12$ und der ersten Subdomäne. Das erste Helixbündel hat sieben Kontakte, das zweite Bündel nur einen Kontakt zu $\alpha 12$. Es gibt noch vier direkte Kontakte zwischen $\alpha 12$ und den Helices $\alpha 3'$ und $\alpha 4'$ der G-Domäne. Zusätzlich gibt es siebzehn Kontakte zwischen $\alpha 12$ und der G-Domäne bzw. der ersten Subdomäne die über Wassermoleküle vermittelt werden. Die von der zweiten Subdomäne bedeckte Oberfläche des Moleküls ist hydrophil. Da nur wenige Bindungen aufgebrochen werden müssten, wurde vorgeschlagen, dass die Loslösung von $\alpha 12$ -13 eine Interaktionsfläche für andere Proteine bieten könnte⁵⁷.

Die Sekundärstruktur von hGBP1 entspricht den Vorhersagen, die für Dynamin und Mx gemacht wurden. Deswegen wird die erste Subdomäne auch nach der Nomenklatur für Dynamin als Mitteldomäne bezeichnet, während die zweite Subdomäne als GED (*Guanylate Exchange Domain*) bezeichnet wird^{50,57}. Die gelöste Struktur der GTPase-Domäne von Dynamin A zeigt jedoch eine unterschiedliche Faltungstopologie und Nukleotidbindung im Vergleich zur G-Domäne von hGBP1. Deswegen wird angenommen, dass die Dynamine und hGBP1 Repräsentanten verschiedener Subfamilie der GTP-bindenden Proteine sind⁷³.

Die im Hefe Zwei-Hybrid-System gefundenen Interaktionen der verschiedenen Domänen von Dynamin können in der Struktur von hGBP1 zum Teil wieder gefunden werden. Dies gilt für die Interaktion der GED mit der G-Domäne und der Mitteldomäne⁵⁷.

Die Struktur von hGBP1 im Komplex mit GppNHp und Magnesium zeigt einige Gemeinsamkeiten und einige Unterschiede zwischen hGBP1 und anderen GTP-bindenden Proteinen wie Ras oder den heterotrimeren G-Proteinen²³¹. Die Orientierung des *P-Loops* und die Magnesium-Koordination sind bei hGBP1 und Ras analog²³¹. Ein wichtiger Unterschied zu Ras ist die so genannte Phosphatkappe die aus der um die Insertion I1 vergrößerten *switch* I-Region von hGBP1 besteht. Durch die Phosphatkappe wird die Phosphat-Bindungsstelle fast vollständig vom Lösungsmittel abgeschirmt. Ein weiterer Unterschied zu Ras ist die Bildung der Guaninkappe. Nach der Nukleotidbindung bilden sich aus der Insertion I5 die α -Helices $\alpha 5A$ und $\alpha 5B$. Die Guaninkappe schirmt fast die gesamte Base gegen das Lösungsmittel ab²³¹. Bei der Bindung der Guaninbase wird das Nukleotid in einer *anti*-Konformation gebunden und dadurch unterscheidet sich hGBP1 von allen anderen bisher untersuchten GTPasen²³¹.

Anhand der Struktur des GppNHp-gebundenen hGBP1 wurden Aminosäuren ermittelt, die möglicherweise eine katalytische Aktivität besitzen. Einige der katalytischen Aminosäuren konnten auch biochemisch nachgewiesen werden^{57,231,232}.

Zu den biochemisch charakterisierten Aminosäuren gehören das Arginin 48, das Lysin 51 und das Asparat 184.

Das konservierte Lysin 51 (K51) befindet sich in der P-Schleife und ist an der Nukleotidbindung, der Oligomerisierung und der GTP-Hydrolyse beteiligt^{57,232}.

Das konservierte Aspartat 184 (D184) gehört zum dritten GTP-Bindungsmotiv und ist an der spezifischen Bindung von Guaninnukleotiden beteiligt⁵⁷.

Das Arginin 48 (R48) aus der P-Schleife bindet GTP etwas fester als das Wildtyp-Protein, jedoch ist die GTPase-Aktivität stark reduziert. Die GTP-Hydrolyse ist nicht kooperativ und die GMP-Produktion ist stark reduziert. In der Größenausschlusschromatographie und der analytischen Ultrazentrifugation bildet es im GTP- oder GTP-Analoga-gebundenem Zustand Dimere. Im Komplex mit GDP und Aluminiumfluorid wird jedoch kein Tri- oder Tetramer gebildet^{57,232}.

Bei der Bindung und der Hydrolyse von Nukleotiden sowie bei der nukleotidabhängigen Oligomerisierung gibt es nur wenige Unterschiede zwischen der isolierten G-Domäne und dem Wildtyp-Protein von hGBP1. Wie beim Wildtyp-Protein ist die spezifische Aktivität der G-Domäne schnell und konzentrationsabhängig⁵⁷. Im Unterschied zum Wildtyp-Protein hydrolysiert die isolierte G-Domäne auch GDP, das aus der Lösung gebunden wird⁵⁷. Die isolierte G-Domäne bildet in Gegenwart von GppNHp ein Dimer. Im Unterschied zum Wildtyp-Protein bildet die isolierte G-Domäne im Komplex mit GDP und Aluminiumfluorid ein Dimer statt eines Tri- oder Tetramers. Im Komplex mit GMP und Aluminiumfluorid bildet die isolierte G-Domäne ein Dimer, während das Wildtyp-Protein nicht oligomerisiert⁵⁷.

Durch einen großen Überschuss der isolierten helikalen Domäne α 7-13 kann die GTPase-Aktivität des Wildtyp-Proteins deutlich gesteigert werden. Das Produktverhältnis ändert sich dabei jedoch nicht⁵⁷.

Ein wichtiges Merkmal für die Zuordnung von hGBP1 zu den Dynamine- verwandten GTPasen ist die Fähigkeit der nukleotidgebundenen Oligomerisierung⁷². Wie die Moleküle bei der Bildung des Dimers interagieren ist jedoch nicht bekannt. Die Kristalle, mit denen die Struktur von hGBP1 im Komplex mit GppNHp gelöst wurde, enthielten nur ein hGBP1 Molekül pro asymmetrischer Einheit. Jedoch könnte das in Lösung gebildete GppNHp-gebundene Dimer zwei benachbarten Molekülen im Kristallgitter entsprechen. Von den sieben kristallographischen Nachbarn besitzen zwei eine große Interaktionsfläche²³¹. Die Abbildung 10 zeigt die beiden möglichen Modelle für die Struktur des Dimers.

Im Dimer A gibt es eine Interaktion zwischen der G-Domäne und der helikalen Domäne. Die Interaktionsfläche ist 2891 \AA^2 groß. Bei diesem Modell sind die Kontakte der Moleküle nicht reziprok, deshalb würde diese Interaktion zu einer Polymerisierung des Proteins führen. Für dieses Dimer spricht, dass die Ladungen der Kontaktfläche komplementär sind und die Geometrie des Moleküls nicht den Sedimentationskoeffizienten widerspricht^{57,231}.

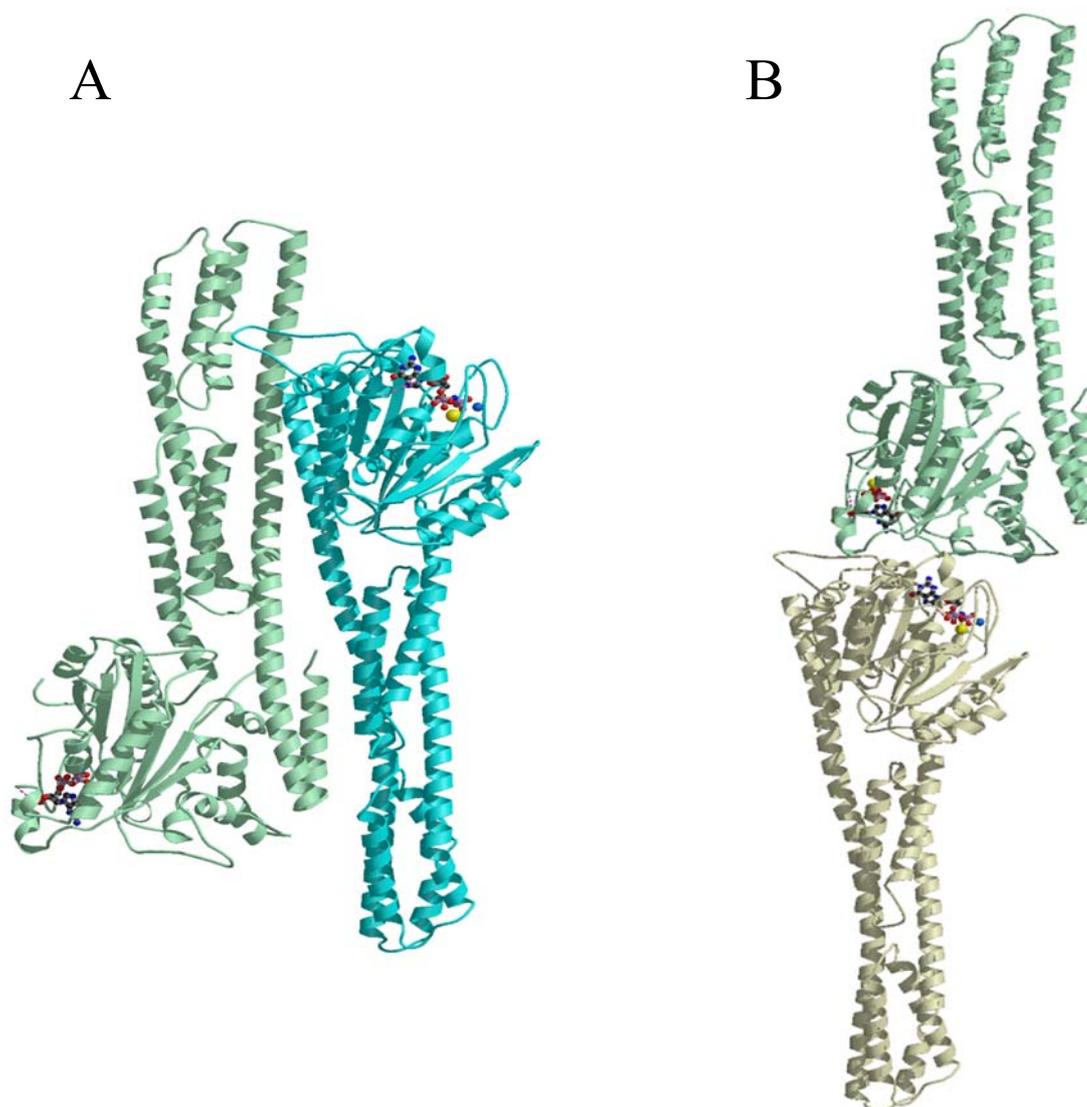


Abbildung 10: Kristallkontakte als Kandidaten für die Dimere von hGBP1 mit GppNHp²³¹. Das versetzte Dimer A bei dem die GTPase-Domäne mit der helikalen Domäne interagiert, hat eine Kontaktfläche von 2890 \AA^2 . Das Dimer B, bei dem die GTPase-Domänen interagieren, hat eine Kontaktfläche von 2140 \AA^2 .

In dem Dimer B interagieren die beiden G-Domänen. Diese Form der Interaktion könnte die Verbindung von GTP-Bindung und Dimerisierung erklären. Bei diesem Modell sind die Ladungen auf beiden Seiten der Kontaktfläche jedoch gleich. Außerdem widerspricht die Geometrie des Modells dem Sedimentationskoeffizienten^{57,231}.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Eines der allgemeinen und grundlegenden Merkmale der Mitglieder der Dynamin-Superfamilie ist die Bindung und die Hydrolyse von GTP. Ein Alleinstellungs-Merkmal unter allen GTP-bindenden Proteinen ist die nukleotidabhängige Selbst-Assemblierung der Proteine aus der Dynamin-Familie, die zur Bildung von multimeren Strukturen führt und auf bisher ungeklärte Weise mit der biologischen Funktionsweise zusammenhängen muss.

Von hGBP1 ist bekannt, dass es in Abhängigkeit von dem gebundenen Nukleotid als Mono-, Di- oder Tetramer vorliegt. Von Dynamin und Mx ist bekannt, dass sie zu Tetrameren assoziieren, die sich anschließend zu multimeren Strukturen zusammenlagern. Da sich die Tetramere von hGBP1 nicht zu multimeren Strukturen zusammenlagern, ist es möglich, die Assoziation zum Di- oder Tetramer zu charakterisieren. Sie könnte als Modell dienen für die Tetramerisierung anderer Mitglieder der Dynamin-Superfamilie. Die Röntgenkristallstruktur zeigt, dass das Protein aus einer GTP-bindenden Domäne sowie einer helikalen Domäne besteht. Die helikale Domäne kann anhand der Struktur in zwei Subdomänen untergliedert werden. Die dreidimensionale Struktur der Oligomere sowie die Art der Interaktion von hGBP1 sind jedoch unbekannt, da das Protein unabhängig von seiner Nukleotidbindung offenbar nicht in der assemblierten Form kristallisieren kann.

Mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems sollte die Interaktionsweise des hGBP1 untersucht werden, wobei insbesondere die Beteiligung der verschiedenen Protein-Domänen analysiert werden sollte. Zusätzlich sollte geklärt werden, welchen Einfluss verschiedene Aminosäurereste sowie die Farnesylierung des Proteins auf die Dimerisierung haben, um ein strukturelles Modell für die Assemblierung zu erstellen.

Durch Klonierung, Synthese und Reinigung der isolierten Domänen sollte ein Zugang geschaffen werden, um mit biochemischen und biophysikalischen Methoden die verschiedenen Wechselwirkungen und die einzelnen Beiträge näher zu charakterisieren. Chemische Quervernetzung (cross-linking) erlaubt eine qualitative Analyse von gebildeten Proteinkomplexen. Für eine effiziente Hydrolyse von GTP scheint die Bildung höherer Ordnungsstrukturen nötig zu sein. Deswegen sollten die in Anwesenheit von GTP oder von GTP-Analoga gebildeten Di-, Tri- und Tetramere mit Hilfe von „Cross-Linkern“ dauerhaft verknüpft und eine nähere Untersuchung in seiner funktionalen Konformation ermöglicht werden. Insbesondere mit kalorimetrischen Methoden wie der Isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) und der Differential Scanning Calorimetry (DSC) ist eine quantitative Bestimmung der Interaktionen möglich.

Potentielle zelluläre Bindungspartner von hGBP1 sollten mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems gesucht werden. Sie sollten anschließend insbesondere im Hinblick auf ihre Beeinflussung der Substratbindung oder der enzymatischen Aktivität charakterisiert werden. Des Weiteren sollte die Identifizierung von Bindungspartner einen Einblick in die genaue zelluläre Funktion von hGBP1 geben.

2 Methoden

Eine Zusammenstellung der verwendeten Geräte, Chemikalien, Enzyme, Medien, Vektoren, Oligonukleotide und Stämme befindet sich in den Anhängen.

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Aufbewahrung und Amplifikation der Plasmid-DNA erfolgte in *E. coli* Zellen des Stammes TG1. Die Isolierung geringer Plasmidmengen (< 20 µg) erfolgte aus 2 ml einer Über-Nacht-Kultur (≈5 ml, ≥ 16 h, 37°C) mit dem QIAGEN ‚*Plasmid Mini Kit*‘ (Hilden). Die Isolierung der DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Der alkalischen Lyse der Zellen und der Fällung der Proteine durch Natriumdodecylsulfat folgt die Reinigung der DNA über eine Anionenaustauschersäule. Die DNA wurde anschließend mit 30 µl Wasser eluiert. Die Aufarbeitung erfolgte dabei nach dem Protokoll des Herstellers.

Die Isolierung größerer Plasmidmengen (<750 µg) erfolgte aus 300 ml einer Über-Nacht-Kultur (300 ml, ≥ 16h, 37°C) mit Hilfe des ‚*QIAGEN Plasmid Maxi Kit*‘. Diese DNA wurde in 300 µl Wasser aufgenommen. Die Bestimmung der Konzentration (c) und der Reinheit (r) der Plasmide erfolgte photometrisch nach den folgenden Gleichungen.

$$c = (A_{260} * \epsilon * f) / d$$

c = Konzentration in µg/µl

f = Verdünnungsfaktor

ε = nukleinsäurespezifischer Koeffizient in cm*µg/µl

(bei Verwendung von 1 cm Küvetten)

für ds DNA: ε = 0,05 µg/µl

für ss DNA: ε = 0,025 µg/µl

d = Schichtdicke der Küvette in cm

Die Reinheit der DNA wurde durch den Quotienten der Absorbtion bei 260 nm und 280 nm bestimmt und sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen.

2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen

Die Isolierung von DNA aus Hefen erfolgte wie die Isolierung von DNA aus Bakterien mit dem ‚*Plasmid Mini Kit*‘ von QIAGEN (Hilden). Für die Lyse der Hefezellen wurden diese zuerst im Lysepuffer des Kits resuspendiert und nach Zugabe von Glaskugeln in einer Kugelmühle mechanisch aufgeschlossen. Die weiteren Schritte der Aufarbeitung der Plasmid-DNA erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers.

2.1.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

2.1.3.1 Standard-PCR

Die Standard-PCR (PCR, Polymerase Chain Reaktion) diente der *in vitro* Amplifikation linearisierter DNA²³³ zur selektiven Vervielfältigung von DNA für Subklonierungen. Hierbei können neue Restriktionsstellen eingeführt oder auch verkürzte Genfragmente erzeugt werden.

Ein 100 µl Standard-Ansatz besteht aus: 10 µl 10 µM 5'-Primer, 10 µl 10 µM 3'-Primer, 5µl 10 mM dNTP-Lösung, 10 µl 10x Pfu-Polymerase-Puffer, 0,05-0,1 µg zu amplifizierende DNA (Template) und 1 µl Pfu-Polymerase ad 100 µl mit H₂O *bidest.*

Das Standard-Programm bestand aus 25-30 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 94 °C, 15 s Hybridisierung bei 50-60 °C, 60 s pro 1000 bp Synthese bei 72 °C, sowie einer initialen Denaturierung von 120 s bei 94 °C und einer abschließenden Elongation von 10 min bei 72 °C.

Die Hybridisierungstemperatur wurde der Denaturierungstemperatur (T_m) der Primer mit der Formel: $T_m (°C) = 81,5 + 0,41 * (\% \text{ Guanin} + \text{Cytosin}) - 675 / N * (\% \text{ Fehlpaarung})$ angepasst. Dabei entspricht N der Anzahl der in dem Primer enthaltenen Basen.

2.1.3.2 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerechte Mutagenese dient der Substitution einzelner Aminosäuren. Sie erfolgte nach dem ‚*QuickChange*‘-Protokoll (Stratagene). Hierbei wird zirkuläre als Template dienende Plasmid-DNA mittels zweier mutagener komplementärer Oligonukleotide amplifiziert. Die Wildtyp-DNA ist im Gegensatz zur synthetisierten DNA methyliert und wird nach der PCR mit der methylierungsabhängigen Restriktionsendonuklease *DpnI* gespalten. Anschließend wird die synthetisierte DNA in *E. coli* transformiert.

Die Proben wurden wie folgt für die PCR angesetzt: 5 µl 10x Reaktionspuffer, 125 ng 5'-Primer, 125 ng 3'-Primer, 5-50 ng Plasmid-DNA, 1 µl 10 mM dNTP-Lösung und 1 µl Pfu-Polymerase (‚Pfu-Turbo‘, Stratagene). Das PCR-Programm bestand aus 16 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 95 °C, 60 s Hybridisierung bei 55 °C und einer Elongation von 120 s pro kb Plasmidlänge bei 68 °C., sowie einer initialen

Denaturierung von 30 s bei 95 °C. Nach der PCR wurde der Ansatz 60 min mit 1 µl *DpnI* bei 37 °C inkubiert und anschließend in *E. coli* transformiert.

2.1.3.3 Schnell-PCR

Die Schnell-PCR diente der raschen Identifizierung erfolgreich transformierter *E. coli* Kolonien. Dabei wurde die DNA ganzer Zellen der zu testenden Kolonien als Template eingesetzt. Die Zellen wurden von der Transformationsplatte in ein 500 µl PCR-Gefäß überführt und für 90 s in einer Mikrowelle aufgeschlossen.

Nach dem Aufschluss wurden 3,5 µl 10 µM 5'-Primer, 3,5 µl 10 µM 3'-Primer, 3,5 µl 10 mM dNTP-Lösung, 3,5 µl 10x PCR-Puffer, 22 µl H₂O *bidest* und 0,1 µl Taq-Polymerase als Reaktionsgemisch zugegeben. Das PCR-Programm bestand aus 20 Zyklen mit je 60 s Denaturierung bei 92 °C, 60 s Hybridisierung bei 50 °C und 120 s Elongation bei 72 °C, sowie einer initialen Denaturierung von 120 s bei 94 °C und einer abschließenden Elongation von 10 min bei 72 °C.

Die amplifizierte DNA wurde anschließend mit einer Agarosegelelektrophorese analysiert.

Von den getesteten Kolonien wurden Zellen auf eine neue Agarplatte übertragen, die am Ende der Schnell-PCR zum Animpfen von 5 ml Minikulturen zur Verfügung standen.

2.1.4 Agarosegelelektrophorese

Die Horizontal-Gelelektrophorese ermöglicht die analytische und präparative Trennung von DNA-Proben. Die Gelelektrophorese erfolgt entsprechend der Fragmentgröße in 0,7 % bis 2 % Agarose die in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst wurde. Als Laufpuffer wurde ebenfalls TAE-Puffer verwendet. Die Proben wurden mit 1/6 Volumen des Probenpuffers (0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol, 30 % (v/v) Glycerol) versetzt und aufgetragen. Ein mit aufgetragenes Gemisch von DNA-Fragmenten bekannter Größe diente als Größenstandard. Für die Elektrophorese wurde eine Feldstärke von 8 V/cm angelegt. Die Färbung der Gele erfolgte anschließend mit einer 0,001 prozentigen Ethidiumbromidlösung und die Banden der DNA-Fragmente wurden auf einem UV-Transilluminator ($\lambda=320$ nm) detektiert.

2.1.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Reinigung restringierter oder amplifizierter DNA erfolgte mit der präparativen Agarosegelelektrophorese. Die Banden mit dem gesuchten DNA-Fragment wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des GelExtraction Kitsystems (Qiagen, Hilden) aus dem Gel eluiert. Bei dieser

Elution wird die Agarose bei 50 °C in Puffer aufgelöst und die DNA über eine Anionenaustauschsäule gereinigt.

2.1.6 Restriktion doppelsträngiger DNA

Die Restriktion der DNA (Plasmide und PCR-Amplifikate) erfolgte in einem Gesamtvolumen von 30 µl unter den angegebenen Puffer- und Temperaturbedingungen des Herstellers (New England Biolabs, Schwalbach). Für einen Verdau wurden etwa 5 µg DNA und 1 µl der jeweiligen Restriktionsendonuklease [bei 37 °C, 150 min; im Fall von Sal I 37 °C über Nacht] eingesetzt. Bei identischen Reaktionsbedingungen wurden Doppelhydrolysen simultan durchgeführt, bei unterschiedlichen Bedingungen nacheinander. Nach der Restriktion wurde die DNA mit der Agarosegelelektrophorese gereinigt und bei -20 °C gelagert.

2.1.7 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Einfach restringierte Plasmid-DNA wurde dephosphoryliert, um die Religation des Plasmids während der Ligation zu verhindern. Die restringierte und gereinigte Plasmid-DNA wurde dazu mit 1 µl alkalischer Phosphatase und mit alkalischem Phosphatasepuffer versetzt. Der Ansatz inkubierte eine Stunde bei 37 °C und wurde anschließend durch eine Agarosegelelektrophorese aufgereinigt. Die DNA wurde in Wasser gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation der Vektor-DNA und des DNA-Inserts wurden immer zwei parallele Ansätze mit einem Plasmid:Insert Verhältnis von 1:3 bzw. 1:7 Volumenanteilen angesetzt. In einem Endvolumen von 30 µl enthielten die Ansätze 1 µl T₄-DNA Ligase und 3 µl 10 x Ligase-Puffer (Boehringer Mannheim, Mannheim). Über Nacht inkubierten die Ansätze bei 16 °C im Wasserbad und wurden anschließend in *E. coli* TG 1 transformiert.

2.1.9 Darstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Darstellung kompetenter *E. coli* Zellen wurde die MgCl₂-Methode nach Chung (1989) verwendet²³⁴. Eine 100 ml LB-Flüssigmediumkultur, dessen pH nicht mit NaOH justiert wurde, wurde mit 1 ml einer Vorkultur (> 16 h, bei 37 °C) inokkuliert und bei 37 °C 180UpM bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 ± 0,05 inkubiert. Die Kultur wurde für mind. 20 Minuten auf Eis abgekühlt und die Zellen anschließend 5 min bei

4 °C und 1200 x g sedimentiert. Die Zellen wurden in 10 ml eisgekühltem TSS-Puffer (85% v/v LB-Medium, 10% w/v PEG8000, 5% v/v DMSO, 50 mM MgCl₂) resuspendiert, mit 1,5 ml Glycerin versetzt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -80 °C gelagert.

2.1.10 Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen mit zirkulärer DNA

Für die Transformation wurden die kompetenten *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut. Die zirkuläre DNA (0,5 µg Plasmid bzw. 10 µl Ligationsansatz) wurde zu 100 µl kompetenter *E. coli* Zellen gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 2 Minuten bei 42 °C wurde der Transformationsansatz für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen mit 700 µl LB-Flüssigmedium gemischt und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert (1 min, 1200 x g, RT), der Überstand verworfen, die Zellen in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausgestrichen.

2.1.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der für diese Arbeit erzeugten oder verwendeten DNA-Konstrukte erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode^{235,236}. Diese Methode beruht auf der Verwendung von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden in einer PCR. Jeder Sequenzierungsansatz wurde wie folgt angesetzt: 4 µl *DyeDe-soxy-Terminator-Mix* (Perkin-Elmer, Überlingen), 0,5 µg Vektor-DNA, 5 pmol Primer, ad 20 µl H₂O bidest. Das verwendete PCR-Programm war wie folgt: zuerst eine initiale Denaturierung von 30s bei 96 °C, gefolgt von 25 Zyklen mit einer Denaturierung von 30 s bei 96 °C, einer Hybridisierung von 15 s bei 50 °C und 4 Minuten Elongation bei 60 °C. Nach Abschluss der PCR wurden die Ansätze mit H₂O bidest auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt. Die Ansätze wurden mit 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,7), 250 µl Ethanol und 1 µl Dextranblau versetzt und inkubierten 20 Minuten bei Raumtemperatur um die DNA zu fällen. Anschließend wurden die Ansätze 20 Minuten bei 13.000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die gefällte DNA mit 400 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach einer zweiten Zentrifugation (5 Minuten, 13.000 x g) wurde der Überstand verworfen und die gefällte DNA luftgetrocknet. In der zentralen Einrichtung „Synthese und Sequenzierung“ des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie wurde die Probe mit einem *DNA-Sequencer 373 XL* (Applied Biosystems, Weiterstadt) analysiert.

2.1.12 Testexpression

Durch die Variation der Kulturbedingungen wurden die optimalen Konditionen ermittelt, um eine maximale Ausbeute an rekombinant hergestellten, löslichen und aktiven Proteinen aus den verwendeten *E. coli* Kulturen zu erhalten. Es wurden 50 ml Flüssigkulturen (LB, TB) in Erlenmeyerkolben verwendet und die Inkubationstemperatur, die IPTG-Konzentration und die Kulturdauer variiert. Als identische, nicht induzierte Kontrolle wurden vor der Induktion 25 ml der Kultur in einen zweiten Erlenmeyerkolben überführt. Von der Kontrolle und der Testexpression wurden 2 ml Proben (3 h, 6h und über Nacht) entnommen und die Zellen abzentrifugiert. Die Zellen wurden in $(100 \cdot OD_{600})$ μ l 2-fach konzentriertem Laemli-Puffer aufgenommen, für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert und in flüssigen N₂ schockgefroren. Die Proben wurden kurz zentrifugiert, um die DNA und Zellfragmente zu sedimentieren und anschließend 2 μ l des Überstands und 2 μ l des Pellets auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mit der Gelelektrophorese aufgetrennt. Durch den Vergleich von Überstand und Pellet konnte die Löslichkeit eines Proteins überprüft werden.

2.1.13 Transformation 2-Hybrid-Interaktionstest

Im Zwei-Hybrid-System wurde die *in vivo* Assoziation bekannter Proteine oder Proteinfragmente getestet^{237,238}. Der Interaktionstest erfolgte durch direkte Transformation in *Saccharomyces cerevisiae* EGY 48. Zur Herstellung kompetenter Hefezellen wurde eine EGY 48 Kolonie über Nacht (30 °C, 180 UpM) in einem Hefeminimalmedium (SD-Medium, *synthetic drop-out*) inkubiert. Die Inkubation erfolgte in 5 Milliliter des Hefeminimalmediums SD Ura⁻. Am folgenden Tag wurde die Kultur mit 50 ml SD Ura⁻-Medium verdünnt und für 3 Stunden bei 30 °C bei 180 UpM inkubiert. Die Zellen wurden bei 1700 x g geerntet und mit 9 ml Lithium-Acetat-Lösung (100 mM Lithiumacetat in TE-Puffer) gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml Lithium-Acetat-Lösung resuspendiert²³⁹. Die Transformationsansätze bestanden aus je 1 μ l der beiden Testplasmide, 10 μ l 10 mg/ml Lachssperma-DNA (Sigma), 600 μ l 100 mM Lithiumacetat, 100 μ l der kompetenten Hefezellen und 40 % (w/v) PEG 3350 in TE-Puffer. Die Ansätze inkubierten für 30 Minuten bei 30 °C wurden mit je 70 μ l DMSO versetzt und inkubierten für weitere 20 Minuten bei 42 °C. Die Ansätze wurden für 2 Minuten auf Eis abgekühlt, bei 1700 x g zentrifugiert und die Zellen in 300 μ l TE-Puffer resuspendiert. Es wurden je 100 μ l Zellen auf zwei SD His⁻Trp⁻Ura⁻-Platten ausgestrichen. Die SD His⁻Trp⁻Ura⁻-Platten selektionierten auf das Vorhandensein der beiden Plasmide pGilda (*his*⁺) und pB42AD (*trp*⁺). Die Platten wurden für zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml TE-Puffer resuspendiert und die optische Dichte (OD₆₀₀) gemessen. Mit TE-Puffer wurden die verschiedenen Interaktionstestansätze auf eine einheitliche optische Dichte eingestellt. Je 100 μ l Zellen der verschiedenen Testansätze wurden auf Medienplatten ausgestrichen, die Galaktose (Gal) und Raffinose (Raf) als Kohlenhydratquelle enthielten. Jeder Testansatz wurde auf einer

SD Gal/Raf His⁻Leu⁻Trp⁻Ura⁻-Platte, einer SD Gal/Raf His⁻Trp⁻Ura⁻ +BU-Salze+X-Gal-Platte und einer SD Gal/Raf His⁻Leu⁻Trp⁻Ura⁻ +BU-Salze+X-Gal-Platte (alle drei zur Interaktionsstudie) ausgestrichen. Die Platten wurden für 2 bis 5 Tage bei 30 °C inkubiert.

Um auszuschließen, dass die Aktivierung der Reportergene durch das AD-Fusionsprotein alleine und nicht durch die Interaktion der beiden Fusionsproteine hervorgerufen wurde, erfolgte eine Kotransformation mit dem leerem Köderplasmid pGilda.

2.1.14 Quantifizierung mit dem β -Galaktosidase-Assay

Die enzymatische Aktivität der β -Galactosidase wurde unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Chemilumineszenz-Reportergen-Assay ‚Galacto-Star‘ (Tropix, PE Biosystems) gemessen. Von den zu testenden EGY 48 Hefekulturen wurden nach der Transformation vier Einzelkolonien auf SD Gal/Raf His⁻Leu⁻Trp⁻Ura⁻-Platten überimpft und großflächig ausgestrichen. Nach einer Inkubation von zwei Tagen bei 30 °C wurden diese Kulturen in 20 ml SD Gal/Raf His⁻Leu⁻Trp⁻Ura⁻-Flüssigmedium resuspendiert und die OD₆₀₀ auf 0,6 in einem Gesamtvolumen von 6 ml eingestellt. Von jedem zu messendem Interaktionspartner wurden zwei unabhängige Ansätze hergestellt, in sterile Greiner-Röhrchen aliquotiert und für 20 Minuten bei 4000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden in je 800 μ l Z-Puffer (60 mM Di-Natriumhydrogenphosphat, 40 mM Natrium-di-hydrogenphosphat, 10 mM Kaliumchlorid, 1 mM Magnesiumsulfat, pH 7,0, 3,24 μ l/ml Mercaptoethanol) resuspendiert. Um die Zellen zu lysieren, wurden die resuspendierten Zellen mit 50 μ l 0,1 % (w/v) SDS und 50 μ l Chloroform versetzt und 30 s geschüttelt (Vortex). Aus der wässrigen, oberen Phase wurden zweimal je 60 μ l in Luminometerröhrchen überführt und im Abstand von je 10 s mit 300 μ l des frisch angesetzten Substratreagens (1:50 Substrat des GalactoStar Kits) versetzt. Die Ansätze inkubierten für 30 Minuten bei RT. Im Abstand von 10 s wurde die Lichtemission im Luminometer (Lumat LB9501, Berthold) gemessen. Die 16 Luminometerwerte jeder Interaktion wurden anschließend arithmetisch gemittelt.

2.1.15 Screen einer cDNA-Bank im Zwei-Hybrid-System

Für den Zwei-Hybrid-Screen wurde eine ungerichtet synthetisierte, gröÙenselektierte (350-700 bp) cDNA-Bank verwendet. Sie wurde aus der mRNA ganzer, 9,5 und 10,5 Tage alter embryonaler Mäuse synthetisiert, die mittels eines *NotI*-Primers in die entsprechende cDNA umgeschrieben worden war. Über die *NotI/NotI* Schnittstelle war die cDNA ungerichtet in das pVP16-Plasmid kloniert worden. Es wurde das LexA-Zwei-Hybrid-System mit dem Köderplasmid pBTM116 verwendet. Mit der Lithium-Acetat-Methode²³⁹ wurden die Plasmide in *S. cerevisiae* L40 transformiert. Die Transformation erfolgte in zwei Schritten um so eine möglichst hohe Transformationseffizienz zu erzielen. Mit der in 2.2.13 beschriebenen Lithiumacetat-Methode²³⁹ wurde zuerst das Köderplasmid in die L40 Zellen transformiert, auf UT-

Ly-Festagarplatten ausgestrichen und 6 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Eine der erhaltenen Einzelkolonien wurde in 10 ml UTLy-Medium resuspendiert und über Nacht bei 30 °C, 180 UpM inkubiert. Diese erste Vorkultur wurde mit 90 ml UTLy-Medium verdünnt und erneut über Nacht bei 30 °C, 180 UpM inkubiert. Mit dieser zweiten Vorkultur wurden 2 l YPAD-Flüssigmedium inokuliert und bei 30 °C bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ inkubiert. Die Zellen wurden bei 1000 g für 10 Minuten sedimentiert und erst mit 400 ml TE-Puffer und anschließend mit 30 ml Lithiumacetat-TE-Puffer gewaschen und sedimentiert. Die Zellen wurden in 8 ml Lithiumacetat-TE-Puffer resuspendiert und für mindestens 10 Minuten bei RT inkubiert. Für die Transformation wurden die resuspendierten Zellen mit 1 mg cDNA und 2 mg Lachsperma versetzt. Je 5 ml der Suspension wurde in einen 250 ml Erlenmeyerkolben gegeben und mit 25 ml 40 % PEG 3350/Lithiumacetat/TE-Puffer gemischt und für 30 Minuten bei 30 °C, 200 UpM inkubiert. Die Ansätze wurden mit je 3,3 ml DMSO gemischt, für 20 Minuten bei 42 °C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei 1000 g (RT) sedimentiert, mit 30 ml YPD gewaschen und in 400 ml YPD resuspendiert. Die Zellen regenerierten für 1 Stunde bei 30 °C, 200 UpM. Abschließend wurden die Zellen mit 20 ml TE-Puffer gewaschen und in 30 ml TE-Puffer resuspendiert. Aliquots von je 300 μ l wurden auf THULLy-Festagarplatten (\varnothing 135 mm) ausgestrichen. Um die Transformationseffizienz zu bestimmen, wurde eine Verdünnungsreihe auf UTL-Platten (100 μ l pro Platte) ausgestrichen und die Kolonien nach drei Tagen ausgezählt.

2.2 Proteinchemische Methoden

Die Proteine wurden durch bakterielle Synthese mit Hilfe rekombinanter Techniken erhalten.

2.2.1 Zellanzucht und Zellaufschluss

2.2.1.1 Zellanzucht

Für die Zellanzucht wurden die bei den Testexpressionen ermittelten optimalen Kulturbedingungen verwendet. Für alle hGBP1 Konstrukte (Wildtype, Mutanten und isolierte Domänen) wurden die gleichen optimalen Bedingungen ermittelt.

Im Schüttelinkubator wurde eine über Nacht Vorkultur der Bakterien bei 37 °C und 180 UpM in TB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin angezogen. Mit je 25 ml der Vorkultur wurden die 2,5 l TB-Selektionsmedium der Hauptkultur angeimpft und im Schüttelinkubator (37 °C, 160 UpM) bis zu einer OD_{600} von 0,6 bis 1,0 angezogen. Durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 200 μ M) wurde die Expression des Genkonstrukts induziert. Die Expression erfolgte über Nacht im Schüttelinkubator bei 25

°C und 160 UpM). Die Zellen wurden 15 Minuten bei 6.000 x g und 4 °C zentrifugiert und in Puffer resuspendiert. Die Zellen mit Konstrukten im Vektor pQE9 wurden in Puffer A (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM Imidazol und 10 % (v/v) Glycerol) resuspendiert und bei -80 °C gelagert. Die Zellen mit Konstrukten im Vektor pGex4T3 wurden in Puffer X (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) mit 2 mM DTE resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.2 Aufschluss der Zellen

Konstrukte im pQE9 Vektor

Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und vor dem Zellaufschluss mit 1 mM PMSF und einer Spatelspitze DNaseI (Boehringer) versetzt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch eine Ultraschallbehandlung von 6*60s mit 5*120s Pause auf Eis (Stufe 10, 50 % „duty cycle“, Branson Sonifier 450). Das Zelllysate wurde zentrifugiert (50.000 x g, 30 min, 4 °C), der Überstand mit dem löslichen Fusionsprotein dekantiert und aufgereinigt.

Konstrukte im pGex4T3 und im pProEx HTb Vektor

Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und vor dem Zellaufschluss mit 1 mM PMSF, 2 mM DTE, 25 % Triton X-100 (Endkonzentration 2%) und einer Spatelspitze DNaseI (Boehringer) versetzt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch eine Ultraschallbehandlung von 6*60s mit 5*60s Pause auf Eis (Stufe 10, 50 % „duty cycle“, Branson Sonifier 450). Das Zelllysate wurde zentrifugiert (50.000 x g, 30 min, 4 °C), der Überstand mit dem löslichen Fusionsprotein dekantiert und aufgereinigt.

2.2.2 Affinitätschromatographie

2.2.2.1 Nickel-NTA-Affinitätschromatographie

Proteine im pQE9 Plasmid

Die affinitätschromatographische Reinigung des N-terminal Histidin-markierten Proteins erfolgte mit einer Nickel-NTA-Superflow-Agarosesäule (Quiagen, Hilden) mit einem Säulenvolumen von 25 ml. Die Säule war mit Puffer A (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerol) äquilibriert worden. Der Überstand wurde mit 5 ml/min auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumina Puffer A sowie mit 5 Säulenvolumina Puffer B₂₀ (20 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerol) gewaschen. Das Protein wurde

mit einem Gradienten von 20 mM bis 500 mM Imidazol in 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 % (v/v) Glycerol eluiert.

Proteine im pProEx HTb Plasmid

Die Affinitätschromatographische Reinigung des N-terminal Histidin-markierten Proteins erfolgte mit einer Nickel-NTA-Superflow-Agarosesäule (Quiagen, Hilden) mit einem Säulenvolumen von 25 ml. Die Säule war mit PufferX + 500 mM NaCl äquilibriert worden. Der Überstand wurde mit 2 ml/min auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 10 Säulenvolumina PufferX + 500 mM NaCl gespült. Das Protein wurde mit PufferX mit 250 mM Imidazol eluiert und durch Ultrafiltration auf ein Volumen von vier Millilitern aufkonzentriert. Das Fusionsprotein wurde mit 200 U TEV-Protease in PufferX gespalten.

2.2.2.2 Glutathion-Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographische Reinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte mit einer GSH-Sepharose-Superflow-Säule (Amersham-Pharmacia, Freiburg) mit einem Säulenvolumen von 25 ml. Die Säule war mit PufferX (50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) mit 2 mM DTE äquilibriert worden. Der Überstand wurde mit 2 ml/min auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 10 Säulenvolumina PufferX mit 2 mM DTE gewaschen. Nach dem Auftragen wurde das Fusionsprotein mit 200 U Thrombin in PufferX mit 2 mM DTE über Nacht gespalten. Das gespaltene Protein wurde mit 2 Säulenvolumina PufferX mit 2 mM DTE eluiert. Das ungeschnittene Fusionsprotein sowie abgespaltenes GST wurde mit 20 mM Glutathion in PufferX mit 2 mM DTE und von der Säule eluiert.

2.2.3 Größenausschlusschromatographie

Die weitere Aufreinigung der Affinitätschromatographisch isolierten Proteine erfolgte durch die Größenausschlusschromatographie. Diese ermöglicht eine analytische oder präparative, größenspezifische Trennung der Proteine. Abhängig von der Größe der Proteine wurden verschiedene Säulenmaterialien verwendet: Superdex 75 bzw. Superdex 200 (Amersham-Pharmacia, Freiburg) sowie eine SigmaChrom GFC-1300 Säule (Supelco, Belfonte, USA). Das Säulenmaterial der Superdexsäulen besteht aus hochvernetzter Agarose mit kovalent gebundenem Dextran, die sich im Grad ihrer Vernetzung unterscheiden. Die Superdex 200 Säule wurde vor der Trennung mit 1 bis 3 Säulenvolumina Puffer C (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTE) äquilibriert. Die Superdex 75 Säule wurde vor der Trennung mit 1 bis 3 Säulenvolumina Puffer X (50 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl₂, pH 7,4 mit 2 mM DTE) äquilibriert. Die SigmaChrom GFC-1300 Säule enthält ein Säulenmaterial aus hochvernetzten Polysaccharide.

2.2.4 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Konzentrierung durch Ammoniumsulfatfällung

Den Proteinlösungen wurden bei 4 °C unter ständigem Rühren kleine Mengen Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 3 M zugegeben. Die Lösung wurde weitere 30 min bei 4 °C gerührt und anschließend das ausgefallene Protein für 30 min bei 15.000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Das Protein wurde anschließend in dem gewünschten Volumen Puffer aufgenommen.

Konzentrierung durch Ultrafiltration

Für die Ultrafiltration wurden Zentrifugationsröhrchen (Vivascience, Lincoln, USA) mit einer Membran verwendet, deren Porengröße maximal halb so groß war, wie das zu konzentrierende Protein. Die Proteinlösungen wurden bei 3.000 x g und 4 °C zentrifugiert, bis sie auf 30 bis 100 mg/ml konzentriert waren.

2.2.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Mit einem Uvikon 933 Zweistrahlphotometer (Kontron, Neufahrn) wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Bei reinen Proteinlösungen erfolgte die Konzentrationsbestimmung anhand der Absorption intrinsischer Chromophore (Tryptophan-, Tyrosin- und Cysteinreste) der Proteine bei einer Wellenlänge von 276 nm. Der molare Absorptionskoeffizient wurde nach der Methode von Gill & van Hippel²⁴⁰ bestimmt. Die Proteinlösungen wurden in einem Puffer aus 20 mM Kaliumphosphat, 6 M Guanidiniumchlorid, pH 6,5 auf eine Absorption von 0,3 bis 0,7 verdünnt und denaturiert.

Die Konzentration der Lösungen wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet:

$$A = \varepsilon * c * d$$

Folgende molare Absorptionskoeffizienten, die sich aus der Zusammensetzung der Aminosäuren berechnen lassen, wurden zur Bestimmung der Konzentration verwendet:

	Molarer Absorptionskoeffizient $\epsilon_{276} (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$	Molekulargewicht (kDa)
hGBP1	45450	69,240
hGBP1 C590S	45380	69,224
hGBP1 α 7-13	10295	32,702
hGBP1 α 7-11	8845	19,870
hGBP1 α 12-13	1450	13,568
hGBP1 α 12-13K567A	1450	13,497
hGBP1 α12	1450	10,146

Tabelle 1: Die molaren Absorptionskoeffizienten und Molekulargewichte der hGBP1 Konstrukte.

2.2.6 Elektrophorese von Proteinen

2.2.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemli

Die SDS-Gelelektrophorese dient der analytischen Trennung von Proteingemischen. Eine vertikale Mini-gelkammer (Protean II BioRad, München) wurde dazu verwendet, die Proteine in einem denaturierenden und diskontinuierlichen Polyacrylamidgel aufzutrennen²⁴¹. Die Proteine erhalten durch die Denaturierung mit Natriumdodecylsulfat (SDS) eine einheitliche negative Ladung entlang der Aminosäurekette und trennen sich in einem elektrischen Feld gemäß ihrem Molekulargewicht.

Es wurden 10 % bzw. 13 % Trenngel und 5 % Sammelgel verwendet.

	Trenngel		Sammelgel
Gelkonzentration	10 %	13,5 %	5 %
Acrylamidlösung	2,5 ml	4,5 ml	0,5 ml
Trenngelpuffer	1,9 ml	2,5 ml	-/-
Sammelgelpuffer	-/-	-/-	0,38 ml
H₂O bidest.	3,1 ml	2,3 ml	2,1 ml
10 % SDS	100 μ l	100 μ l	30 μ l
10 % Ammoniumperoxodisulfat	100 μ l	100 μ l	30 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l	3 μ l

Tabelle 2: Pipettierschema für SDS-Polyacrylamidgele nach Laemli.

Die Acrylamidlösung bestand aus 30 % Acrylamid und 0,8 % Bisacrylamid. Beim Trenngelpuffer handelte es sich um einen 1,5 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,8) und beim Sammelgelpuffer um einen 1,0 M Tris/HCl-Puffer (pH 6,8).

Vor dem Auftragen wurden die Proteinlösungen mit $\frac{1}{4}$ Volumen 5 x SDS-Probenpuffer (150 mM Tris/HCl (pH 6,8), 2 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerol, 0,01 Bromphenolblau, 10 mM DTE) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in einem Laufpuffer aus 25 mM Tris/HCl (pH 8,3), 0,2 M Glycin, 0,1 % SDS) bei einem konstanten Stromfluss von 30 mA pro Gel.

2.2.6.2 Tricin-Gelelektrophorese

Die Tricin-Gelelektrophorese diente der Analyse kleiner Proteine oder proteolytisch abgespaltener Peptide ($5 < kDa < 14$)²⁴². Eine vertikale Minigelkammer (Protean II BioRad, München) wurde dazu verwendet, die Proteine gemäß ihres Molekulargewichts aufzutrennen.

Es wurden 10 % bzw. 14 % Trenngele und 5 % Sammelgele verwendet.

	Trenngel		Sammelgel
Gelkonzentration	10 %	14 %	5 %
Acrylamidlösung	3,2 ml	4,6 ml	0,5 ml
Gelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	0,38 ml
H₂O bidest.	3,9 ml	2,5 ml	2,1 ml
10 % Ammoniumperoxodisulfat	100 μ l	100 μ l	50 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	3 μ l

Tabelle 3: Pipetierschema für Tricin-Gelelektrophorese.

Die Acrylamidlösung bestand aus 30 % Acrylamid und 0,8 % Bisacrylamid. Der Gelpuffer bestand aus 3 M Tris/HCl (pH 8,45) mit 0,3 % (w/v) SDS. Die Gelelektrophorese erfolgte mit einem Anodenpuffer aus 242,25 g/l Tris pH 8,9 in der inneren Kammer und einem Kathodenpuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,2, 100 mM Tricin, 0,1 % (w/v) SDS) in der Außenkammer. Vor dem Auftragen wurden die Proteinlösungen mit $\frac{1}{4}$ Volumen 5 x SDS-Probenpuffer (150 mM Tris/HCl, pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerol, 0,01 Bromphenolblau, 10 mM DTE) versetzt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einem konstanten Stromfluss von 54 mA pro Gel.

2.2.6.3 Färben von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Färbung der Proteingele erfolgte für 15 Minuten in Coomassie-Blau (0,125 % (w/v) R-250, 0,125 % (w/v) G-250 (Serva) in 50 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure). Die Färbelösung wurde etwas erwärmt um die Färbung zu beschleunigen. Der Hintergrund wurde in 10 % (v/v) Ethanol mit 10 % (v/v) Essigsäure entfärbt. Die Dokumentation der gefärbten Gele erfolgte mit einem Scanner.

2.2.7 Western-Blot

Für die Immunodetektion wurden die elektrophoretisch getrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Der Transfer erfolgte in einer Minigelkammer (Protean II BioRad, München) in einem Puffer aus 25 mM Tris/HCl, 190 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, pH 8,0-8,5 bei 4 °C und 100 V für 90 Minuten. Die geblottete Membran wurde mit Ponceau Rot (Sigma) gefärbt.

Immunodetektion

Für die Immunodetektion wurden die geblotteten Membranen in TBS-Puffer (20 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl) gewaschen und über Nacht bei 4 °C in TBS mit 5 % (w/v) Magermilchpulver inkubiert. Die Membranen wurden zweimal in je 20 ml TBS-Puffer gewaschen und anschließend bei RT für 60 Minuten mit dem primären Antikörper in TBST-Puffer (TBS + 0,05 % (w/v) Tween 20) inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten in je 20 ml TBST wurden die Membranen für 60 Minuten bei RT mit dem zweiten Antikörper in TBST inkubiert. Abschließend wurden die Membranen zweimal mit TBST-Puffer gewaschen. Es wurden ausschließlich sekundäre Antikörper verwendet, die mit der Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppelt waren. Die Detektion der Proteine erfolgte nun durch chemische Luminiszenz mit dem ECL Western-Blot-Detectionskit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Die bei der Umsetzung des Substrates durch die Peroxidase erfolgende chemische Luminiszenz wird zur Belichtung eines Röntgenfilms (Kodak X-Omat, XAR-5, Sigma) genutzt.

2.3 Biophysikalische Methoden

2.3.1 Circular dichroismus

Die CD-Spektroskopie (Circular dichroismus) ist prädestiniert für die Charakterisierung der Sekundärstruktur von Proteinen in Lösung²⁴³. Die Grundlage des Circular dichroismus beruht darauf, dass optisch

aktiven Substanzen rechts bzw. links zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbieren, wobei es zu Elektronenübergängen kommt. Im fernen UV-Bereich finden diese Elektronenübergänge im Bereich der Peptidbindung statt, so dass sich mit der Auswertung der Spektren Aussagen über die Konformation des Proteins machen lassen.

Für die Aufnahme von CD-Spektren wurde ein Jasco J-710 Spektropolarimeter (Japan Spectroscopic Co., Ltd., Tokyo, Japan) verwendet. Die Messung wurde im Fern-UV (190 – 250 nm) in 0,5 mm Quarzküvetten mit 1 nm Bandbreite, 50 nm·Min⁻¹ Scangeschwindigkeit und 1 s Integrationszeit durchgeführt. Die CD-Spektren wurden bei Temperaturen von 20 °C bis 70 °C in 5 K Schritten aufgenommen. Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden in möglichst großer Reinheit mit Konzentrationen von 10 bis 50 µM in CD-Puffer (10 mM Kaliumphosphat, pH 7,5) eingesetzt. Alle Spektren wurden zehnfach akkumuliert. Die CD-Spektren wurden mit Hilfe des DICHROWEB Webservers ausgewertet²⁴⁴. Dabei wurde das Analysenprogramm CDSSTR mit der Referenzdatei Nummer 7 verwendet²⁴⁵⁻²⁴⁷. Die Referenzdatei Nummer 7 besteht aus den CD-Spektren von 48 Proteinen die ebenfalls im Fern-UV zwischen 190 – 240 nm aufgenommen worden sind²⁴⁷⁻²⁴⁹.

2.3.2 Massenspektrometrie

2.3.2.1 Bestimmung der Molekularmasse von Proteinen

Die Massenspektrometrie diente der Bestimmung der Masse eines zu charakterisierenden Proteins, sowie der Analyse proteolytisch gespaltener Proteine. Die Technik beruht auf der Generierung von Ionen des zu untersuchenden Moleküls in der Gasphase und der Analyse des Masse/Ladungs-Verhältnisses dieser Ionen durch ein geeignetes Detektor-System.

Für diese Arbeit wurde die Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization time of flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie verwendet. Diese ermöglicht die Analyse sehr komplexer Proteinmischungen²⁵⁰, wobei Salzkontaminationen oder glykosylierte Proteine die Anwendung dieser Technik nicht behindern. Für die Probenvorbereitung wurden auf einer MALDI-Stahlprobenplatte 2 µl einer Proteinlösung (1 – 10 µM) mit 2 µl „Matrix“ gemischt und Luft- bzw. Vakuum getrocknet. Um ein besseres Signal zu erhalten, wurden mehrere Verdünnungen einer Stammlösung gemessen.

Durch die sauren UV-Absorbierenden Matrix-Moleküle werden Protonen auf die Proteine übertragen, die dadurch eine positive Ladung erhalten. Im Hochvakuum des Massenspektrometers werden die Proben mit Laser-Pulsen (1 ns bis 10 ns) im UV-Bereich beschossen. Durch ein hohes elektrisches Potential von 25 kV bis 30 kV, welches an einer Beschleunigungselektrode nahe der Probenplatte anliegt, erfolgt eine Be-

schleunigung der Proteinmolekül-Ionen. Dabei ist die Geschwindigkeit der Proteinmolekül-Ionen im Flugrohr proportional zur Quadratwurzel des Masse/Ladungs-Verhältnis.

Formel 1:

$$t = \frac{L}{\sqrt{2K}} \cdot \sqrt{\frac{M}{z}}$$

t =	Flugzeit des Ions	M =	Masse des Ions
K =	kinetische Energie des Ions	z =	Ladung des Ions
L =	Länge des Flugrohres		

Für die Analyse der hGBP1 Domänen und von proteolytischen Proteinfragmente wurden die Sinapinsäure, die 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) und die α -Cyano-4-4-Hydroxymizsäure als Matrices verwendet. Von der Sinapinsäure wurde eine gesättigte Lösung und von der α -Cyano-4-4-Hydroxymizsäure eine Lösung mit 6 mg/ml angesetzt.

Die Lösung der Matrices erfolgte in:

- 333 μ l Acetonitril
- 333 μ l Ethanol
- 33 μ l 1,0 % TFA
- 300 μ l Wasser

Die Kalibrierung des Gerätes erfolgte durch einen Standard mit Proteinen bzw. Peptiden bekannter Größe. Die Bearbeitung der Massenspektren erfolgte mit der Voyager Auswertungssoftware und die experimentell ermittelten Massen wurden mit den theoretisch erwarteten Massen verglichen.

Die theoretische molekulare Masse der Proteine und der proteolytischen Proteinfragmente wurde mit dem Online zur Verfügung stehenden Programm ExPASy „Peptide Mass“ (www.expasy.ch) bestimmt. Das Programm bestimmte aus der Aminosäuresequenz des zu analysierenden Proteins die molare Masse sowie die möglichen Spaltstellen einer gewählten Protease, wie zum Beispiel Trypsin oder Pepsin, und die daraus resultierenden Proteinfragmente.

2.3.2.2 Identifizierung von Proteinen durch den „in Gel Verdau“ und die Massenspektrometrie

Für die Identifizierung von Proteinen aus Proteingemischen wurden diese mit einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die zu identifizierende Proteinbande wurde ausgeschnitten und die Gelstücke in kleinere Partikel von ungefähr 1 mm² zerkleinert. Die Reste von SDS und Coomassie wurden aus den Partikeln entfernt:

Die Partikel wurden für 10 Minuten mit 25 µL Acetonitril bedeckt und geschüttelt. Danach mit 25 µl 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat gemischt und nach 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand entfernt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die Gelpartikel wurden für 30 Minuten in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. In einem zweiten Schritt wurden die Proteine reduziert und alkyliert:

Dazu wurden die Gelstücke mit 25 µl 10 mM DTT in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat bedeckt und 1 h bei 56 °C inkubiert, anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und der Überstand entfernt. Die Gelstücke wurden für 5 Minuten mit 25 µl Acetonitril bedeckt. Der Überstand wurde rasch durch 25 µl 0,055 M Iodacetamid in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat ersetzt. Die Inkubation erfolgte für 45 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Der Überstand wurde entfernt und die Gelstücke für 5 Minuten mit 25 µl 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat bedeckt. Nach dem Entfernen des Überstands wurden die Gelstücke für 5 Minuten mit 25 µl Acetonitril inkubiert. Der Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Der Überstand wurde entfernt und die Gelstücke für 30 Minuten in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

Anschließend wurden die Proteinstücke mit Trypsin verdaut. Dazu wurden die Gelstücke mit 25 µl 0,25 mg Trypsin in 0,05 M Ammoniumhydrogencarbonat pH 8,0, 5 mM CaCl₂ bedeckt und für 45 Minuten auf Eis inkubiert. Der überstehende Puffer wurde entfernt und gegen Puffer ohne Trypsin ersetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht.

Die Peptidstücke wurden anschließend aus den Gelstücken extrahiert:

Der überstehende Puffer wurde zunächst entfernt. Die Gelstücke inkubierten für 15 Minuten in 25 µl Ammoniumbicarbonat, danach wurden 25 µl Acetonitril hinzu gegeben und weitere 15 Minuten inkubiert. Der Überstand (1) wurde abgenommen und aufgehoben. Die Gelstücke wurden mit 25 ml 5 % Ameisensäure bedeckt und inkubierten 15 min. Anschließend wurden 25 µl Acetonitril hinzu gegeben und weitere 15 Minuten inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit (1) vereinigt. Die Gelstücke inkubierten für 15 Minuten in 25 µl Acetonitril. Das Acetonitril wurde abgenommen und mit dem Überstand (1) vereinigt. Die Peptidstücke in den vereinigten Überständen wurden in der Vakuumzentrifuge getrocknet und zur Bestimmung des Molekulargewichts in einer Lösung der Matrixsubstanz α -Cyano-4-Hydroxymizsäure (6 mg/ml) in 33 % Acetonitril, 33 % Ethanol und 33% 0,1%TFA aufgenommen. Die Peptidmassen wurden mit dem MALDI-TOF Massenspektrometer gemessen und mit dem Programm Protein Prospektor (<http://prospector.ucsf.edu/>) ausgewertet.

2.3.3 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Mit der Differential Scanning Calorimetry wurde die thermodynamische Stabilität von Proteinen analysiert. Durch diese Methode war es möglich, die thermische Entfaltung von Proteinen zu untersuchen und Anhaltspunkte für die Bindungskonstante von Homodimeren zu bekommen. Für die Analysen wurde ein Microcal VP-DSC Kalorimeter (Microcal, Northhampton, Massachusetts, USA) verwendet.

Das Kalorimeter besteht aus einer Proben- und einer Referenz-Zelle. Die Referenzzelle enthielt den DSC-Puffer (10 mM Phosphat (pH 7,5), 20 mM Glycin, 2 mM Mercaptoethanol), während die Probenzelle mit 1,0 bis 200,0 μ M Protein in DSC-Puffer gefüllt war. Da das Protein nicht in DSC-Puffer umgepuffert worden war, wurden entsprechende Aliquots von Puffer X in den DSC-Puffer der Referenzzelle gegeben. Die Zellen mussten luftblasenfrei befüllt werden. Die Messungen erfolgten über einen Temperaturbereich von 15 °C bis 120 °C bei einer Heizrate von 1 K/min. Zur Untersuchung der Reversibilität erfolgten nach dem ersten Heizzyklus vier weitere Messungen.

Das Prinzip der DSC beruht auf der empfindlichen Messung des Unterschiedes in der Heizleistung, mit der die Referenz- bzw. die Probenzelle aufgeheizt werden, um eine genau lineare Temperaturerhöhung (Temperaturrampe von 1 K/min) zu erzielen. Die Wärmekapazität in der Probenzelle wird größer (und macht sich als Signaldifferenz bemerkbar), wenn die Probe aufschmilzt, (z.B. Entfaltung eines Proteins), d.h. wenn mehr Energie der Probenzelle zugeführt werden muss, um die Temperaturrampe konstant zu halten. In einem DSC-Experiment wird also die Wärmekapazität in Abhängigkeit von der Temperatur aufgezeichnet.

2.3.4 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Üblicherweise wird mit der Isothermen Titrationskalorimetrie die Assoziation verschiedener Moleküle untersucht, die heterodimere Komplexe bilden^{251,252}. Dabei werden die Reaktionsenthalpie und die Affinitätskonstante bestimmt und außerdem kann die Stöchiometrie der Komplexbindung der beiden Interaktionspartner bestimmt werden.

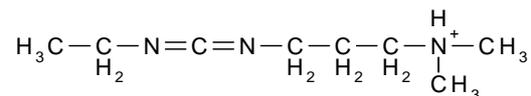
In dieser Arbeit wurden ITC-Experimente zur Bestimmung der Komplexbildungskonstanten homodimerer hGBP1-Domänen verwendet. Dazu wurde das homodimere Protein (bei hoher Konzentration) durch Verdünnung in Puffer dissoziiert und die dafür aufgenommene Wärmemenge gemessen.

In der Spritze wurden 0,5 mM Protein vorgelegt und mit kleinen Volumina (4 – 8 μ l) in definierten Zeitintervallen in Puffer X verdünnt. Die Änderung der Wärmemenge in Abhängigkeit von der verdünnten Proteinmenge wurde aufgezeichnet. An die Daten wurde eine theoretische Kurve angepasst, um die Dissoziationskonstante des Homodimers zu erhalten.

2.3.5 Cross-linking Analysen

Für die Analyse nativer Protein-Protein Komplexe wurden die Proteine mit einem Zero-length Crosslinker unter Verwendung „aktiver“ Ester verknüpft ²⁵³.

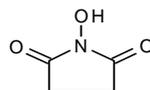
Es gibt verschiedene Substanzen die eine kovalente Bindung zwischen Proteinen knüpfen können. Diese Bindung kann über unterschiedlich große „Linker“ erfolgen, die nach der Reaktion als stabile Brücke die Proteine verbinden. Das wasserlösliche EDC ((1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid)



1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimide

ist ein so genannter Zero-length Crosslinker ²⁵⁴, bei denen die Proteine über eine isopeptid Bindung von geeigneten Seitenketten und nicht über einen Linker verknüpft werden. Das EDC wurde verwendet, da ohne die Einführung eines Linkers eine höhere Wahrscheinlichkeit besteht, dass sich die verknüpften Proteinreste innerhalb der Protein-Protein Interaktionsfläche befinden.

Da die durch EDC aktivierte Seitenkette schnell hydroxyliert und damit die ursprüngliche Carboxylgruppe regeneriert wird, muss die „aktive“ Seitengruppe stabilisiert werden. Dies erfolgt durch die Umsetzung mit N-Hydroxysulfosuccinimid (NHS), wobei hydrophile Ester entstehen, die nur sehr langsam hydroxylieren und mit denen die Ausbeute der Carbodiimid vermittelten Kopplungsreaktion gesteigert werden kann ²⁵⁵.



N-Hydroxysuccinimide

Es wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

10 mM MES-Puffer pH 6,5

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂

50 μM Protein

20 mM NHS

10 mM EDC

Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 mM Glycin abgestoppt. Als Kontrolle wurden Reaktionsansätze ohne NHS und EDC, nur mit NHS bzw. nur mit EDC verwendet. Für die Analyse der Selbst-Assemblierung des Wildtyp-Proteins und der isolierten G-Domäne wurden verschiedene Nukleotide dem

Reaktionsansatz zugesetzt. Es wurden die GTP-Analoga GppNHp (200 μM) und GDP·AlF_x (200 μM GDP, 150 μM AlCl₃, 5 mM NaF) getestet, sowie der Einfluss von GDP (200 μM).

2.3.6 GTP-Hydrolyse-Assay

Diese Methode ermöglicht die Analyse der GTPase-Aktivität eines Proteins und wurde wie von Lenzen *et al.*²⁵⁶ beschrieben durchgeführt. Die Nukleotide wurden mit der *reversed-phase* HPLC getrennt. Das Prinzip beruht auf der Interaktion einer stationären Phase (hydrophoben Säulenmatrix) mit einer mobilen Phase (Ionenpaare aus Nukleotid und dem Tetrabutylammoniumbromid (TBA) aus dem HPLC-Puffer). Die positiv geladenen TBA-Ionen lagern sich über einen Ionenpaarkomplex an die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleotide und polen sie so zu einer hydrophoben Gruppe um. Je höher die Anzahl der an ein Nukleotid gebundenen Phosphatgruppen ist, desto mehr TBA wird gebunden und umso höher ist die Retentionszeit.

Um die GTP-Hydrolyse zu untersuchen, wurde 1 μM hGBP1 in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 2 mM DTE und 50 μM BSA mit 1 mM GTP inkubiert.

Vor der Zugabe des Proteins inkubierten die Proben 5 Minuten bei 37 °C. Nach dem Reaktionsstart wurden in unterschiedlichen Zeitabständen je 25 μL Probe auf die HPLC-Anlage mit 2 ml/min aufgetragen. Für die Auftrennung wurde eine *reversed-phase* Säule ODS-Hypersil C18 (Bischoff, Leonberg) verwendet. Das denaturierte Protein wurde mit einer Nucleosid-100-C18-Vorsäule entfernt. Der Laufpuffer bestand aus 10 mM TBA, 0,2 mM Natriumazid, 100 mM Kaliumphosphat, pH 6,5 mit 7,5 % (v/v) Acetonitril. Die Nukleotide wurden durch die Absorption bei 252 nm detektiert. Die Retentionszeiten der Nukleotide wurden durch das Auftragen von Standards ermittelt.

2.3.7 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die Messung erfolgte mit einem DynamoPro molecular sizing Gerät für Proteinlösungen mit Temperaturkontrollgerät. Als Lichtquelle wurde ein 25 mW, 750 nm Feststoff-Laser verwendet. Die Auswertung erfolgte mit dem Dynamics V6 Programm.

Bei der dynamischen Lichtstreuung wird die Intensität des Streulichts eines Lasers, also einer kohärenten Lichtquelle, im rechten Winkel zu seiner Ausbreitungsrichtung gemessen. Dabei ist jedes Makromolekül ein Streuzentrum. Durch die Bewegung der Makromoleküle im Lösungsmittel ändern diese Streuzentren ihre Position sowie das aus der Streuung resultierende Interferenzmuster. Diese schnellen Fluktuationen werden auf eine zeitliche Korrelation hin untersucht. Die gemessenen Fluktuationen sind proportional zur jeweiligen Teilchenbewegung und geben Aufschluss über das dynamische Verhalten der Lösung. Der translationale Diffusionskoeffizient der in der Lösung enthaltenen Makromoleküle kann mit Hilfe der so genannten Autokorrelationsfunktion aus den zeitlichen Fluktuationen der Streulichtintensität

berechnet werden. Aus dem translationalem Diffusionskoeffizienten kann mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung (Formel 2) der hydrodynamische Radius der diffundierenden Makromoleküle berechnet werden.

Formel 2:

$$R_H = \frac{k_B \cdot T}{6\pi\eta D_T}$$

(R_H : hydrodynamischer Radius; k_B : Boltzmannkonstante; T : absolute Temperatur; η : Viskosität des Mediums; D_T : translationaler Diffusionskoeffizient)

Das Dynamics V6 Programm bietet zwei verschiedene Modelle mit denen die Molekülmasse aus dem hydrodynamischen Radius bestimmt werden kann. Die Grundlage der Modelle sind Kalibrierungskurven, für die der hydrodynamische Radius (R_H) von Molekülen mit bekannter Molekülmasse (MW) bestimmt wird. Die Moleküle, die für die Kalibrierungskurven gemessen werden, unterscheiden sich in ihrer Form. Das erste Modell ist für globuläre Moleküle. Dazu werden die hydrodynamischen Radien von globulären Proteinen bestimmt. Das zweite Modell ist für gestreckte Moleküle. Für dieses Modell werden die hydrodynamischen Radien von gestreckten Polysacchariden gemessen. Die Berechnung der Molekülmasse aus dem hydrodynamischen Radius erfolgt mit der Formel 3:

Formel 3:

$$MW \text{ (kDa)} = [R_{h \text{ Faktor}} * R_h \text{ (nm)}]^{Power}$$

Aus den Kalibrierungskurven werden der $R_{h \text{ Faktor}}$ und Power abgeleitet:

Modell	$R_{h \text{ Faktor}}$	Power
globulär	1,6800	2,3398
gestreckt	1,4782	1,8136

Die Messung wird bei 4 °C in einem Puffer aus 50 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl₂, pH 7,5 und mit einer Proteinkonzentration von 200 µM durchgeführt. Für jede Bestimmung eines Radius wurde über 10 Sekunden gemittelt. Es wurden je 50-100 solcher Einzelbestimmungen durchgeführt und über sie wiederum gemittelt. Um zu ermitteln, welches Modell für die isolierten helikalen Domänen von hGBP1 geeignet ist, wird der hydrodynamische Radius des Wildtyp-Proteins von hGBP1 gemessen, dessen Molekülmasse und Struktur bekannt ist.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der hGBP1 Oligomerisierung mit dem Zwei-Hybrid-System

Das humane Guanylat-bindende Protein 1 ist eine große GTPase. In Gegenwart von GTP und GTP-Analoga bildet sie Homodimere und Homotetramere. Diese Oligomerisierung ist mit der analytischen Größenausschlusschromatographie und der analytischen Ultrazentrifugation nachweisbar^{57,257}.

Die *in vitro* nachgewiesene Oligomerisierung von hGBP1⁵⁷ sollte *in vivo* mit Hilfe der 2-Hybrid-Methode für Interaktionsstudien [2.1.13] überprüft werden. Die Methode ermöglicht es, die Interaktion von Proteinen in lebenden Zellen zu analysieren. Dabei kann die Bildung von Homo- und Heterodimeren nachgewiesen werden. Dadurch ist es auch möglich, den Einfluss von Mutationen auf die Selbst-Assemblierung eines Proteins zu untersuchen.

Die cDNA der Proteine, deren Interaktion untersucht werden sollte, wurde in die Plasmide pGilda und pB42AD (AD: aktivierende Domäne) inseriert. Dabei wurde die cDNA in dem Plasmid pGilda mit der cDNA des DNA-bindendem Proteins LexA fusioniert. In dem Plasmid pB42AD fusionierte sie mit der cDNA des Proteins B42, dass die Transkription aktiviert.

Der verwendete Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* EGY 48 besitzt zwei Reportergene: LEU2 und lacZ. Die Expression des *LEU2* Reportergens wird von sechs Kopien des LexA Operators und das *lacZ* Reportergen von acht Kopien reguliert. Das Reportergen LEU2 ist in das Hefegenom integriert. Das Reportergen *lacZ* befindet sich auf dem Plasmid p8op-lacZ mit dem der Hefestamm vortransformiert wird.

Die Selektion auf interagierende Proteine erfolgte durch das Ausplattieren der Zellen auf Hefeminimalmedium (SD-Medium, *synthetic drop-out*), denen die Aminosäuren Histidin, Leucin und Tryptophan sowie das Nukleotid Uracil fehlen. Die Medien enthielten Galaktose (Gal) und Raffinose (Raf) als Kohlenstoffquelle. Es wurden dabei folgende Medien verwendet: SD Gal/Raf His⁻Leu⁻Trp⁻Ura⁻ und SD Gal/Raf His⁻Trp⁻Ura⁻ +BU-Salze+X-Gal -Platten. Die Expression der Aminosäuren Histidin und Tryptophan sowie des Nukleotids Uracil dienen als Selektionsmarker für die erfolgreiche Transformation der Hefezellen mit den Plasmiden pGilda, pB42AD und p8op-lacZ. Nur die Hefezellen, die interagierende Proteine exprimieren, wachsen auf den Leu⁻ Platten. Auf den Platten mit X-Gal werden die Zellen auf die Aktivität der β -Galactosidase getestet. Die Zellen färben sich blau, wenn durch die β -Galactosidase das künstliche Substrat X-Gal umgesetzt wird.

Wie in der Abbildung 11 zu sehen ist, bindet das mit dem LexA-Protein fusionierte „Köderprotein“ an die lexA Operatoren. Das mit dem Protein B42 fusionierte Beuteprotein interagiert mit dem Köderprotein.

Anschließend aktiviert das Protein B42 die Transkription der Reportergene. Die Transkription der Reportergene *LEU2* und *lacZ* wird von mehreren LexA Operatoren reguliert. Die Stärke der Transkription ist dabei abhängig von der Anzahl der LexA-Operatoren, an die ein LexA-Protein und ein B42-Protein gebunden sind. Dadurch ist es möglich, die Stärke der Transkription und damit die Affinität der Proteine über die Dichte der Kolonien und über die β -Galaktosidase-Aktivität zu quantifizieren.

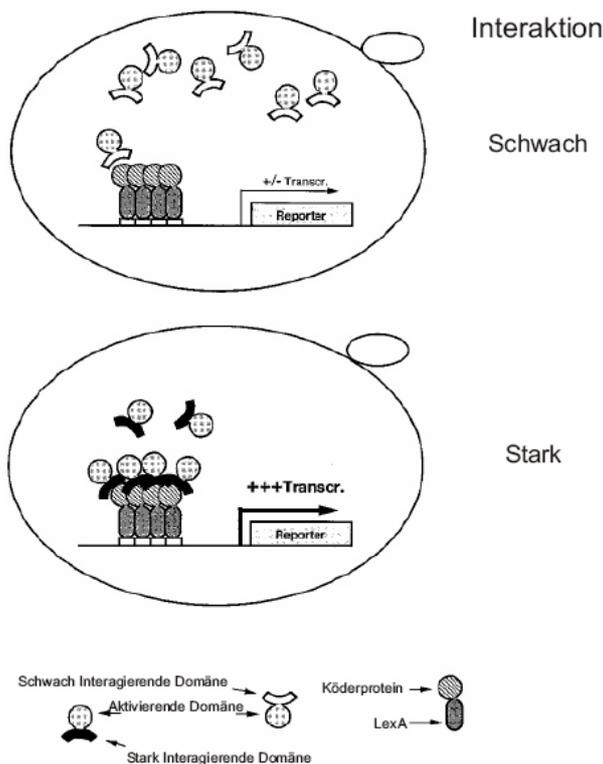


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Regulation der Reporterexpression im Zwei-Hybrid-System. Das Köderprotein, das mit dem DNA-bindendem LexA-Protein fusioniert worden ist, bindet an eines von mehreren LexA-Operatoren, welche die Expression der Reportergene regulieren. Es kann die Transkription jedoch nicht aktivieren. Mit dem Köderprotein interagiert ein weiteres Protein, das mit einem die Transkription aktivierenden Protein (B42) fusioniert worden ist. (Abbildung Estojak et al., 1995²⁵⁸).

Um die Stärke der Interaktion zu quantifizieren wurde berücksichtigt, an welchem Tag (2. bis 5.) die ersten Kolonien auf den SD Gal/Raf His⁻Leu⁻Trp⁻Ura⁻ -Platten wuchsen, sowie die Dichte des Wachstums der Kolonien. Die Interaktion zweier bekannter Proteine wurde als Standard definiert, mit dem die Interaktionsstärke der getesteten Proteine verglichen wurde.

Mit dem Zwei-Hybrid-System wurde die Selbst-Assemblierung des Wildtyp-Proteins und verschiedener Domänenkonstrukte von hGBP1 sowie der Einfluss von Punktmutationen auf die Oligomerisierung untersucht.

Mit den Punktmutanten sollte der Einfluss der GTP-Hydrolyse (R48A) und der Nukleotidbindung (K51A, D103A, D184N) auf die Bildung von Homo- und Heterodimeren analysiert werden. Die Mutation des Cysteins (C589S) des CaaX-Motives soll die Isoprenylierung des Proteins verhindern. Die Isoprenylierung des Proteins dient der Verankerung des Proteins in der Plasmamembran. Durch die Mutation des

CaaX-Motives sollte ein möglicher Einfluss des CaaX-Motives auf die Dimerisierung untersucht und die Translokation der Hybridkonstrukte in den Kern verbessert werden.

Durch die Analyse verschiedener Domänenkonstrukte sollte ermittelt werden, welche Domänen an der Dimerisierung beteiligt sind.

Dazu wurden folgende hGBP1-Konstrukte kloniert und getestet:

Name	Beschreibung
Wt.	Wildtyp Form des humanen Guanylat-bindendem Protein 1 (hGBP1)
R48A	Punktmutante in der P-Schleife; wichtig für die GTP-Hydrolyse
K51A	Punktmutante in der P-Schleife; wichtig für die Nukleotidbindung
D103A	Punktmutante im <i>switch II</i>
D184N	Punktmutante im dritten GTP-Bindungsmotiv
C589S	Punktmutation im CaaX-Motiv, verhindert die Farnesylierung des Proteins
R48AC589S	Punktmutationen in der P-Schleife und im CaaX-Motiv
G-Domäne	C-terminal verkürzte Mutante; G-Domäne und die ersten Aminosäuren der $\alpha 7$ -Helix der helikalen Domäne (AS 1-327)
G-DomäneR48A	C-terminal verkürzte Mutante (AS 1-327) mit einer Punktmutation in der P-Schleife
$\alpha 7$ -13 (helikale Domäne)	N-terminal verkürzte Mutante; bestehend aus den α -Helices 7 bis 13
$\alpha 7$ -11	N-terminal und C-terminal verkürzte Mutante; bestehend aus den α -Helices 7 bis 11
$\alpha 12$	N-terminal und C-terminal verkürzte Mutante; bestehend aus der α -Helix 12
$\alpha 12$ -13	N-terminal verkürzte Mutante; bestehend aus den α -Helices 12 und 13

Tabelle 4: Tabellarische Zusammenfassung der für den 2-Hybrid-Assay verwendeten hGBP1-Konstrukte.

Die Interaktion der verschiedenen Konstrukte wurde in jedem der beiden verwendeten Vektoren (pGilda, pB42AD) getestet. Dadurch ist es möglich nachzuweisen, ob das Wachstum der Zellen auf den Selektionsplatten auf eine „falsch positive“ Interaktion zurückzuführen ist. Dazu erfolgt als Negativkontrolle die Kotransformation mit dem jeweiligen Leervektor. So wird durch die Kotransformation mit dem Leervektor pGilda untersucht, ob das B42-Fusionsprotein die Transkription der Reportergene auch alleine aktiviert. Damit kann eine mögliche DNA-bindende Funktion des getesteten Konstrukts untersucht werden.

Die Negativkontrollen der verschiedenen Konstrukte zeigen, dass keines der Konstrukte eine DNA-bindende Funktion besitzt. Außerdem konnte durch die Kotransformation der beiden Leervektoren nachgewiesen werden, dass es bei dem für die Analyse relevanten Zeitraum (3. bis 5. Tag) kein unspezifisches Wachstum gibt.



Abbildung 12: Interaktionsstärke verschiedener Kotransformation. Die Abbildungen A, B und C repräsentieren die Koloniedichte mit der die Stärke der Interaktion verschiedener Kotransformationen bestimmt wurde. A) hohe Anzahl, starke Interaktion, Symbol: +++ . B) mittlere Anzahl, mittlere Interaktion, Symbol: ++ . C) geringe Anzahl, schwache Interaktion, Symbol: + . Die Koloniedichte wurde am dritten Tag bestimmt. Die Kotransformationen, die erst am vierten Tag sichtbare Kolonien auf den Selektionsplatten zeigten, repräsentierten eine sehr schwache Interaktion Symbol: (+).

Die Abbildung 12 zeigt Beispiele für eine starke (A), mittlere (B) und schwache (C) Interaktion.

Die Stärke der Interaktion wurde anhand der am dritten Tag auf der Selektionsplatte (SD Gal/Raf His^rLeu^rTrp^rUra^r) gewachsenen Kolonien bestimmt.

3.1.1 Der Einfluss der GTPase-Domäne und des CaaX-Motivs

Zuerst wurde der Einfluss der GTPase-Aktivität und des CaaX-Motives auf die Oligomerisierung des Proteins analysiert (Tabelle 5).

		pB42AD								
		Wt	R48A	K51A	D103A	D184N	G-Dom.	G-Dom. R48A	C589S	R48A C589S
pGilda	Wt	+++	+++	0	+++	(+)	+	+	+	+++
	R48A	+++	0	0	++	0	+	(+)		
	K51A	0	0	0	0					
	D103A	+++	++	0	+++					
	D184N	(+)	0			0				
	G-Dom.	+	+				+	(+)		
	G-Dom.R48A	+	(+)				(+)	+++		
	C589S	+							0	+
	R48AC589S	+++							+	0

Tabelle 5: Analyse des Einflusses verschiedener Punktmutationen auf die Bildung von Homo- und Heterodimeren. Die Kontrolle ist die Interaktion des hGBP1 Wildtyps. Die Interaktionsstärke wurde anhand der Anzahl der Kolonien auf der Selektionsplatte (SD Gal/Raf His^rLeu^rTrp^rUra^r) bestimmt. (+++ hohe Anzahl, ++ mittlere Anzahl, + geringe Anzahl, (+) sehr wenige Kolonien am 4. Tag, 0 keine Klone, leere Felder nicht getestet)

Die durch *in vitro* Experimente gezeigte Selbst-Assemblierung von hGBP1^{57,232} konnte im Zwei-Hybrid-System auch *in vivo* nachgewiesen werden.

Die Argininmutante R48A befindet sich in der P-Schleife der G-Domäne. Die GTP-Bindung ist vergleichbar mit der des Wildtyp-Proteins, aber die GTP-Hydrolyse beträgt nur ein Hundertstel der maximalen Aktivität des Wildtyp-Proteins^{57,232}. Im Interaktionsassay bildet die Mutante keine Homodimere aber Heterodimere mit der Wildtypform des Proteins. Die Wildtyp/Wildtyp und die Wildtyp/R48A Kotransformation zeigen eine gleich starke Interaktion auf den Selektionsplatten.

Die ebenfalls in der P-Schleife lokalisierte Lysinmutante K51A bindet GTP 50-fach schwächer als das Wildtyp-Protein^{57,232}. Im Interaktionsassay bildet die Mutante keine Dimere.

Die in der *switch II*-Region lokalisierte Asparaginsäuremutante D103A bindet GTP wie das Wildtyp-Protein, hat aber im Gegensatz zu R48A nur eine um ein Drittel niedrigere maximale GTP-Hydrolyse Aktivität^{57,232}. Im Interaktionsassay bildet die Mutante Homodimere und Heterodimere mit dem Wildtyp-Protein und mit R48A. Die Interaktion zwischen dem Wildtyp-Protein und der Mutante D103A ist dabei gleich stark, während die Interaktion zwischen R48A und D103A schwächer ist als die Wildtyp/Wildtyp Interaktion.

Die im dritten GTP-Bindungsmotiv lokalisierte Asparaginsäuremutante D184N bindet GTP 26-fach schwächer als das Wildtyp-Protein und hat eine um ein Viertel reduzierte maximale GTP-Hydrolyseaktivität^{57,232}. Im Interaktionsassay bildet D184N keine Homodimere und zeigt eine sehr schwache Interaktion mit dem Wildtyp-Protein. Bei der Kotransformation von D184N mit R48A wurden keine Heterodimere gebildet.

Die isolierte G-Domäne (G-Dom.) bindet GTP dreieinhalb Mal schlechter als das Wildtyp-Protein. Sie hat jedoch eine fast doppelt so hohe maximale GTP-Hydrolyseaktivität^{57,232}. Die G-Domäne interagiert als Homodimer und als Heterodimer mit dem Wildtyp-Protein. Die Interaktion ist in beiden Fällen schwach. Die isolierte G-Domäne interagiert schwach als Heterodimer mit R48A.

Im Vergleich zu der isolierten G-Domäne bindet die isolierte G-Domäne, bei der zusätzlich eine R48A Punktmutation eingeführt worden ist (G-Dom.R48A), GTP 27-fach besser als das Wildtyp-Protein. Die maximale GTP-Hydrolyse Aktivität ist fast 500-fach schwächer als beim Wildtyp-Protein^{57,232}. Die G-DomäneR48A interagiert als Homo- und als Heterodimer. Das Homodimer zeigt dabei eine starke Interaktion, während das Heterodimer mit dem Wildtyp-Protein eine schwache Interaktion ist. Die Kotransformation G-Dom.R48A/G-Dom. zeigt, dass die beiden Mutanten sehr schwach interagieren. Die Kotransformation G-Dom.R48A/R48A belegt eine sehr schwache Interaktion der beiden Mutanten.

Die Mutation des Cysteins des CaaX-Motives (C589S) verhindert die Farnesylierung des Proteins. Die Mutation wurde eingeführt, um einen möglichen Einfluss der Farnesylierung auf die Assemblierung von hGBP1 zu untersuchen. Die Mutante interagiert schwach mit dem Wildtyp-Protein. Es gab keine Interaktion bei der Kotransformation C589S/C589S.

Die Doppelmutante R48AC589S bildet keine Homodimere, aber es gibt eine starke Interaktion bei der Kotransformation der R48AC589S Mutante mit dem Wildtyp-Protein. Die Kotransformation R48AC589S/C589S belegt eine schwache Interaktion.

Die Bildung der Mutante/Wildtyp Heterodimere und des Wildtyp/Wildtyp Homodimers beweisen, dass die Proteine in *S. cerevisiae* exprimiert und in den Nukleus transportiert werden.

Durch die Unterschiede der Mutanten R48A, K51A, D103A, D184N sowie der isolierten G-Domäne und der G-DomäneR48A-Mutante bei der Bildung von Homo- und Heterodimeren kann der Einfluss der Nukleotidbindung und der GTP-Hydrolyse auf die Bildung von Oligomeren nachgewiesen werden.

Die Mutante K51A – die GTP 50-fach schwächer bindet als das Wildtyp-Protein – und weder Homo- noch Heterodimere bildet, zeigt, dass beide beteiligten Proteinmoleküle in einem nukleotidgebundenem Zustand vorliegen müssen. Dieser Befund wird durch die Mutante D184N bestätigt. Diese interagiert nur sehr schwach mit dem Wildtyp-Protein und hat wie K51A eine stark reduzierte Affinität zu GTP und eine reduzierte GTP-Hydrolyse-Aktivität.

Die Mutante R48A, die GTP sehr viel schlechter hydrolysiert als das Wildtyp-Protein bindet, bildet keine Homodimere. Sie interagiert jedoch mit dem Wildtyp-Protein und anderen Mutanten, die Nukleotide binden und eine GTPase-Aktivität besitzen. Dies könnte zeigen, dass für die Bildung eines Dimers die GTP-Hydrolyseaktivität eines der beiden beteiligten Proteinmoleküle ausreichend aber auch notwendig ist.

Die schwache Interaktion zwischen der C589S Mutante und dem Wildtyp-Protein sowie das Fehlen des C589S-Homodimers belegen, dass die Farnesylierung des Proteins die Stärke der Assemblierung beeinflusst. Die starke Interaktion des R48AC589S/Wildtyp Heterodimers zeigt, dass die Mutation des Arginin 48 die auf die fehlende Farnesylierung zurückzuführende Schwächung der Interaktion kompensiert. Die schwache Interaktion des R48AC589S/C589S Heterodimers ist ebenfalls ein Indiz dafür, dass durch die Mutation des Arginins 48 der Effekt der fehlenden Farnesylierung abgeschwächt wird.

3.1.2 Beiträge der globulären und helikalen Domänen zur Dimerisierung

In der zweiten Interaktionsstudie wurde der Einfluss der verschiedenen Domänen auf die Dimerisierung untersucht.

Die Kristallstruktur der nukleotidfreien bzw. der GppNHp-gebundenen Form von hGBP1 zeigt, dass das Protein aus zwei Domänen besteht^{50,231}; einer großen globulären α/β -GTPase-Domäne (G-Domäne) und einer lang gestreckten α -helikalen Domäne. Die α -helikale Domäne besteht aus zwei Subdomänen, bei der die Mitteldomäne mit den α -Helices 7-11 dem Molekül eine längliche Form gibt. Die zweite Subdomäne besteht aus einer sehr langen α -Helix (12), die zurück zur G-Domäne führt. Die α -Helix 13 bildet mit dem Ende der α -Helix 12 eine coiled-coil-Struktur⁵⁰.

Es gibt nur sehr wenige Wechselwirkungen zwischen der α -Helix 12 und der Mitteldomäne bzw. der G-Domäne. Die α -Helix 12 hat acht direkte Kontakte mit den α -Helices 7-11 und vier weitere direkte Kontakte mit der G-Domäne. Zusätzlich gibt es siebzehn Kontakte zwischen der α -Helix 12 und der Mit-

teldomäne bzw. der G-Domäne, die durch Wassermoleküle vermittelt werden. Da die von den α -Helices 12/13 bedeckte Oberfläche der Mitteldomäne und der G-Domäne hydrophil ist und nur wenige Bindungen aufgebrochen werden müssten, wurde vorgeschlagen, dass die Loslösung der α -Helices 12/13 eine Interaktionsfläche mit anderen Proteinen bieten könnte⁵⁷.

Die von Balaji Prakash et al. im Komplex mit GppNHp gelöste Struktur ist mit Hilfe von Kristallen bestimmt worden, die nur ein hGBP1 Molekül pro asymmetrischer Einheit enthielten²³¹. Es ist jedoch möglich, dass das GppNHp-gebundene Dimer in Lösung zwei benachbarten Molekülen im Kristallgitter entspricht. Von den sieben kristallographischen Nachbarn wiesen zwei große Interaktionsflächen auf und wurden als potentielle Dimere vorgeschlagen²³¹. Dies waren ein Dimer (A) mit einer Interaktion zwischen der G-Domäne und der helikalen Domäne und ein Dimer (B) mit einer Interaktion zwischen den G-Domänen.

Um die mögliche Interaktionsfläche genauer zu bestimmen, müssen die aus der Kristallstruktur bekannten Subdomänen der helikalen Domäne α 7-13 untersucht werden. Dazu wurden die Subdomäne α 7-11, α 12-13 und α 12 als isolierte Konstrukte in die Plasmide pGilda und pB42AD kloniert.

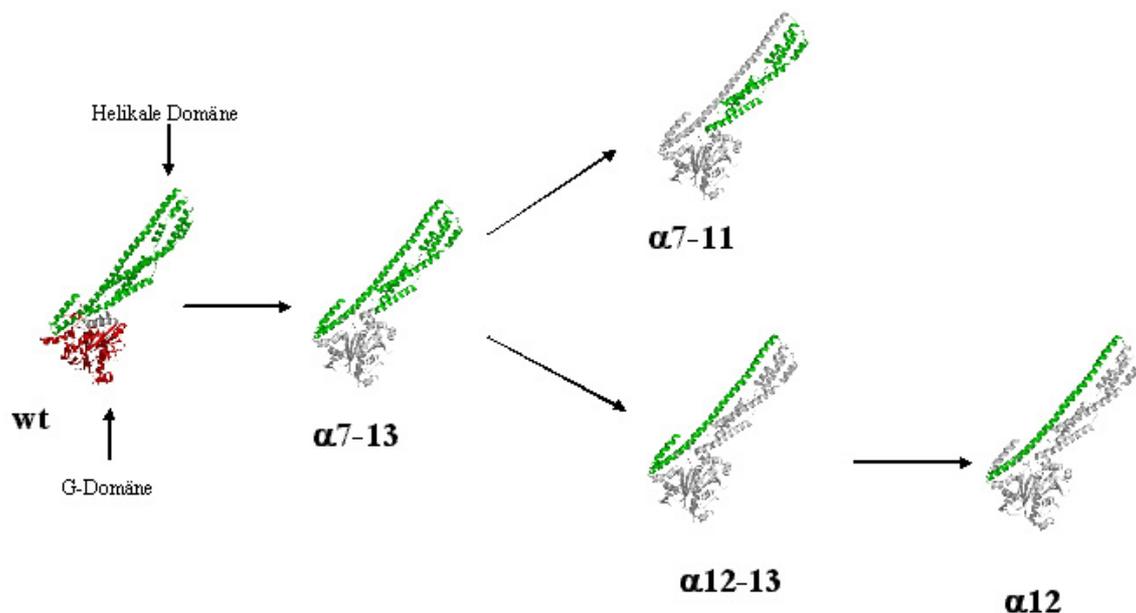


Abbildung 13: Überblick über die getesteten Domänen und Subdomänen.

Der Zwei-Hybrid-Interaktionsassay zeigt folgendes Ergebnis:

	Wt	G-Dom.	G-Dom. R48A	α 7-13	α 7-11	α 12-13	α 12-13 (20 °C)	α 12
Wt	+++	+	+	0	0	0	0	0
G-Dom.	+	+	(+)	0				
G-Dom. R48A	+	(+)	+++	0				
α 7-13	0	0	0	++				
α 7-11	0				0			
α 12-13	0					0		
α 12-13 (20 °C)	0						+	
α 12	0							0

Tabelle 6: Analyse des Einflusses verschiedener Domänenkonstrukten auf die Bildung von Homo- und Heterodimeren. Kontrolle ist die Interaktion des hGBP1 Wildtyps. Die Interaktionsstärke wurde anhand der Anzahl der Kolonien auf der Selektionsplatte (SD Gal/Raf His^rLeu^r Trp^rUra^r) bestimmt. (+++ hohe Anzahl, ++ mittlere Anzahl, + geringe Anzahl, (+) wenige Kolonien am 4. Tag, 0 keine Klone, leere Felder nicht getestet)

Wie schon in 3.1.1 beschrieben, kann im Zwei-Hybrid-Interaktionsassay die Interaktion der beiden G-Domänenkonstrukte (G-Dom. und G-Dom.R48A) in Form von Homo- und Heterodimeren nachgewiesen werden.

Das helikale Domänenkonstrukt α 7-13 bildet Homodimere, jedoch kein Heterodimer mit dem Wildtyp-Protein. Das Homodimer zeigt eine mittlere Interaktionsstärke.

Um die aus der Kristallstruktur postulierte Interaktion zwischen G-Domäne und helikaler-Domäne zu testen, wurden die Kotransformationen G-Dom./ α 7-13 und G-Dom.R48A/ α 7-13 getestet. Der Interaktionsassay zeigt keine Interaktion zwischen der G-Domäne und der helikalen Domäne.

Die fehlende Interaktion zwischen der G-Domäne und der helikalen Domäne ist ein Indiz dafür, dass das aus der Kristallstruktur postulierte Dimer A nicht zutrifft. Das Dimer B postuliert, dass die Interaktion über die G-Domäne des Wildtyp-Proteins erfolgt. Da im Interaktionsassay sowohl die G-Domäne als auch das helikale Domänenkonstrukt α 7-13 Homodimere bilden, könnte dies ein Hinweis auf eine andere Orientierung der hGBP1-Moleküle bei der Dimerisierung sein. Eine zweite Interpretation wäre, dass zuerst durch die Interaktion der G-Domänen ein Dimer gebildet wird. Die Bildung von höheren Oligomeren, die mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie für den GDP·AlF_x-gebundenen Wildtyp-Protein nachgewiesen wurden⁵⁰, könnten auf der Interaktion der helikalen Domänen beruhen.

Die Analyse der helikalen Domänenkonstrukte α 7-11 und α 12 ergibt, dass diese Untereinheiten keine Homo- oder Heterodimere bilden.

Auch das helikale Domänenkonstrukt α 12-13 bildet bei 30 °C keine Homo- oder Heterodimere. Es bildet jedoch durch eine schwache Interaktion Homodimere, wenn die Inkubation auf den Selektionsplatten bei 20 °C statt 30 °C erfolgt. Auf diesen Befund wird in dem Kapitel 3.5 zurückgegriffen.

Die in der Abbildung 14 zu sehenden Selektionsplatte zeigt die wichtigsten Kotransformationen, mit denen Interaktionen nachgewiesen werden. Bei diesem Ansatz erfolgt der Nachweis der Interaktion über die β -Galaktosidase-Aktivität und nicht über die Wachstumsdichte.

Mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems ist die Bildung von Homodimeren durch das Wildtyp-Protein von hGBP1 nachweisbar. Zusätzlich belegen die Mutanten K51A und D184N, dass es ohne GTP-Bindung keine Dimerisierung gibt. Die Mutante R48A bildet mit dem Wildtyp-Protein Heterodimere jedoch keine Homodimere.

Das Zwei-Hybrid-System zeigt außerdem, dass die Dimerisierung nicht über die für das Dimer A postulierte Interaktion der G-Domäne mit der helikalen Domäne erfolgt. Neben der postulierten und auch nachgewiesenen Interaktion der G-Domänen des Dimers B erfolgt eine Interaktion der helikalen Domäne.

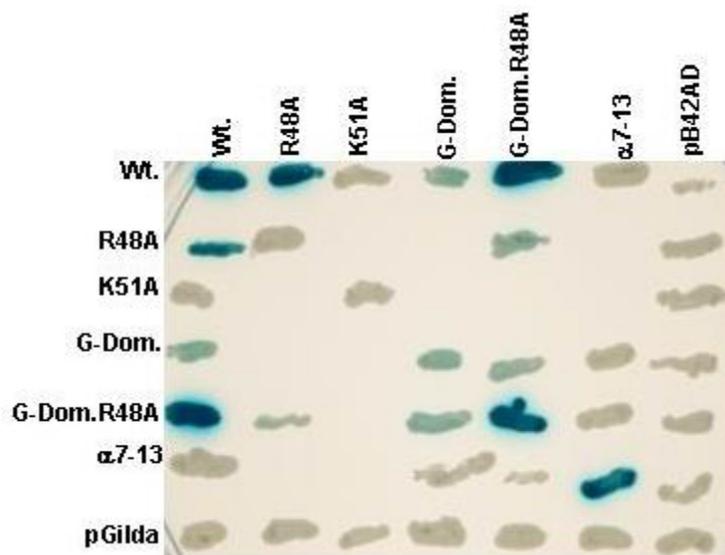


Abbildung 14: Kotransformation des hGBP1 Wildtyps und verschiedener Mutanten. Auf der Musterplatte sind die Interaktionstestpaare zusammengefasst, die belegen, welche Bedeutung die GTP-Hydrolyse-Aktivität (R48A) und die GTP-Bindung (K51A) für die Interaktion hat. Außerdem werden die von der G-Domäne (G-Dom. bzw. G-Dom.R48A) und das von dem helikalen Domänenkonstrukt (α 7-13) gebildeten Homo- und Heterodimere gezeigt. Als Negativkontrolle dient die Kotransformation mit den Leervektoren.

3.2 Bestimmung der Interaktionsstärke

Die Interaktionsstärke der verschiedenen Homo- und Heterodimere, die im Zwei-Hybrid-Interaktionsassay über die Anzahl der Kolonien bestimmt wurde, sollte mittels eines semiquantitativen β -Galaktosidase-Assays („Galacto-Star“) überprüft werden. Das lacZ Reportergen - die β -Galactosidase - ist eines der beiden im Zwei-Hybrid-System verwendeten Reportergene. Sie wird proportional zu der Stärke der Interaktion der beiden Proteine exprimiert. Die enzymatische Aktivität der β -Galactosidase kann mit dem kommerziell erhältlichen Chemilumineszenz-Reportergen-Assay ‚Galacto-Star‘ (Tropix, PE Biosystems) bestimmt werden. Dazu wird die Lumineszenz detektiert, die bei der Umsetzung des in dem Assay eingesetzten Substrats durch die β -Galactosidase auftritt. Um die gemessenen Interaktions-

stärke zu normieren, wurde die β -Galaktosidase-Aktivität des Homodimers des Wildtyp-Proteins gleich 100 Prozent gesetzt.

Die Abbildung 15 zeigt die mit dem semiquantitativen β -Galaktosidase-Assay bestimmte Interaktionsstärke sowie die Koloniedichte im Zwei-Hybrid-System.

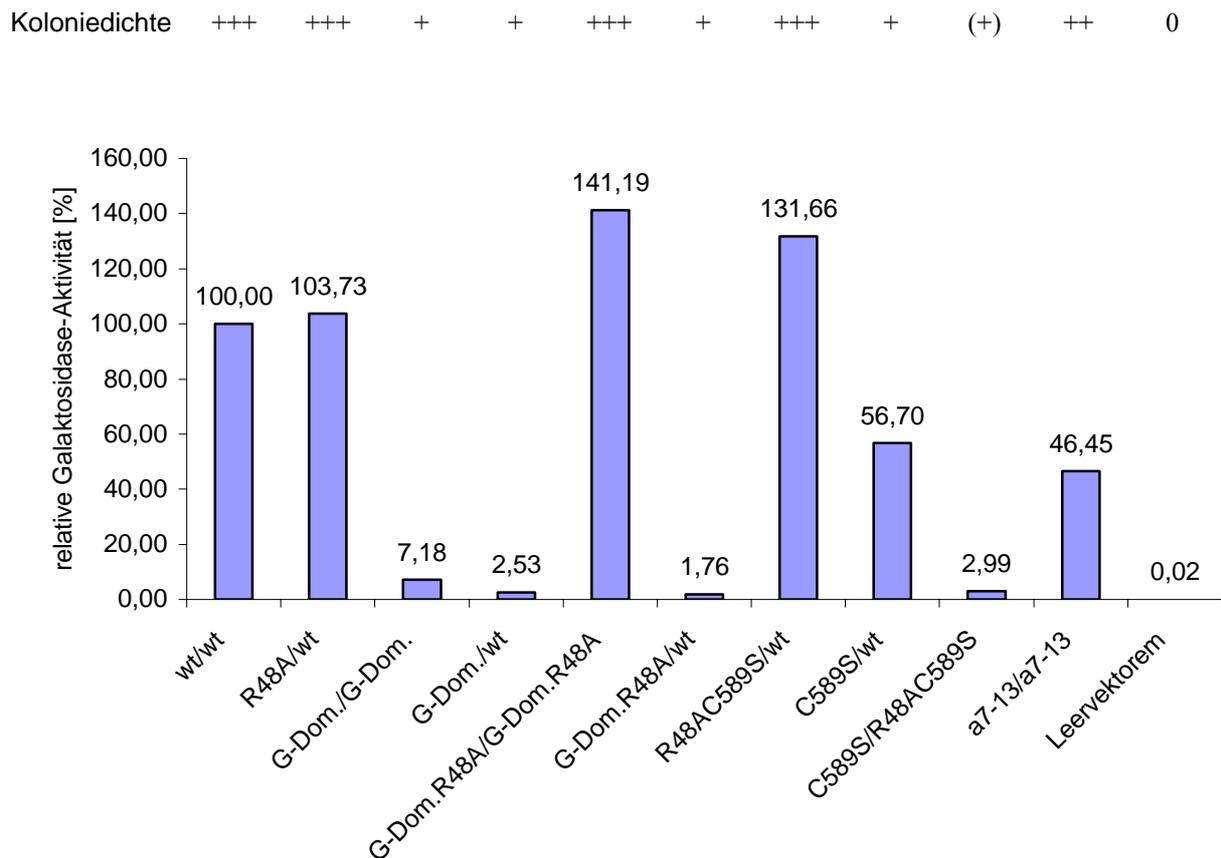


Abbildung 15: Quantifizierung der Interaktionsstärke verschiedener hGBP1 Mutanten. Die Interaktionsstärke verschiedener hGBP1 Mutanten und des Wildtyp-Proteins bei der Bildung von Homo- und Heterodimeren wurde mit dem β -Galaktosidase-Assay („Galacto-Star“) bestimmt und auf die Bindungsaffinität des Wildtyp-Proteins Homodimers normiert. Als Negativkontrolle diente die Interaktion zwischen den Leervektoren pGilda und pB42AD des Zwei-Hybrid-Systems. (+++ hohe Anzahl, ++ mittlere Anzahl, + geringe Anzahl, (+) wenige Kolonien am 4. Tag, 0 keine Klone, leere Felder nicht getestet)

Bei der als Negativkontrolle verwendeten Kotransformation der Leervektoren in die EGY 48 Hefezellen beträgt die β -Galaktosidase-Aktivität 0,02 Prozent.

Der Zwei-Hybrid-Interaktionsassay zeigt eine starke Interaktion zwischen den Kotransformationen: Wildtyp/Wildtyp, R48A/Wildtyp, G-Dom.R48A/G-Dom.R48A und R48AC589S/Wildtyp. Auch im β -Galaktosidase-Assay zeigen diese Kotransformationen eine starke Interaktion. Die β -Galaktosidase-Aktivität der Kotransformationen G-Dom.R48A/G-Dom.R48A und R48AC589S/Wildtyp ist etwas stärker als beim Homodimer des Wildtyp-Proteins.

Die im 2-Hybrid Interaktionsassay als Interaktion mittlerer Stärke klassifizierte Bindung des Homodimers α 7-13 zeigt auch im β -Galaktosidase-Assay eine mittlere Interaktionsstärke. Im Gegensatz zu der schwachen Interaktion des C589S/Wildtyp Heterodimers im Zwei-Hybrid-Interaktionsassay ist im β -Galaktosidase-Assay eine mittlere Interaktionsstärke nachweisbar.

Eine schwache Bindungsaffinität zeigen die Kotransformationen G-Dom./G-Dom., G-Dom./Wildtyp, G-Dom.R48A/Wildtyp und C589S/R48AC589S. Dies entspricht der schwachen Interaktion im Zwei-Hybrid-Interaktionsassay.

Der Vergleich der beiden unterschiedlichen Reportersysteme des Zwei-Hybrid-Systems zeigt, dass beide Systeme das gleiche Ergebnis bringen. Die im β -Galaktosidase-Assay semiquantitativ bestimmte und die im Zwei-Hybrid-Interaktionsassay aus der Koloniedichte abgeleitete Interaktionsstärke sind konsistent.

3.3 Reinigung von hGBP1 Wildtyp und den Domänen

Für die biochemische Analyse der Oligomerisierung des hGBP1 Wildtyp-Proteins und der helikalen Domänen werden die Proteine in ausreichender Menge und großer Reinheit benötigt.

3.3.1 Reinigung von hGBP1 Wildtyp und der G-Domänen

Die cDNA des Wildtyps und der G-Domänenkonstrukte von hGBP1 wurden in den Expressionvektor pQE9 inseriert und in den Bakterienstamm *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Anschließend wurden sie in TB-Amp.-Medium mit 100 μ M IPTG als N-terminale (His₆)-tag-Fusionsproteine exprimiert. Die Reinigung erfolgte, wie von Schwemmlé & Staeheli²¹⁷ beschrieben, durch die Affinitätschromatographie der N-terminalen Histidinmarkierung an Nickel-NTA-Agarose. In einem zweiten Schritt erfolgte eine Größenausschlusschromatographie mit Superdex 200.

3.3.2 Reinigung der helikalen Domänen

Die Insertion der cDNA der helikalen Domänenkonstrukte erfolgte in den Expressionsvektor pGex4T3. Dieser wurde anschließend in *E. coli* BL 21(DE3) transformiert. Die Expression als N-terminale GST-Fusionsproteine erfolgte in TB-Amp.-Medium mit 100 μ M IPTG.

Die N-terminalen GST-Fusionsproteine wurden mit Hilfe der Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose gereinigt. Für die Affinitätschromatographie wurde ein Puffer aus 50 mM Tris/HCl (pH 7,5),

500 mM NaCl und 2 mM DTE verwendet. Der Thrombinverdau (200U) erfolgte auf der Säule über Nacht im gleichen Puffer. Durch eine Größenausschlusschromatographie mit Superdex 75 (Puffer: 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ und 2 mM DTE) wurden geringe Verunreinigungen und aggregiertes Protein entfernt.

Die Abbildung 16 zeigt am Beispiel von hGBP1 α 7-13 die Reinigungsschritte anhand eines SDS-Polyacrylamidgels.

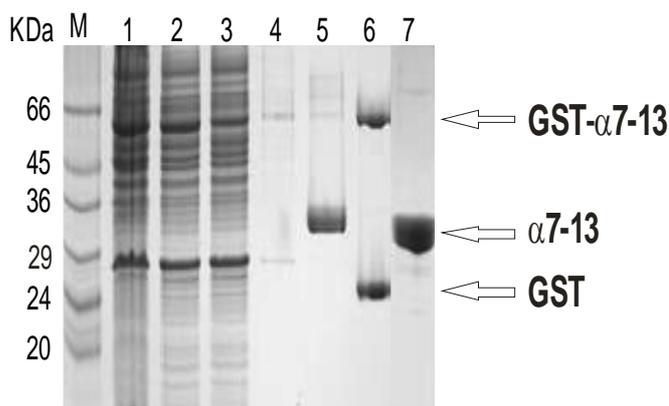


Abbildung 16: Reinigung der helikalen Domäne α 7-13 als GST-Fusionsprotein. M ist der SDS7-Marker, 1 das Rohlysat, 2 der auf die GSH-Sepharose aufgetragene Zentrifugationsüberstand, 3 das beim Auftragen auf die GSH-Sepharose nicht gebundene Protein, 4 der Durchlauf beim Spülen der Säule mit Puffer vor dem Thrombinauftrag, 5 das nach dem Thrombinverdau mit Puffer X eluierte Protein, 6 mit Glutathion eluiertes GST sowie unverdautes GST-hGBP1 und 7 das mit der Größenausschlusschromatographie mit Superdex 75 gereinigte und anschließend aufkonzentrierte Protein.

3.3.3 Reinigung der C589S-Mutante

Die cDNA der C589S-Mutante wurde in den Expressionsvektor pProEx HTb eingefügt und in *E. coli* BL 21(DE3) transformiert. Die N-terminalen (His₆)-tag-Fusionsproteine wurden durch die Kultivierung in TB-Amp.-Medium mit 100 μ M IPTG exprimiert. Die Reinigung erfolgte durch die Affinitätschromatographie der N-terminalen Histidinmarkierung an Nickel-NTA-Agarose. Die Affinitätschromatographie erfolgte in PufferX + 500 mM NaCl. Das Protein wurde mit PufferX mit 250 mM Imidazol eluiert und per Ultrafiltration aufkonzentriert. Anschließend wurde es in 5 ml PufferX aufgenommen und mit der TEV-Protease (200U) über Nacht verdaut. In einem zweiten Schritt erfolgte eine Größenausschlusschromatographie mit Superdex 200.

3.3.4 Massenspektrometrische Analyse der gereinigten Proteine

Nach der Reinigung des Proteins wurde die Molekülmasse mit Hilfe der Massenspektrometrie im MALDI-TOF gemessen. Dadurch kann die vollständige Synthese des Proteins überprüft werden. Als Beispiel für eine Massenspektrometriemessung zeigt Abbildung 17 das Spektrum der helikalen Domäne $\alpha 12$:

Im MALDI-TOF wird die Molekülmasse mit 10,16 kDa bestimmt. Die aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekülmasse beträgt 10,15 kDa. Die korrekte Expression wird damit bestätigt.

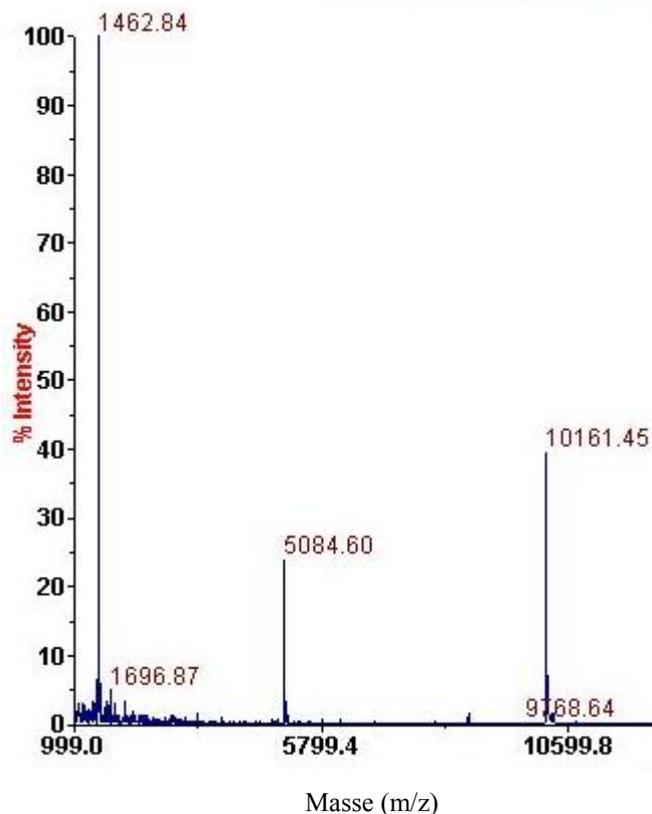


Abbildung 17: Massenspektrum der helikalen Domäne $\alpha 12$. Die Messung erfolgte mit 1 μ l einer Lösung mit 50 μ M Protein. Als Matrix wird 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) in einer Lösung aus Ethanol:Acetonitril:0,1 %TFA (1:1:1) verwendet. Es wurde eine Masse von 10,16 kDa bestimmt.

Alle mit dem MALDI-TOF Massenspektrometer bestimmten Molekülmassen wurden in Tabelle 7 zusammengestellt.

Protein	Theoretische Masse [Da]	Experimentelle Masse [Da]
hGBP1 $\alpha 7$ -13	32702,2	32705
hGBP1 $\alpha 7$ -11	19870,5	19894
hGBP1 $\alpha 12$ -13	13568,5	13581
hGBP1 $\alpha 12$	10146,5	10160
hGBP1 C589S	68101,8	68113

Tabelle 7: Vergleich der theoretischen Proteinmasse verschiedener hGBP1-Mutanten mit der mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie gemessenen Proteinmasse.

Der Vergleich der experimentell bestimmten und der berechneten Molekülmassen zeigt, dass alle Proteine vollständig exprimiert werden.

Die Gelelektrophorese der gereinigten helikalen Domäne α 12-13 zeigt eine zweite Proteinbande. Mit Hilfe des „in Gel Verdau (2.3.2.2)“ und anschließender massenspektrometrischer Analyse der gewonnenen Peptidfragmente wurden die beiden Proteinbanden analysiert. Die Analyse zeigt, dass das kleinere Protein eine um sechs Aminosäuren verkürzte Form von α 12-13 ist. Wie in dem Kapitel 3.6 beschrieben, gibt es Hinweise darauf, dass diesem Proteinfragment das CaaX-Motiv fehlt.

Nachdem die Ergebnisse der Massenspektrometrie zeigen, dass alle Proteine vollständig exprimiert werden, muss die Faltung der Sekundärstruktur der Proteine analysiert werden.

3.4 Die Sekundärstruktur von hGBP1 und seinen Domänen

Da die Kristallstruktur des Wildtyp-Proteins bekannt ist, sollte untersucht werden, ob die Sekundärstruktur der gereinigten Domänen der des Wildtyp-Proteins entspricht. Dazu wurde mit der Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) die Sekundärstruktur der helikalen Domänen bestimmt.

Die im fernen Ultraviolettbereich (190 bis 240 nm) aufgenommenen CD-Spektren sind empfindlich für die Konformation der Proteinhauptkette, da sich die Absorptionsbanden der Peptidbindung mehrfach überlappen.

Für die Messung werden 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) und eine Quartzküvette mit einer Schichtdicke von 0,05 cm verwendet. Die Messung erfolgt bei 20 °C über einen Wellenlängenbereich von 190 bis 250 nm bei zehnfacher Spektrenakkumulation. Da die Qualität der Messung stark von der Konzentration des gemessenen Proteinfragments abhängt, werden folgende Konzentrationen verwendet:

hGBP1 Wt	0,35 mg/ml	5 μ M
hGBP1 G-Dom.	0,20 mg/ml	5 μ M
hGBP1 α 7-13	0,30 mg/ml	10 μ M
hGBP1 α 7-11	0,40 mg/ml	20 μ M
hGBP1 α 12-13	0,68 mg/ml	50 μ M
hGBP1 α 12	0,51 mg/ml	50 μ M

Die Abbildung 18 zeigt das CD-Spektrum der isolierten helikalen Domäne α 12-13.

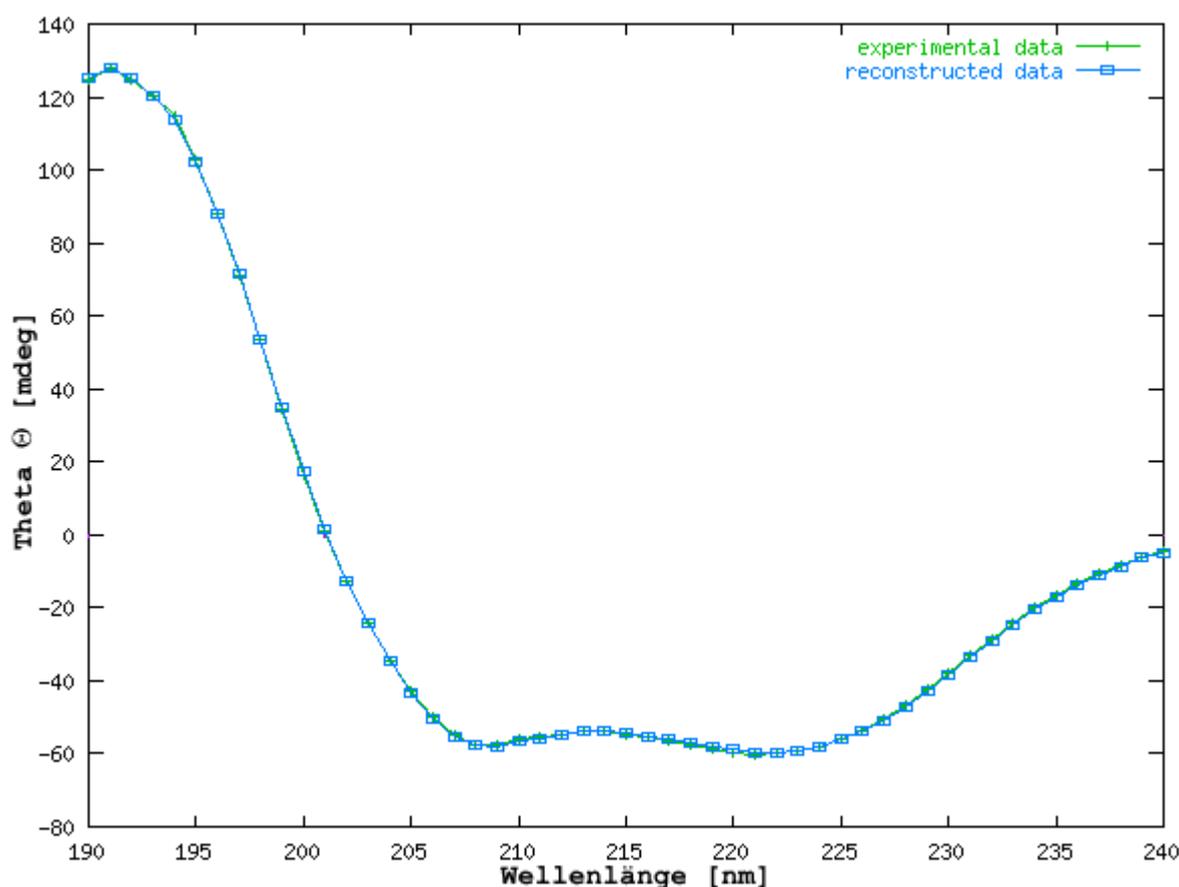


Abbildung 18: CD-Spektrum von 50 μ M hGBP1 α 12-13. Die Messung wurde bei 20 °C in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,5 mit einer 0,05 cm Quartzküvette, mit 1 nm Bandbreite und mit 1 s Integrationszeit durchgeführt. Es wurden zehn Spektren gemessen und akkumuliert. Die Messung wurde mit dem DICHROWEB Webservice ausgewertet.

Sie zeigt das für eine vorwiegend α -helikale Struktur charakteristische CD-Spektrum mit einem ausgeprägten Doppelminimum bei 208 und 222 nm sowie einer positiven Bande bei 190 nm.

Mit Hilfe des DICHROWEB Webservers wurden die CD-Spektren ausgewertet und die Anteile der verschiedenen Strukturelemente an der Sekundärstruktur der Proteine bestimmt²⁴⁴. Die Ergebnisse fasst die Tabelle 8 zusammen.

Die Abbildung 18 zeigt sowohl die experimentell ermittelten (grün) als auch die durch das Programm rekonstruierten (blau) Daten. Bei der gezeigten Messung von hGBP1 α 12-13 sind die Unterschiede zwischen den experimentellen und den rekonstruierten Daten so gering, dass die beiden Graphen deckungsgleich sind.

Die Auswertung des CD-Spektrums von hGBP1 α 12-13 ergibt folgende Anteile an der Sekundärstruktur: 82 % Helix, 10 % ungeordnet, 4 % Turn und 3 % β -Faltblatt. Diese Werte stimmen sehr gut mit den Daten aus der Kristallstruktur überein: (86 % Helix, 9% ungeordnet, 5 % Turn). Damit ist gezeigt, dass die

Subdomäne α 12-13 unabhängig vom Rest des gesamten Proteins eine helikale Struktur ausbildet. Diese Struktur entspricht wahrscheinlich der aus der Kristallstruktur bekannten Struktur der Domäne α 12-13.

Die Auswertung der CD-Spektren des Wildtyp-Proteins und der isolierten Domänen von hGBP1 zeigt die Tabelle 8. Diese ermöglicht einen Vergleich zwischen den mit der CD-Spektroskopie ermittelten sowie der aus der Kristallstruktur des Wildtyp-Proteins bekannten Anteile der verschiedenen Strukturelemente der Sekundärstruktur.

Für das Wildtyp-Protein zeigt der Vergleich, dass die Ergebnisse der beiden Methoden gut übereinstimmen. Wie die Domäne α 12-13 bilden die isolierten helikalen Domänen α 7-13, α 7-11 und α 12 unabhängig vom gesamten Protein eine helikale Struktur. Diese Sekundärstruktur entspricht vermutlich der aus der Kristallstruktur bekannten Struktur der Domänen des gesamten Proteins.

Auch für die isolierte G-Domäne ergibt die CD-Spektroskopie im Vergleich mit den Ergebnissen der Kristallstruktur eine gute Übereinstimmung.

	CD-Spektroskopie				Kristallstruktur			
	Helix [%]	Faltblatt [%]	Turn [%]	Ungeordnet [%]	Helix [%]	Faltblatt [%]	Turn [%]	Ungeordnet [%]
Wt.	66	8	7	19	57,4	9,5	4,5	28,5
G-Dom.	42	13	16	30	36,1	17,1	5,5	41,3
α 7-13	77	7	6	10	84,3	0	12,0	3,7
α 7-11	84	5	5	6	83,5	0	2,5	14
α 12-13	82	3	4	10	86	0	5	9
α 12	87	4	4	10	97,5	0	0	2,5

Tabelle 8: Vergleich der mit der CD-Spektroskopie und der Röntgenkristallographie ermittelten prozentualen Anteile der Sekundärstruktur an der Struktur der Domänenkonstrukte.

Die CD-Spektroskopie zeigt, dass die Faltung der isolierten Domänen der Faltung der aus der Kristallstruktur bekannten Domänen des Wildtyp-Proteins von hGBP1 entspricht. Damit können die Domänen für weitergehende Analysen ihrer Eigenschaften verwendet werden. Nachdem die Faltung der isolierten Domänen überprüft worden ist, soll in einem weiteren Experiment untersucht werden, bis zu welchen Temperaturen die Struktur der Proteine stabil ist.

3.5 Die thermische Denaturierung des Wildtyp-Proteins und der Domänen

Um die thermische Stabilität der Proteine zu untersuchen, wurde ihre Entfaltung mit Hilfe der CD-Spektroskopie analysiert. Für dieses Experiment wurden CD-Spektren der Proben bei Temperaturen zwischen 20 und 70 °C aufgenommen. Dazu wurden die Proteinlösungen in der Messküvette um jeweils 5 Kelvin erwärmt. Um die Reversibilität der Entfaltung zu bestimmen, wurden die Proben wieder auf 20 °C abgekühlt und erneut gemessen. Die Messbedingungen waren die gleichen wie in 3.4.

Am Beispiel der helikalen Domäne α 7-13 zeigt die Abbildung 19, wie sich die Sekundärstruktur in Abhängigkeit von der Temperatur ändert. Die Abbildung zeigt nur einige der gemessenen CD-Spektren. Während sich die CD-Spektren zwischen 20 und 40 °C sowie über 50 °C nur geringfügig ändern, kommt es zwischen 40 und 45 °C zu einer deutlichen Änderung.

Um die Reversibilität der thermischen Entfaltung zu überprüfen, wurde die auf 70 °C erhitzte Proteinlösung wieder auf 20 °C abgekühlt und erneut ein CD-Spektrum gemessen. Das Spektrum zeigt, dass das Protein sich in seine α -helikale Struktur zurückfaltet, d.h. die Entfaltung weitgehend reversibel ist.

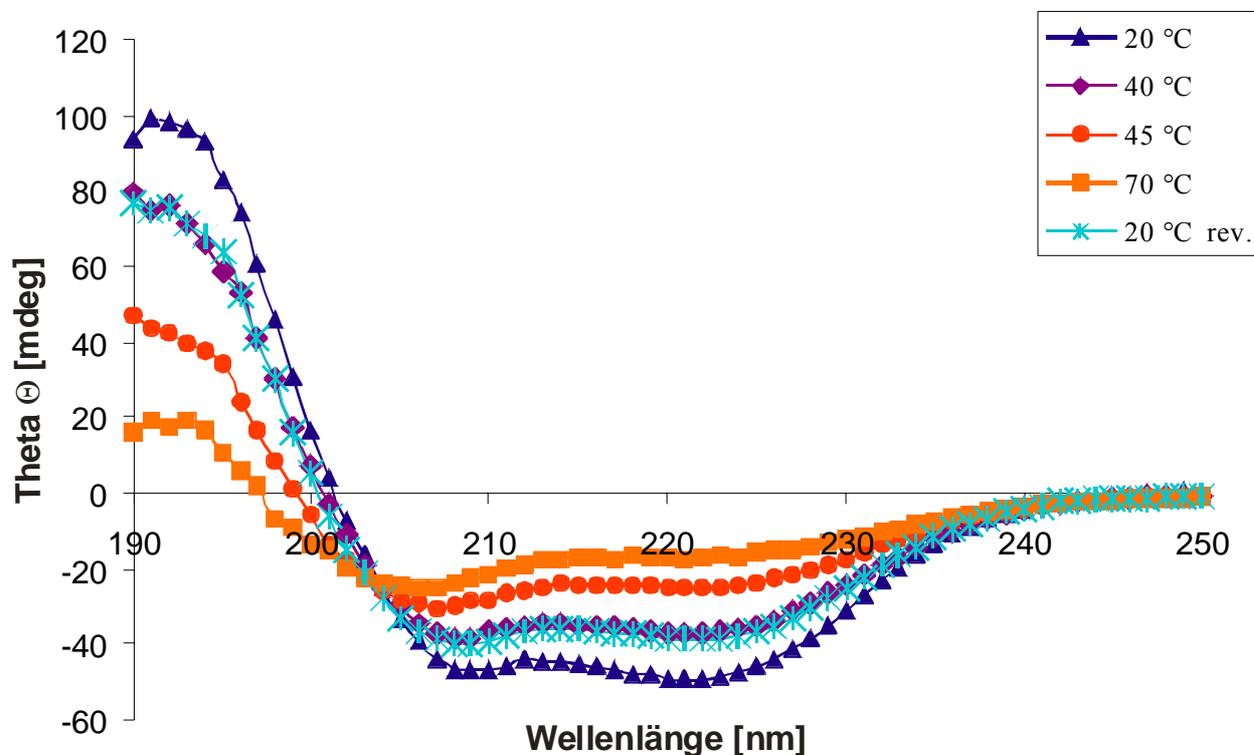


Abbildung 19: Die Denaturierung von hGBP1 α 7-13 (20 μ M). Die Messung der CD-Spektren erfolgte in 5 K Schritten zwischen 20 und 70 °C in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,5). Es wurden jeweils zehn Spektren gemessen und gemittelt. Eine starke Veränderung der Sekundärstruktur erfolgte in einem Temperaturbereich zwischen 40 und 45 °C.

Bei Proteinen, deren Denaturierung reversibel ist, kann die Schmelztemperatur T_m bestimmt werden. Dazu wird die Änderung von Theta Θ bei 222 nm, einem der beiden für α -Helices charakteristischen Minima, gegen die Temperatur aufgetragen. Dies ermöglicht die Bestimmung der halbmaximalen Änderung von Theta. Bei einem irreversibel denaturierenden Protein ist damit nur eine ungefähre Bestimmung der Schmelztemperatur möglich.

Die Abbildung 20 zeigt die Änderung der CD-Spektren der helikalen Domäne α 7-13 bei 222 nm.

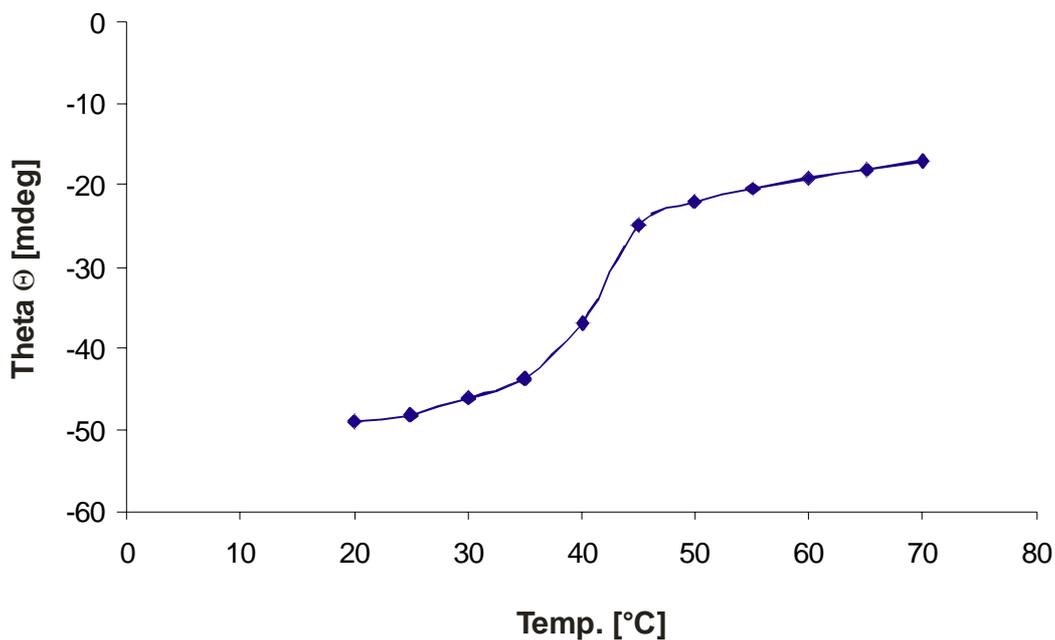


Abbildung 20: Die Denaturierung der helikalen Domäne α 7-13 bei 222 nm. Die aus den CD-Spektren extrahierten Werte für Theta wurden gegen die Temperatur aufgetragen. Dadurch kann aus dem sigmoiden Verlauf der Denaturierung die Schmelztemperatur der helikalen Domäne berechnet werden.

Da die Denaturierung der helikalen Domäne α 7-13 reversibel ist, kann die Schmelztemperatur T_m exakt berechnet werden. Der Kurvenverlauf in der Abbildung 20 zeigt eine halbmaximale Änderung von Theta bei 41 °C.

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie wurden die Reversibilität und die Schmelztemperatur der Denaturierung des Wildtyp-Proteins und der isolierten Domänen untersucht. Die Ergebnisse fasst die Tabelle 9 zusammen.

Protein	Reversibilität der Denaturierung	Schmelztemperatur (T_m) [°C]
hGBP1 Wt.	Irreversibel	46
hGBP1 G-Domäne	Irreversibel	35
hGBP1 α7-13	Reversibel	41
hGBP1 α7-11	Reversibel	33
hGBP1 α12	Reversibel	$\ll 30$
hGBP1 α12-13	Reversibel	30/49

Tabelle 9: Reversibilität und Schmelztemperatur T_m der Denaturierung des Wildtyp-Proteins und der Domänenkonstrukte von hGBP1.

Die Denaturierung des Wildtyp-Proteins und der G-Domäne sind irreversibel, so dass nur eine ungefähre Schmelztemperatur bestimmt werden kann. Für das Wildtyp-Protein wurde eine Schmelztemperatur von 46 °C und für die G-Domäne von 35 °C ermittelt. Die Struktur der isolierten G-Domäne ist damit deutlich instabiler als die des Wildtyp-Proteins.

Im Unterschied zum Wildtyp-Protein und der isolierten G-Domäne ist die Denaturierung der helikalen Domänen reversibel. Die halbmaximale Änderung von Theta entspricht damit bei den helikalen Domänen der Schmelztemperatur T_m .

Die temperaturabhängige Stabilität der Sekundärstruktur der helikalen Domäne α 7-13 entspricht mit einer Schmelztemperatur von 41 °C fast der des Wildtyp-Proteins (46 °C). Die Schmelztemperaturen der einzelnen Subdomänen (α 7-11, α 12-13 und α 12) sind niedriger als die der helikalen Domäne α 7-13.

Die Sekundärstruktur der helikalen Domäne α 7-11 hat eine Schmelztemperatur von 33 °C. Diese ist im Vergleich mit der helikalen Domäne α 7-13 und dem Wildtyp-Protein deutlich reduziert.

Die temperaturabhängige Denaturierung von hGBP1 α 12 zeigt, dass die Sekundärstruktur der Domäne sehr instabil ist. Die Denaturierung erfolgt schon bei Temperaturen zwischen 20 und 30 °C, so dass es nicht möglich ist, die Schmelztemperatur T_m zu bestimmen.

Bei der temperaturabhängigen Denaturierung der helikalen Domäne hGBP1 α 12-13 gibt es zwei Temperaturbereiche mit einer deutlichen Änderung der Sekundärstruktur. Die erste halbmaximale Änderung des CD-Werts liegt bei 30 °C und die zweite bei 49 °C. Bei Messungen mit der Differential Scanning Kalorimetrie (3.6 und 3.9) sind ohne 2-Mercaptoethanol zwei Schmelztemperaturen und mit 2-Mercaptoethanol eine Schmelztemperatur nachweisbar. Da die Subdomäne α 12-13 im 2-Hybrid-Assay Homodimere bildet, könnten die beiden unterschiedlichen Schmelztemperaturen darauf zurückzuführen sein, dass erst das Dimer dissoziiert und sich das Protein anschließend entfaltet. Eine weitere mögliche Erklärung ist eine temperaturabhängige, kovalente Verknüpfung der helikalen Domäne über eine Disulfidbrücke. Diese mögliche Verknüpfung wird in dem Kapitel 3.6 untersucht.

Die Entfaltung der helikalen Domäne α 12-13 bei 30 °C ist wahrscheinlich auch die Erklärung dafür, dass es bei dem Zwei-Hybrid-Interaktionsassay (3.1.2) nur zu einer Bildung von Homodimeren kam, wenn die Platten bei 20 °C inkubierten.

Die Analyse der temperaturabhängigen Denaturierung mit der CD-Spektroskopie zeigt, dass die Stabilität der Sekundärstruktur der Domänen niedriger ist als beim Wildtyp-Protein. Während bei Experimenten mit dem Wildtyp-Protein oder der helikalen Domäne α 7-13 Temperaturen bis zu 40 °C verwendet werden können, sollten sie für die isolierte G-Domäne unter 35 °C liegen. Für die Domänen α 7-11 sowie α 12-13 sollten Versuchsbedingungen mit Temperaturen unter 30 °C und für die Domäne α 12 unter 20 °C gewählt werden.

Der Unterschied zwischen den Schmelztemperaturen der G-Domäne, α 7-13 und dem Wildtyp-Protein ist ein Hinweis darauf, dass sich beim Wildtyp-Protein die helikale Domäne und die G-Domäne gegenseitig stabilisieren, also nicht völlig voneinander unabhängige Proteindomänen sind.

Nachdem die Temperaturen bekannt sind, bei denen das Wildtyp-Protein und seine isolierten Domänen denaturieren, soll untersucht werden, worauf die beiden Schmelztemperaturen der helikalen Domäne α 12-13 zurückzuführen sind.

3.6 Die Thermische Denaturierung der Subdomäne α 12-13

Die CD-Spektroskopie zeigt, dass es bei der temperaturabhängigen Denaturierung der helikalen Domäne α 12-13 zwei Schmelztemperaturen gibt. Auch durch die Analyse des Proteins mit Hilfe der Differential Scanning Kalorimetrie (DSC) (Kapitel 3.9) können zwei Schmelztemperaturen nachgewiesen werden. Diese werden durch zwei unabhängige Signale der Schmelzkurve belegt.

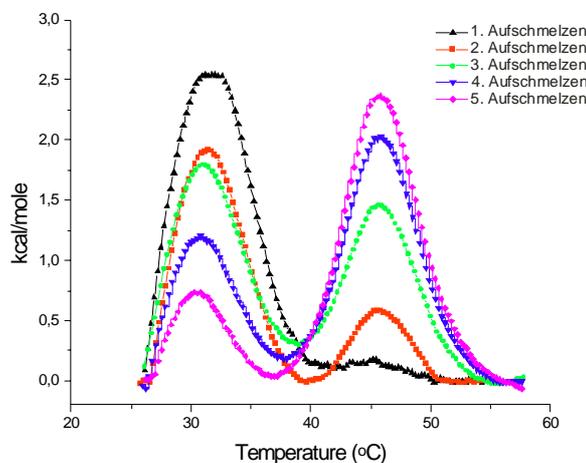


Abbildung 21: Reversibles Aufschmelzen von 25 μ M der helikalen Domäne α 12-13 mit dem Differential Scanning Kalorimeter. Das Aufschmelzen der Probe erfolgte in einem Puffer aus 10 mM Phosphat (pH 7,5) und 20 mM Glycin. Die Domäne hat zwei Schmelztemperaturen eine bei 31 °C und eine bei 46 °C.

Die Abbildung 21 zeigt, dass bei der Untersuchung der Reversibilität des Proteins durch das mehrfache Aufschmelzen einer Probe die Intensität des Signals mit der niedrigeren Schmelztemperatur (31 °C) abnahm, während sie bei dem zweiten Signal (46 °C) zunahm. Die Messungen erfolgten zuerst in einem Puffer aus 10 mM Phosphat (pH 7,5) und 20 mM Glycin ohne die Zugabe von 2-Mercaptoethanol. Wenn dem Puffer 2-Mercaptoethanol zugesetzt wird, zeigt die Schmelzkurve nur das Signal der niedrigeren Schmelztemperatur. Da 2-Mercaptoethanol Disulfidbrücken reduziert, ist dieses Ergebnis ein Indiz dafür, dass bei hohen Temperaturen die Subdomäne α 12-13 durch eine Disulfidbrücke verknüpft wird.

Die Bildung einer Disulfidbrücke sollte durch die Inkubation des Proteins bei 60 °C in Puffern ohne bzw. mit 2-Mercaptoethanol überprüft werden. Diese Temperatur wurde gewählt, da sie über der Schmelztemperatur liegt, die mit der DSC und der CD-Spektroskopie ermittelt wurde.

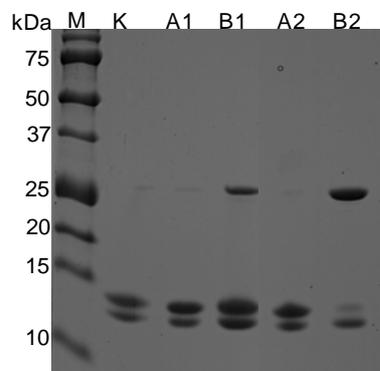


Abbildung 22: Temperaturabhängige Bildung von Disulfidbrücken bei hGBP1 α 12-13.

In einem Puffer aus 10 μ M Phosphat (pH 7,5) und 20 μ M Glycin inkubierten 50 μ M hGBP1 α 12-13 bei 60 °C. Der Puffer der Probe A war mit 2 mM 2-Mercaptoethanol versetzt, während der Puffer der Probe B kein Reduktionsmittel enthielt. Von diesen Proben wurden nach 10 Minuten (1) bzw. 180 Minuten (2) Aliquots entnommen. Als Kontrolle (K) inkubierte eine weitere Probe von 50 μ M α 12-13 für 180 Minuten auf Eis. Die Probe wurde mit 1/5 Volumen 6x SDS-Probenpuffer (ohne DTE) versetzt und mit einem 13%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Marker (M) wurde der „Precision Plus Protein™ Standard“ von BIORAD verwendet.

Dazu wurden zwei Proben (A und B) für drei Stunden bei 60 °C erhitzt, wobei nur der Puffer der Probe A das Reduktionsmittel 2-Mercaptoethanol enthielt. Zur Kontrolle (K) inkubierte ein Aliquot des Proteins bei Raumtemperatur in einem Puffer ohne 2-Mercaptoethanol. Anschließend erfolgte die Trennung der Proteine auf einem SDS-Polyacrylamidgel.

Wie das in der Abbildung 22 dargestellte SDS-Polyacrylamidgel zeigt, führt die Inkubation der Probe B bei 60 °C bei dem größeren Protein zur Bildung von „Dimeren“. Im Unterschied dazu sind die Kontrolle und die Probe A auch nach drei Stunden Inkubationszeit nicht dimerisiert. Das auf dem Gel zu sehende kleinere Protein ist weder bei der Probe B noch bei der Kontrolle oder der Probe A an der „Dimerisierung“ beteiligt.

Mit Hilfe des „In-Gel-Verdaus“ und der Massenspektrometrie [3.3.4] kann gezeigt werden, dass es sich bei beiden Proteinen um die helikale Domäne α 12-13 handelt. Allerdings handelt es sich bei dem kleineren Protein um ein um sechs Aminosäuren kürzeres Fragment. Da das kleinere Protein bei der Probe B keine „Dimere“ bildet und die Domäne nur das Cystein C589 des CaaX-Motives besitzt, ist anzunehmen, dass diesem Protein das C-terminale CaaX-Motiv fehlt.

Das Experiment weist nach, dass es bei Messungen mit hohen Temperaturen und ohne Reduktionsmittel zur Bildung eines über eine Disulfidbrücke verknüpften artifiziellen „Dimers“ kommen kann. Deswegen ist es notwendig, die anschließenden Experimente bei niedrigeren Temperaturen oder mit einem Reduktionsmittel durchzuführen, um eine artifizielle Dimerisierung zu verhindern.

In den anschließenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die im Zwei-Hybrid-Interaktionsassay nachgewiesene Homodimerisierung mit anderen Methoden näher quantifiziert werden kann.

3.7 Die Oligomerisierung des Wildtyp-Proteins und seiner Domänen

3.7.1 Analytische Größenausschlusschromatographie

Die nukleotidabhängige Oligomerisierung des hGBP1 Wildtyps sowie der G-Domäne ist sowohl mit der analytischen Größenausschlusschromatographie als auch mit der analytischen Ultrazentrifugation nachgewiesen worden⁵⁷.

Die im Zwei-Hybrid-Interaktionsassay gezeigte Homodimerisierung eines Teils der helikalen Domänen sollte mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie überprüft werden. Außerdem wurde untersucht, ob die CaaX-Box-Mutante C589S in der Größenausschlusschromatographie – wie im Zwei-Hybrid-Interaktionsassay – nicht dimerisiert. Zusätzlich zu den helikalen Domänen wurden das Wildtyp-Protein und die G-Domäne im nukleotidfreien Zustand gemessen.

Die Größenausschlusschromatographie erfolgte mit Superdex 75 bzw. 200 Säulen an einer ÄKTAexplorer-HPLC (Amersham Pharmacia biotech). Die Superdex 75 bzw. 200 Säulen bestehen aus hochvernetzter Agarose mit kovalent gebundenem Dextran und unterscheiden sich im Grad der Vernetzung des Säulenmaterials.

Die Abbildung 23 zeigt eine Überlagerung der Elutionsprofile des Wildtyp-Proteins von hGBP1 in der nukleotidfreien Form (1) sowie der isolierten helikalen Domäne α 12-13 (2).

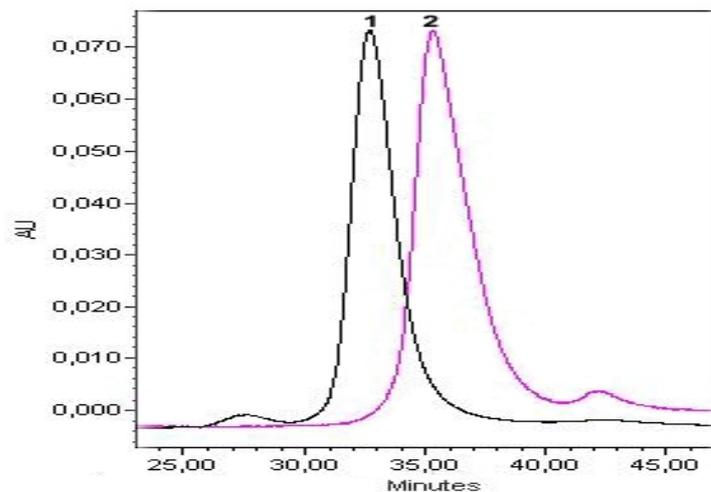


Abbildung 23: Analytische Größenausschlusschromatographie von hGBP1 Wt. (1) und der helikalen Domäne α 12-13 (2).

Für die Größenausschlusschromatographie wurden eine Superdex 75 Säule und ein Puffer aus 50 mM Tris/HCl (pH 7,4), 5 mM $MgCl_2$ und 2 mM DTE verwendet. Die Flussgeschwindigkeit betrug 3,5 ml pro Minute.

Um das Molekulargewicht der Proteine zu bestimmen, wurden die Säulen kalibriert. Für die Kalibrierung wurden die Elutionsvolumina folgender Proteine und Proteindomänen gemessen: BSA (66 kDa), GST (25,5 kDa), Ras (21 kDa), Ras 1-166 (18,5 kDa) und RaIGDSRBD (11 kDa). Um die Eichgerade zu erstellen, wurden die Elutionsvolumina gegen den dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts der Proteine aufgetragen.

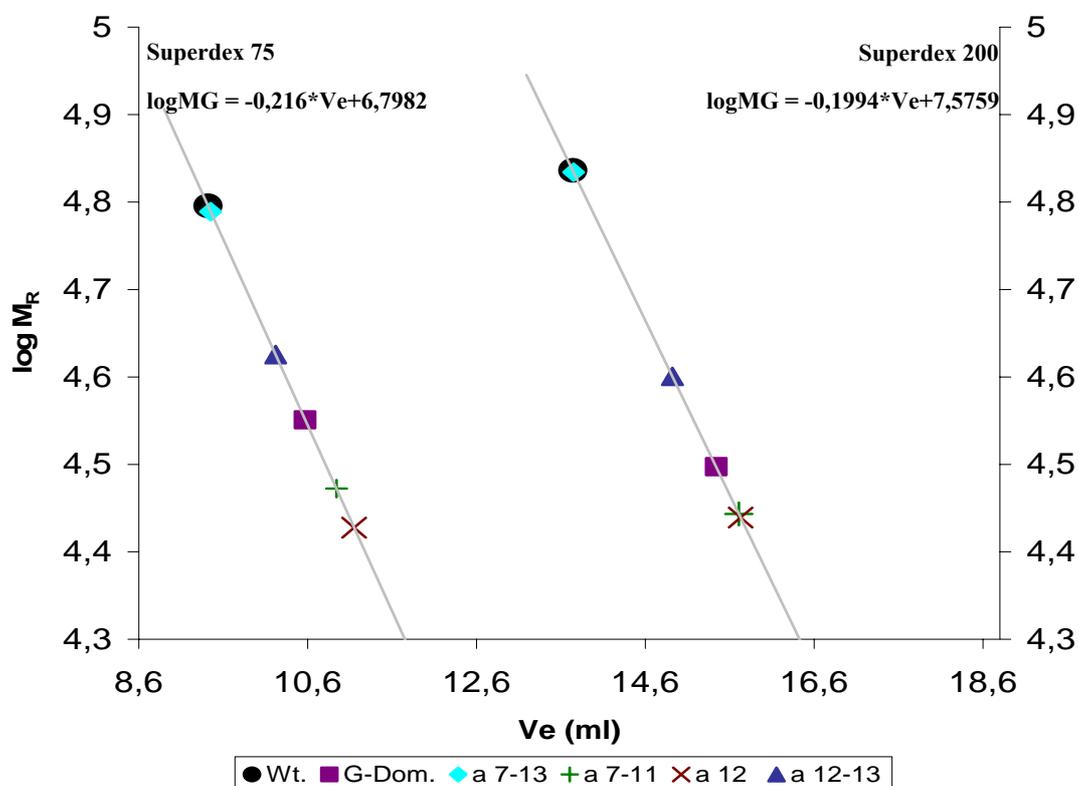


Abbildung 24: Analyse der Oligomerisierung von hGBP1 Wildtyp ohne Nukleotid und der isolierten Domänen mit der Superdex 75 bzw. 200 Säule.

Die Abbildung 24 zeigt die mit der Superdex 75-Säule bzw. Superdex 200-Säule gemessenen Elutionsvolumina. Die Elutionsvolumina des Wildtyp-Proteins und der helikalen Domäne α 7-13 sind gleich groß und überlagern sich in der Abbildung. Die für die helikalen Domänen α 7-11, α 12 und α 12-13 bestimmten Molekülmassen sind bei beiden Säulen ungefähr gleich groß, während die gemessenen Molekülmassen für das Wildtyp-Protein, der G-Domäne und der helikalen Domäne α 7-13 je nach verwendetem Säulenmaterial eine etwas größere Differenz zeigen. Die gemessenen Molekülmassen fasst die Tabelle 10 zusammen.

	Superdex 75 (kDa)	Superdex 200 (kDa)	Berechnete Molekülmasse (kDa) (monomer)	Moleküleinheit
Wt.	62,4	68,6	69,2	Monomer
G-Dom.	35,5	31,4	37,4	Monomer
α 7-13	61,5	68,3	32,7	Dimer
α 7-11	29,7	27,8	19,9	Monomer/Dimer
α 12	26,1	27,9	10,1	Dimer/Trimer
α 12-13	42,6	40,3	13,6	Trimer

Tabelle 10: Zusammenfassung der mit der Größenausschlusschromatographie gemessenen und der berechneten Molekülmasse.

Die für das Wildtyp-Protein und die G-Domäne gemessenen Molekülmassen entsprechen der berechneten Molekülmasse des monomeren Proteins. Bei den helikalen Domänen gibt es einen deutlichen Unterschied zwischen den berechneten und den gemessenen Molekülmassen. Die Molekülmasse, die für die helikale Domäne α 7-13 gemessen wird, entspricht einem Dimer, während die gemessene Molekülmasse der Subdomäne α 7-11 zwischen den berechneten Molekülmassen eines Monomers und eines Dimers liegt. Die gemessene Molekülmasse der Subdomäne α 12 liegt zwischen der eines Dimers und eines Trimers, während sie bei der Subdomäne α 12-13 einem Trimer entspricht. Bei einem Vergleich der berechneten und der gemessenen Molekülmasse ist zu berücksichtigen, dass bei der Größenausschlusschromatographie nicht nur die Molekülmasse, sondern auch die Proteinstruktur das Elutionsvolumen beeinflusst. Dadurch kann die gemessene Molekülmasse eines elongierten Moleküls größer sein als die tatsächliche Molekülmasse.

Mit der Größenausschlusschromatographie wurde zusätzlich der Einfluss des CaaX-Motives und der Mutation des Aspartats 184 auf die Nukleotidabhängige Oligomerisierung untersucht (Tabelle 11). Im Unterschied zum Wildtyp-Protein kann im Zwei-Hybrid-Interaktionsassay für beide Mutanten keine Dimerisierung nachgewiesen werden.

	GFC-1300-Säule (kDa)	Berechnete Molekülmasse (kDa) (monomer)	Moleküleinheit
Wt.	69,1	69,2	Monomer
Wt. + GppNHp	120,0	69,2	Dimer
hGBP1C589S	67,0	68,1	Monomer
hGBP1C589S + GppNHp	119,0	68,1	Dimer
hGBP1D184N	57,8	68,9	Monomer
hGBP1D184N + GppNHp	57,8	68,9	Monomer

Tabelle 11: Vergleich der mit der Größenausschlusschromatographie gemessenen Molekülmassen von hGBP1 und der Mutante hGBP1C589S

Bei der Größenausschlusschromatographie bildet die C589S Mutante wie das Wildtyp-Protein in Gegenwart von GppNHp Dimere. Es kann kein Unterschied zwischen der C589S-Mutante und dem Wildtyp-Protein nachgewiesen werden. Für die Aspartatmutante D184N kann keine Dimerisierung nachgewiesen werden, womit die Ergebnisse des Zwei-Hybrid-Interaktionsassays bestätigt werden.

Für die helikalen Domänen $\alpha 7-13$ und $\alpha 12-13$ bestätigt die Größenausschlusschromatographie die im Zwei-Hybrid-Interaktionsassay nachweisbare Bildung von Homodimeren. Die helikale Domäne $\alpha 12-13$ könnte auch ein Trimer sein.

Das im Zwei-Hybrid-Interaktionsassay monomere $\alpha 7-11$ entspricht auch bei der Größenausschlusschromatographie eher einem Monomer.

Im Unterschied zum Zwei-Hybrid-Interaktionsassay wird mit der Größenausschlusschromatographie für die helikale Domäne $\alpha 12$ kein Monomer sondern ein Trimer nachgewiesen.

Die Unterschiede zwischen dem Zwei-Hybrid-Interaktionsassay und der Größenausschlusschromatographie könnten auf die unterschiedlichen Temperaturen zurückzuführen sein, bei denen die Versuche durchgeführt werden. Der Zwei-Hybrid-Interaktionsassay wird bei 30 °C und die analytische Größenausschlusschromatographie bei 4 °C durchgeführt. Die mit der CD-Spektroskopie und der DSC nachgewiesenen Temperaturen der thermischen Denaturierung belegen, dass sich die helikale Domäne $\alpha 12-13$ bei 30 °C und die Domäne $\alpha 12$ unter 30 °C entfaltet. Da die analytische Größenausschlusschromatographie bei 4 °C durchgeführt wird, ist die Struktur dieser Domänen hier stabiler als im Zwei-Hybrid-Interaktionsassay.

3.7.2 Dynamische Lichtstreuung

Mit der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) wird der hydrodynamische Radius von Molekülen bestimmt, aus dem die Molekülmasse berechnet werden kann. Für die Berechnung der Molekülmasse wurde das

Dynamics V6 Programm verwendet. In dieses Programm sind zwei verschiedene Modelle integriert, deren Kalibrierung auf den hydrodynamischen Radien von globulären bzw. gestreckten Molekülen beruht. Es wurden beide Modelle getestet, da die korrekte Ableitung der Molekülmasse aus dem hydrodynamischen Radius abhängig von der Form des Moleküls ist.

Die Messungen wurden mit 200 μM Protein in einem Puffer aus 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, und 5 mM MgCl_2 bei 4°C durchgeführt.

Um zu ermitteln, welches Modell besser geeignet ist, wurde der hydrodynamische Radius des Wildtyp-Proteins von hGBP1 bestimmt, dessen Molekülmasse und Struktur bekannt sind.

Für das Wildtyp-Protein wurden folgende Werte gemessen:

Modell	\bar{R}_h [nm]	\bar{M} [kDa] (berechnet)
globulär	6,45	268,5
gestreckt	6,94	68,2

Tabelle 12: Darstellung der mit der Lichtstreuung gemessenen hydrodynamischen Radien unter Verwendung eines Modells für ein globuläres bzw. ein gestrecktes Molekül und der daraus berechneten Molekülmasse. \bar{R}_h ist der Mittelwert aller gemessenen hydrodynamischen Radien und \bar{M} der Molekülmasse.

Die Tabelle 12 zeigt die für den hGBP1-Wildtyp gemessenen Radien. Für die Auswertung der Messungen wurden beide Modelle verwendet. Die mit dem Modell für gestreckte Moleküle bestimmte Molekülmasse des Wildtyp-Proteins beträgt 68,2 kDa. Sie entspricht damit der aus der Aminosäuresequenz berechneten Molekülmasse von 69,2 kDa. Die mit dem Modell für globuläre Moleküle bestimmte Molekülmasse ist deutlich höher.

Die Verwendung des globulären Modells zur Bestimmung der Molekülmasse der helikalen Domänen ergibt deutlich zu hohe Werte. Deswegen erfolgte die Auswertung der DLS-Messungen mit dem Modell für gestreckte Moleküle.

Für das Wildtyp-Protein und die helikale Domäne $\alpha 7$ -11 wurden Doppelmessungen und für die helikalen Domänen $\alpha 7$ -13 und $\alpha 12$ -13 Dreifachmessungen durchgeführt. Der hydrodynamische Radius der helikalen Domäne $\alpha 12$ konnte mit Hilfe der DLS-Methode nicht bestimmt werden.

Jede Messung besteht aus Einzelbestimmungen von 50 bis 100 hydrodynamischer Radien, für die jeweils 10 Sekunden gemessen wurde.

Bei der Auswertung wurde von jeder Messreihe der Mittelwert aller gemessener hydrodynamischer Radien \bar{R}_h sowie der Molekülmasse \bar{M} ermittelt. Für jede Mehrfachbestimmung wurde aus \bar{R}_h der Mittelwert \bar{R}_{ges} und aus \bar{M} der Mittelwert \bar{M}_{ges} berechnet.

Die gemessenen Molekülradien und die daraus mit dem Modell für gestreckte Moleküle berechneten Molekülmassen zeigt Tabelle 13:

	\bar{R}_h [nm]	\bar{M}_{ges} [kDa]	$M_{theor.}$ [kDa]	Moleküleinheit
Wt	6,94	68,2	69,24	Monomer
$\alpha 7-13$	6,00	52,4	32,7	Dimer
$\alpha 7-11$	3,39	18,6	19,9	Monomer
$\alpha 12-13$	4,30	28,6	13,6	Dimer

Tabelle 13: Durch DLS bestimmte Molekülradien und die daraus berechneten Molekülmassen. Für \bar{R}_{ges} und \bar{M}_{ges} wurden die Mittelwerte aller Radien einer Mehrfachbestimmung berechnet.

Die Molekülmassen aus Tabelle 13 wurden in der Abbildung 25 zusammen mit der aus der Aminosäuresequenz berechneten Molekülmasse $M_{theor.}$ dargestellt.

Der Vergleich der dargestellten Molekülmassen zeigt, dass beim Wildtyp-Protein und der helikalen Domäne $\alpha 7-11$ die mit der DLS-Methode bestimmten Molekülmassen der Molekülmasse eines Monomeren Proteins entspricht.

Die so bestimmte Molekülmasse der helikalen Domäne $\alpha 12-13$ entspricht der eines Homodimers.

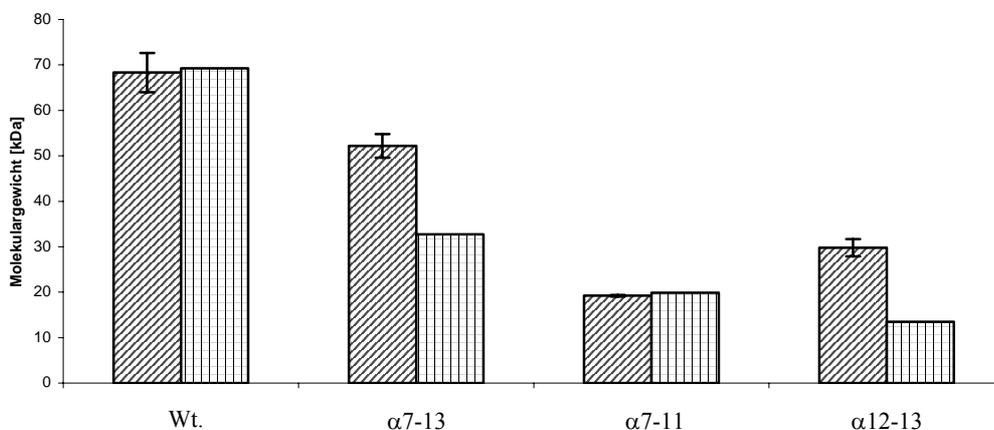


Abbildung 25: Graphische Darstellung der mit Hilfe der DLS-Methode bestimmten sowie der aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten Molekülmasse. Der erste Balken repräsentiert die Werte für \bar{M}_{ges} und der zweite Balken $M_{theor.}$

Die gemessene Molekülmasse der helikale Domäne $\alpha 7-13$ ist niedriger als es für ein Homodimer berechnet wurde, jedoch deutlich größer als bei einem Monomer. Die Ursache könnte eine nicht vollständig gestreckte Struktur des Dimers sein oder ein Gemisch von Monomeren und Dimeren. Diese Methode ist nicht dazu geeignet, ein solches Gleichgewicht zu bestimmen.

Die mit der DLS-Methode gemessene Molekülmasse des hGBP1-Wildtyps ist nahezu identisch mit der Molekülmasse, die aus der Aminosäuresequenz berechnet wurde. Damit ist nachgewiesen, dass das Modell für gestreckte Moleküle für die Bestimmung der Molekülmasse geeignet ist.

Die mit dem Zwei-Hybrid-Interaktionsassay und der Größenausschlusschromatographie gezeigte Dimerisierung der helikalen Domänen $\alpha 7-13$ und $\alpha 12-13$ wird durch die DLS-Methode bestätigt. Für die helikale Domäne $\alpha 7-11$ bestätigt die DLS-Methode das Ergebnis des Zwei-Hybrid-Interaktionsassays und der Größenausschlusschromatographie, dass es sich um ein Monomer handelt.

Dieses Ergebnis bedeutet, dass die Dimerisierung der helikalen Domäne über die Helices $\alpha 12/13$ erfolgt.

3.8 Untersuchung der Oligomerisierung von hGBP1 durch chemisches „Cross linking“

Die Oligomerisierung des Wildtyp-Proteins von hGBP1 sowie einiger seiner Domänen kann mit verschiedenen Methoden wie dem Zwei-Hybrid-Interaktionsassay, der Größenausschlusschromatographie und der dynamischen Lichtstreuung nachgewiesen werden. Dabei muss berücksichtigt werden, dass beim Zwei-Hybrid-Interaktionsassay keine Aussage über die Art des gebildeten Komplexes möglich ist.

Bei den beiden anderen Methoden ist zu beachten, dass die Form der Moleküle ihre Lauf- bzw. Diffusionsgeschwindigkeit und damit die daraus abgeleiteten Molekülmassen beeinflusst.

Um herauszufinden, welche Komplexe (Dimere, Trimere, ...) hGBP1 und seine isolierten Domänen bildet, wurden die Oligomere durch chemische „Cross linker“ kovalent verknüpft. Diese kovalent verknüpften Komplexe sollten Rückschlüsse auf die Art ihrer strukturellen Verknüpfung ermöglichen. Außerdem könnte eventuell die GTP-Hydrolyse-Aktivität eines solchen dauerhaften Komplexes bestimmt werden.

Chemische „Cross Linker“ sind Substanzen, die intramolekulare Bindungen zwischen zwei Proteinen knüpfen. Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene „Cross linker“ verwendet. Zum einen wurde ein so genannter Zero-length „Cross Linker“ verwendet, der eine Isopeptid Bindung zwischen zwei Proteinen knüpft. Nach der Reaktion bleibt bei den Zero-length „Cross Linkern“ anders als bei anderen „Cross Linkern“ kein Linker zwischen den beiden Proteinen bestehen. Das hat den Vorteil, dass nur Verbindungen zwischen solchen Aminosäuren geknüpft werden, die direkten Kontakt in einem Proteinkomplex (z.B. Dimer) haben. Die Isopeptid Bindung erfolgt zwischen der freien Carboxylgruppe eines Aspartat oder Glutamats und der ϵ -Aminogruppe eines Lysins. Mit dieser Methode sollte die Gewinnung von kovalent verknüpften Protein-Protein-Komplexen ermöglicht werden.

Die Abbildung 26 zeigt das Reaktionsschema des verwendeten „Cross Linker“ EDC ((1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid):

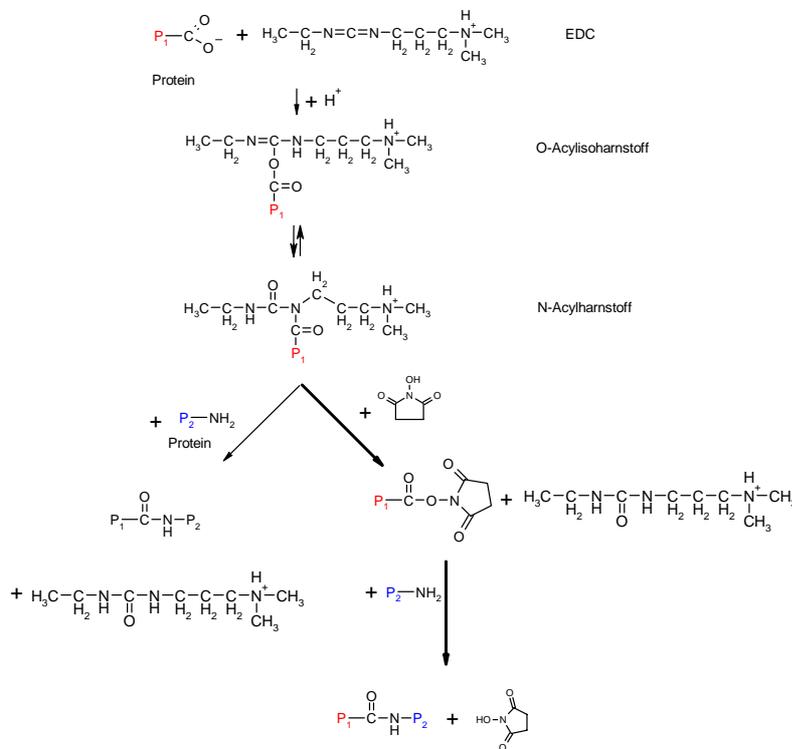


Abbildung 26: Reaktionsschema der Verknüpfung zweier Proteine mit dem Zero-length Cross-Linker EDC. Die freie Carboxylgruppe eines Glutamats oder Aspartats bildet mit EDC ein *O*-Acylisourea-Derivat. Der Aktivierung der Carboxylgruppe folgt eine nukleophile Substitution mit einer freien Aminogruppe, meistens dem ε-Amin eines Lysins. Da das *O*-Acylisourea-Derivat schnell hydrolysiert, wird die aktivierte Carboxylgruppe auf NHS übertragen, wobei hydrophile Ester entstehen. Eine nukleophile Substitution mit dem ε-Amin eines Lysins führt zu einer Amidbindung, die die beiden Seitenketten kovalent verknüpft.

Bei der Reaktion entsteht ein *O*-acylisourea-Derivat aus dem EDC und der freien Carboxylgruppe von Glutamat oder Aspartat, das sich weiter zum *N*-Acylisourea umlagert. Auf die „Aktivierung“ der Carboxylgruppe folgt die nukleophile Substitution mit einer Aminogruppe, meistens dem ε-Amin eines Lysins. Da die aktivierte Seitenkette schnell hydrolysiert und damit die ursprüngliche Carboxylgruppe regeneriert wird, muss die „aktive“ Seitengruppe stabilisiert werden. Dies erfolgt durch die Umsetzung mit *N*-Hydroxysulfosuccinimid (NHS), wobei hydrophile Ester entstehen, die nur sehr langsam hydrolysieren und mit denen die Ausbeute der Carbodiimid-vermittelten Kopplungsreaktion gesteigert werden kann²⁵⁵.

Für die Reaktion mit dem „Cross Linker“ EDC wurden 50 μM Protein in einem Puffer aus 100 mM MES-Puffer pH 6,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ mit 20 mM NHS und 10 mM EDC verwendet.

Die Abbildung 27 zeigt die Strukturformel (A) und das Reaktionsschema (B) von Dimethyl Suberimidate (DMS) dem zweiten verwendeten „Cross linker“. Die Dimethyl Suberimidate sind Diimidoester, die als homobifunktionelle „Cross Linker“ primäre Amine über einen 1,1 nm langen Linker kovalent verknüpfen²⁵⁹⁻²⁶¹.

Die Verknüpfung der Proteine erfolgt durch die nukleophile Substitution der Methoxygruppe des Imidoesters durch ein primäres Amin wobei ein Amidin entsteht.

A)

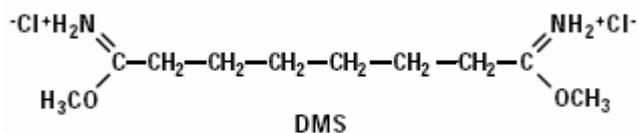
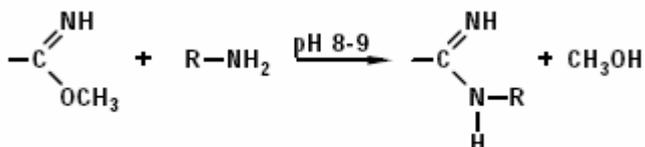


Abbildung 27: Darstellung der Strukturformel (A) sowie des Reaktionsschemas (B) von Dimethyl Suberimidate (DMS).

B)



Der Reaktionsansatz des zweiten „Cross Linkers“ DMS bestand aus 30 μM Protein in einem Puffer aus 0,2 M Triethanolamine pH 7,0, 5 mM MgCl_2 und 25 mM DMS.

Die Inkubation erfolgte bei 20 $^\circ\text{C}$, da die CD-Spektroskopie zeigt, dass die Entfaltung der isolierten helikalen Domänen α_{12} und α_{12-13} schon bei Temperaturen zwischen 25 und 35 $^\circ\text{C}$ beginnt.

Der Einfluss verschiedener Nukleotide auf die Selbst-Assemblierung des Wildtyp-Proteins und der G-Domäne wurde durch die Zugabe von GDP (200 μM) sowie des nicht hydrolysierbaren GTP-Analogs GppNHp (200 μM) getestet. Außerdem wurde der Einfluss von $\text{GDP}\cdot\text{AlF}_x$ (100 μM GDP, 150 AlCl_3 , 5 mM NaF) auf die Selbst-Assemblierung untersucht. Für verschiedene nukleotidbindende Proteine wurde die Bildung eines Komplexes aus Protein, GDP, Mg^{2+} und Aluminiumfluorid gezeigt. Mit der Röntgenstrukturanalyse konnten z.B. die Kristallkomplexe von $\text{G}_\alpha\text{-GDP}\cdot\text{AlF}_4^-$, $\text{Rho}\cdot\text{GDP}\cdot\text{AlF}_4^-$ ·RhoGAP und $\text{Ras}\cdot\text{GDP}\cdot\text{AlF}_3\cdot\text{GAP}$ ²⁶²⁻²⁶⁵ nachgewiesen werden. Wahrscheinlich handelt es sich bei dem $\text{GDP}\cdot\text{AlF}_x$ -Komplex um ein Analog des Übergangszustands der GTP-Hydrolyse. Für das ansonsten tetraedrische γ -Phosphat des GTP wird im Übergangszustand eine planare Konformation postuliert, die im $\text{GDP}\cdot\text{AlF}_x$ -Komplex das Aluminiumfluorid einnimmt. Dieser Komplex wird bei G_α -Proteinen durch die helikale Domäne intramolekular stabilisiert. Die Proteine der Ras-Superfamilie bilden den Komplex nur in Gegenwart von GAPs. Abhängig von der Konzentration und dem pH-Wert gibt es in Lösungen ein Gleichgewicht verschiedener Spezies von Aluminiumfluoriden, die sich durch die Anzahl der Fluoride, der Hydroxydionen und der Wassermoleküle in der Ligandsphäre unterscheiden ²⁶⁶. In dieser Arbeit wird der Komplex als AlF_x bezeichnet, da nicht bekannt ist, welche Spezies sich vorwiegend in den hGBP1-Komplex einlagert.

3.8.1 Die nukleotidabhängige Oligomerisierung des Wildtyps von hGBP1

In diesem Experiment sollte zuerst untersucht werden, ob es möglich ist, die nukleotidabhängig gebildeten Oligomere des Wildtyp-Proteins von hGBP1 kovalent zu verknüpfen.

Dazu wurden sowohl der chemische Zero-length „Cross-Linker“ EDC als auch der „Cross-Linker“ DMS verwendet.

Anders als die isolierte G-Domäne kann das Wildtyp-Protein von hGBP1 GDP nur binden, jedoch nicht hydrolysieren und in der Größenausschlusschromatographie konnten keine Proteinkomplexe nachgewiesen werden⁵⁰. Die Größenausschlusschromatographie belegt, dass hGBP1 im GppNHp-gebundenen Zustand Dimere und im GDP·AlF_x-gebundenem Zustand Tetramere bildet⁵⁰.

Die Abbildung 28 zeigt die Auftrennung der mit EDC dauerhaft verknüpften Proteinkomplexe auf einem SDS-Polyacrylamidgel.

Mit dem Reaktionsansatz A wurde getestet, ob es auch im nukleotidfreien Zustand zu einer kovalenten Verknüpfung des Proteins kommt. Das Gel zeigt, dass auch bei dieser Reaktion ein Teil des Proteins verknüpft wird. Der Vergleich mit den Reaktionsansätzen B-D zeigt, dass im nukleotidgebundenen Zustand deutlich mehr Protein verknüpft wird.

Mit Ansatz B) wurde untersucht, ob hGBP1 im GDP-gebundenen Zustand kovalent verknüpft wird. Im Vergleich zu Ansatz A) wird im GDP-gebundenen Zustand deutlich mehr Protein verknüpft. Dieses Ergebnis zeigt, dass das Wildtyp-Protein im GDP-gebundenen Zustand Homodimere bilden kann.

Der Reaktionsansatz C) zeigt, dass die Zugabe von 200 μM GppNHp zu einer deutlichen Bildung von Di- und Tri- sowie einer nicht identifizierbaren Mischung von Oligomeren führt. Die Wirkung des GDP·AlF_x-Komplexes auf die Bildung kovalent verknüpfter Oligomere wurde im Reaktionsansatz D) untersucht. Die Abbildung 28 zeigt, dass GDP·AlF_x wie GppNHp zur Bildung von Di- und Trimeren führt. Durch den Vergleich der Ansätze B) und D) wurde überprüft, ob es durch die Bindung des GDP·AlF_x-Komplexes mehr kovalent verknüpfte Oligomere gibt, als in dem GDP-gebundenen Zustand.

Die Ansätze A) bis D) zeigen anhand der Kontrolle c, dass EDC auch ohne NHS das Protein verknüpft, ähnlich wie im gleichen Zeitraum (5') bei der Reaktion mit NHS. Die Reaktion verläuft damit auch ohne die unterstützende Aktivierung von NHS.

Während der Reaktion kommt es zu einer auf den SDS-Polyacrylamidgelen sichtbaren Verbreiterung der Proteinbanden. Ein Vergleich der Proben, die nach 15 Sekunden bzw. 60 Minuten genommen wurden, zeigt dies besonders deutlich anhand der Bande des monomeren Proteins. Dies ist darauf zurückzuführen, dass es bei einer längeren Reaktionszeit mehr durch EDC aktivierte Seitengruppen gibt, die beim abstoppen der Reaktion mit Glycin verknüpft werden.

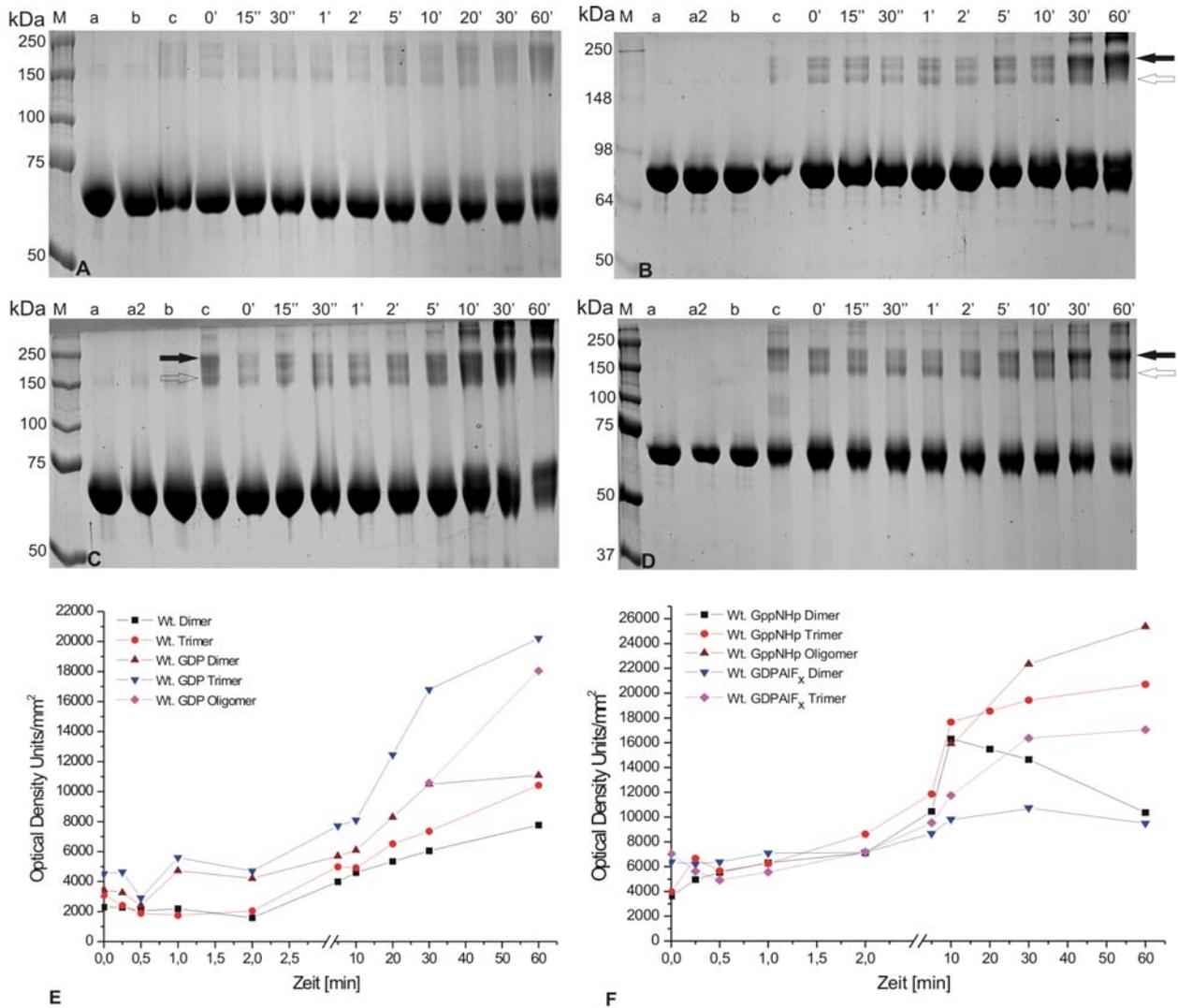


Abbildung 28: Nukleotid abhängig gebildete, kovalent verknüpfte Oligomere von hGBP1 Wt. Die Reaktion wird mit 50 μM Protein bei 25 °C in 10 mM MES-Puffer (pH 6,5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM NHS und 10 mM EDC durchgeführt. Nach den angegebenen Zeiten wurden den Reaktionen Proben entnommen, die mit 50 mM Glycin abgestoppt wurden. Die Abbildung zeigt: A) Reaktion ohne Nukleotid, B) Reaktion mit 200 μM GDP, C) Reaktion mit 200 μM GppNHp und D) Reaktion mit GDP·AlFx (200 μM GDP, 150 μM AlCl₃, 5 mM NaF). E-F Densitometrische Bestimmung der Signalintensität mit dem AIDA Image Analyzer der Proteinbanden der Reaktionen A,B und C,D. Nach der fünften Minute kommt es bei den Reaktionen mit Nukleotiden zu einem deutlichen Konzentrationsanstieg an verknüpftem Protein.

(Beschriftung: M: Precision Plus Protein™ Standards (BIORAD), M₂: SeeBlue® Pre-Stained Protein Standard a: Kontrolle ohne Nukleotid, a₂ Kontrolle mit Nukleotid, b Kontrolle mit Nukleotid und NHS, c: Kontrolle mit Nukleotid und EDC, Probenentnahme zwischen 0 und 60 Minuten, Probenentnahme der Kontrollen a-c nach 5 Minuten. ⇐Dimer, ◀Trimer).

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden mit einem Gelscanner digitalisiert und anschließend wurde die Signalintensität der Proteinbanden mit dem AIDA Image Analyzer Programm densitometrisch bestimmt. Damit ist es möglich, ein Maß des Verhältnisses der gebildeten di-, tri- und oligomeren Proteinkomplexe zueinander, sowie den Zeitverlauf ihrer Bildung zu bekommen. Eine Bestimmung der Signalintensität des monomeren Proteins war nicht möglich, da sie über der Detektionsgrenze des Programms lag. Die gemessenen Signalintensitäten zeigt die Abbildung 28 E) und F):

In den ersten Minuten werden ungefähr gleich viele di- und trimere Proteinkomplexe gebildet. Zwischen der fünften und der zehnten Minute ändert sich bei den Reaktionsansätzen mit Nukleotid das Verhältnis zwischen den Proteinkomplexen. Die Konzentration des dimerisierten Proteins geht bei den Ansätzen mit GppNHp und GDP·AlF_x zurück, während sie bei dem Ansatz mit GDP ungefähr gleich bleibt. Gleichzeitig steigt der Anteil an tri- und oligomeren Proteinkomplexen bei den Reaktionen mit GppNHp und GDP·AlF_x deutlich an. Die trimere Form des Proteins wird bei allen Reaktionen bevorzugt gebildet. Im Verlauf der Reaktion steigt vor allem in dem Ansatz mit GppNHp der Anteil an Oligomeren. Während der Anteil an oligomeren Protein-Komplexen steigt, geht der Anteil an dimerisierten Protein-Komplexen zurück. Dies bedeutet, dass die Dimere zu Oligomeren verknüpft werden. Im Gegensatz dazu geht die Konzentration der Trimere nicht zurück, sondern steigt weiterhin an.

Der Vergleich der Reaktionsansätze mit GDP bzw. GDP·AlF_x zeigt, dass durch den GDP·AlF_x-Komplex die Bildung von tri- und oligomeren Proteinkomplexen beschleunigt wird.

Für die Reaktionsansätze ohne Nukleotid und mit GDP waren ähnliche Ergebnisse erwartet worden, da für beide mit der analytischen Größenausschlusschromatographie keine Dimerisierung nachgewiesen werden kann⁵⁰. Bei der Behandlung mit EDC wird hier jedoch eine kovalente Verknüpfung des GDP-gebundenen Proteins beobachtet. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass mit der Größenausschlusschromatographie erfahrungsgemäß nur relativ feste Komplexe nachgewiesen werden können ($K_D \leq 10 \mu\text{M}$).

Durch die kovalente Verknüpfung des Wildtyp-Proteins von hGBP1 mit EDC kann gezeigt werden, dass das Protein, wenn es GDP, GppNHp oder GDP·AlF_x gebunden hat, Dimere und Trimere bildet.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob mit Hilfe des homobifunktionellen „Cross Linkers“ DMS eine größere Ausbeute an kovalent Verknüpften Protein möglich ist. Die Proteine werden dabei über einen 11 Å langen Linker miteinander verknüpft.

Dabei wurden zusätzlich zum Wildtyp-Protein auch die Mutanten R48A und K51A untersucht. Damit sollte festgestellt werden, ob, und wenn ja, welchen Einfluss die Mutationen auf die Nukleotidabhängigkeit der Selbst-Assemblierung haben.

Die Abbildung 29 zeigt das Ergebnis der kovalenten Verknüpfung der nukleotidabhängig gebildeten Oligomere des Wildtyp-Proteins und der Mutanten R48A und K51A. Der Vergleich der Abbildung 28 mit der Abbildung 29 zeigt, dass in den Reaktionsansätzen ohne Nukleotid beide „Cross Linker“ ungefähr gleich viele Oligomere verknüpfen. In den Reaktionen mit GppNHp werden die Oligomere durch EDC und in den Ansätzen mit GDP·AlF_x durch DMS effektiver verknüpft. Wie auf der Abbildung zu sehen ist, werden bei der Reaktion Di- und Trimere kovalent verknüpft. Dabei werden deutlich mehr Trimere als

Dimere gebildet. Ein Teil des Proteins interagiert zu nicht charakterisierbaren höheren Oligomeren. Die Reaktion war nach 30 Minuten abgeschlossen, da der „Cross Linker“ sehr schnell hydrolysiert.

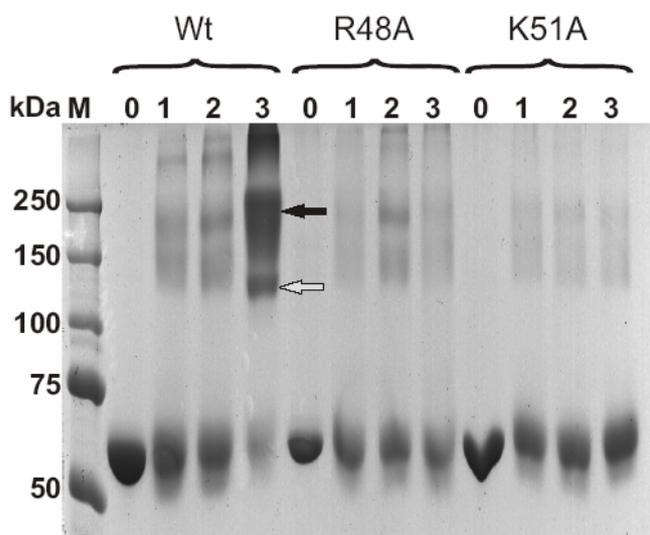


Abbildung 29: Die Nukleotid abhängig gebildeten und mit DMS kovalent verknüpften Oligomere des Wildtyp-Proteins und der Mutanten R48A und K51A von hGBP1. Die Probenentnahme erfolgte nach 30 Minuten. (Beschriftung: M: Precision Plus Protein™ Standards (BIORAD), 0) ohne DMS, 1) Kontrolle mit DMS ohne Nukleotid, 2) Reaktion mit GppNHp, 3) Reaktion mit GDP·AlF_x. ⇐Dimer, ◀Trimer)

Die Mutanten R48A und K51A wurden analysiert, um den Einfluss der Nukleotidbindung besser charakterisieren zu können. Die Mutante R48A bindet GppNHp fester und die Mutante K51A deutlich schwächer als das Wildtyp-Protein. Mit der Größenausschlusschromatographie kann eine Dimerisierung der Mutante R48A im GppNHp-, jedoch nicht im GDP·AlF_x-gebundenen Zustand nachgewiesen werden. Für die Mutante K51A ist eine Dimerisierung nicht nachweisbar⁵⁷.

Wie die Abbildung 29 zeigt, interagiert die Mutante R48A nur in einem GppNHp-gebundenem Zustand zu Oligomeren. Für die Mutante K51A ist eine nukleotidabhängige Bildung von Oligomeren nicht nachweisbar.

Als nächstes sollte mit Hilfe der kovalenten Verknüpfung der isolierten Domänen untersucht werden, welche Proteinkomplexe die G-Domäne im nukleotidgebundenen Zustand bildet.

3.8.2 Untersuchung der nukleotidabhängigen Oligomerisierung der isolierten G-Domäne

Aus der Kristallstruktur von hGBP1 ist bekannt, dass eine Dimerisierung des Proteins über die G-Domäne des Proteins erfolgen könnte.

Die Oligomerisierung des Wildtyp-Proteins von hGBP1 und seiner isolierten G-Domäne wird durch ihre Nukleotidbindung beeinflusst. Die isolierte Domäne unterscheidet sich dabei in der Art der gebildeten Proteinkomplexe vom Wildtyp-Protein.

Von der isolierten G-Domäne ist bekannt, dass sie im Unterschied zum Wildtyp-Protein GDP nicht nur bindet, sondern auch hydrolysiert. Wie das Wildtyp-Protein ist sie in der Größenausschlusschromatographie im GppNHp-gebundenen Zustand ein Dimer und im GDP-gebundenen Zustand ein Monomer. Sie bildet jedoch mit dem GDP·AlF_x-Komplex ein Dimer und kein Tetramer.

Bei diesem Experiment wird untersucht, ob sich die Art der von der isolierten G-Domäne bzw. die von der isolierten G-DomäneR48A gebildeten Proteinkomplexe von denen des Wildtyp-Proteins unterscheiden. Außerdem soll untersucht werden, ob wie beim Wildtyp-Protein andere Oligomere nachgewiesen werden können als mit der Größenausschlusschromatographie.

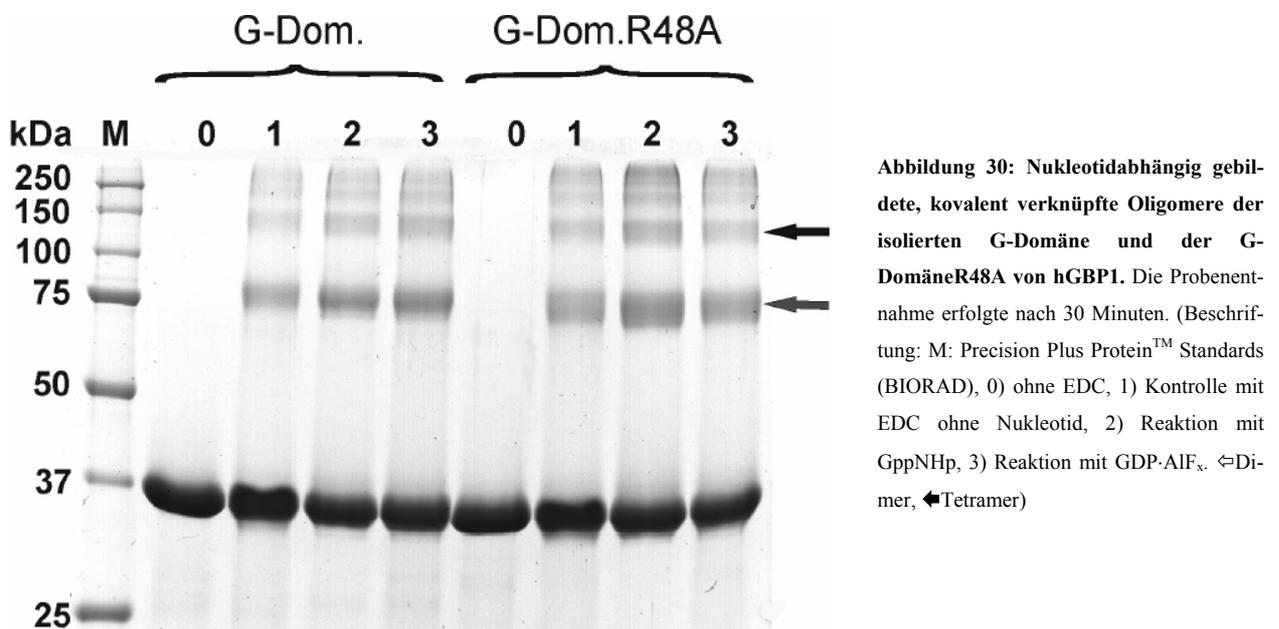


Abbildung 30: Nukleotidabhängig gebildete, kovalent verknüpfte Oligomere der isolierten G-Domäne und der G-DomäneR48A von hGBP1. Die Probenentnahme erfolgte nach 30 Minuten. (Beschriftung: M: Precision Plus Protein™ Standards (BIORAD), 0) ohne EDC, 1) Kontrolle mit EDC ohne Nukleotid, 2) Reaktion mit GppNHp, 3) Reaktion mit GDP·AlF_x. ⇌Dimer, ◀Tetramer)

Die Abbildung 30 zeigt die nukleotidabhängig gebildeten und durch EDC kovalent verknüpften Oligomere der isolierten G-Domäne sowie der G-DomäneR48A.

Wie auf dem SDS-Polyacrylamidgel zu sehen ist, interagieren die beiden isolierten G-Domänen vor allem in Form von Dimeren. Ein Teil des Proteins wird auch zu Trimeren und höhere Oligomeren verknüpft. Im Unterschied zu dem Wildtyp-Protein überwiegt bei den isolierten G-Domänen jedoch der Anteil der kovalent verknüpften Dimere und nicht der Trimere. Ein weiterer Unterschied zum Wildtyp-Protein ist, dass der Anteil an verknüpftem Protein im GppNHp- und im GDP·AlF_x-gebundenen Zustand gleich ist.

Bei der isolierten G-DomäneR48A ist der Anteil an Oligomeren im GppNHp-gebundenen Zustand etwas größer als im GDP·AlF_x-gebundenem Zustand. Zusätzlich bildet sie im GDP·AlF_x-gebundenen Zustand deutlich mehr Oligomere als die nicht um die helikale Domäne verkürzte Mutante R48A.

3.8.3 Die Oligomerisierung der isolierten helikalen Domänen

Die Analyse der kovalent verknüpften Proteinkomplexe der isolierten G-Domäne zeigt, dass diese vor allem Dimere und weniger Trimere oder höhere Oligomere bildet. An der Bildung der für das Wildtyp-Protein nachgewiesenen Tetramere könnte also ein anderer Bereich des Proteins beteiligt sein.

Mit diesem Experiment wird untersucht, welche Proteinkomplexe durch die isolierten helikalen Domänen gebildet werden. Da die Ergebnisse der Methoden (3.7.1 und 3.7.2), mit denen für einige der helikalen Domänen die Bildung von Proteinkomplexen nachgewiesen wurde, zum Teil nicht eindeutig sind, sollen sie mit diesem Experiment überprüft werden.

Die Analyse der Oligomerisierung der isolierten helikalen Domänen mit dem „Cross-Linker“ DMS zeigt die Abbildung 31.

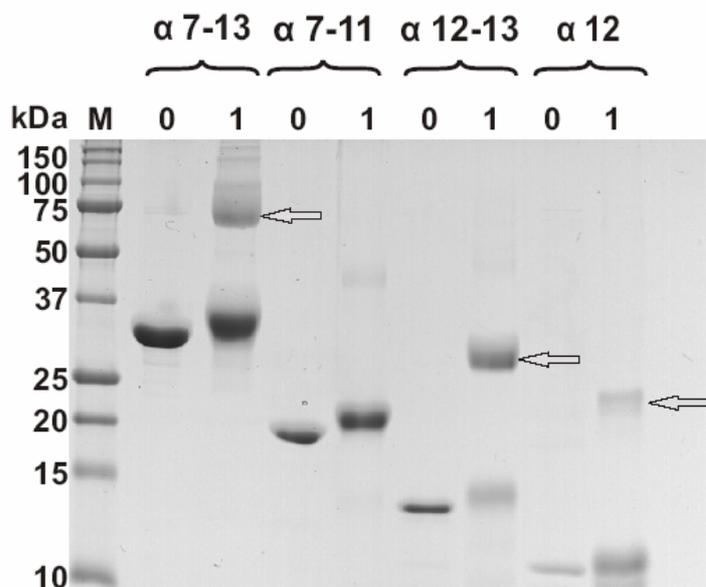


Abbildung 31: Nukleotid abhängig gebildete, kovalent verknüpfte Oligomere der isolierten helikalen Domänen. Die Probenentnahme erfolgte nach 30 Minuten. (Beschriftung: M: Precision Plus Protein™ Standards (BIORAD), 0) ohne DMS, 1) mit DMS, ⇐Dimer).

Das SDS-Polyacrylamidgel zeigt, dass für die isolierte helikale Domäne $\alpha 7-13$ vor allem Di- aber auch geringe Mengen von Trimeren nachweisbar sind. Im Unterschied dazu zeigt die Analyse der isolierten helikalen Domäne $\alpha 7-11$, dass das Protein nicht dimerisiert. Das Gel zeigt, dass ein Großteil der isolierten helikalen Domäne $\alpha 12-13$ kovalent verknüpft wird. Während der Reaktion werden ausschließlich Dimere gebildet. Außerdem zeigt die Abbildung, dass nur ein kleiner Teil der isolierten helikalen Domäne $\alpha 12$ dimerisiert.

Die Spezifität der Verknüpfung kann dadurch belegt werden, dass die isolierte helikale Domäne $\alpha 12-13$ ausschließlich Dimere bildet. Für die kovalente Verknüpfung benötigt DMS zwei freie Aminogruppen und EDC eine freie Carboxylgruppe und eine freie Aminogruppe. Die helikale Domäne $\alpha 12-13$ besteht

zu 20 % aus Glutamat- bzw. Aspartatgruppen sowie aus 13 % Lysinen. Bei so vielen freien Carboxyl- und Aminogruppen müsste ein Gemisch aus multimeren, kovalent verknüpften Proteinkomplexen entstehen, wenn schon eine schwache oder unspezifische Interaktion eine Verknüpfung erlauben würde.

Wenn für die Verknüpfungsreaktion der „Cross Linker“ DMS durch EDC ersetzt wird, führt dies bei der helikalen Domäne α 7-13 zu einer größeren Ausbeute an kovalent verknüpften Trimeren. Die Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse der Verknüpfung der isolierten helikalen Domänen.

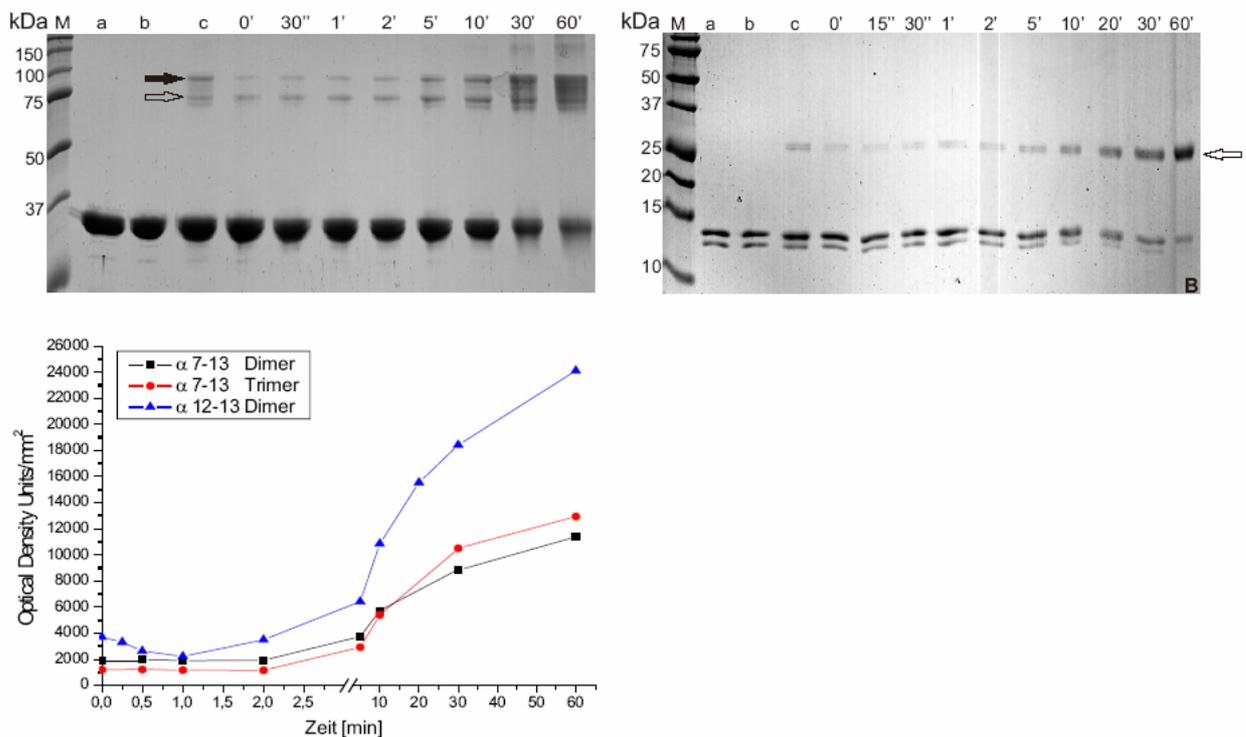


Abbildung 32: Kovalent verknüpfte Oligomere der isolierten helikalen Domänen von hGBP1. Die Reaktion wurden wie in 3.8.1 durchgeführt. Die Abbildung zeigt in: A) α 7-13 und B) α 12-13. In C) die densitometrische Bestimmung der Signalintensität der Proteinbanden der Reaktionen A und B mit dem AIDA Image Analyzer. Nach der fünften Minute gibt es einen deutlichen Konzentrationsanstieg an verknüpftem Protein. (Beschriftung: M: Precision Plus Protein™ Standards (BIORAD), a: Kontrolle ohne EDC und NHS, b Kontrolle nur mit NHS, c: Kontrolle nur mit EDC, Probenentnahme zwischen 0 und 60 Minuten, Probenentnahme der Kontrollen a-c nach 5 Minuten. \blacktriangleleft Dimer, \blacktriangleleft Trimer).

Das SDS-Polyacrylamidgel (A) zeigt die von der isolierten helikalen Domäne α 7-13 gebildeten Proteinkomplexe. Es sind sowohl Di- als auch Trimere nachweisbar.

Die kovalente Verknüpfung der isolierten helikalen Domäne α 12-13 ist auf dem Gel (B) zu sehen. Während der Reaktion werden ausschließlich Dimere gebildet. Auf dem Gel ist für das Monomer der isolierten helikalen Domäne α 12-13 eine Doppelbande zu sehen. Die zweite Bande besteht, wie in den Kapiteln 3.3.4 und 3.6 gezeigt wird, aus einem Fragment der helikalen Domäne, die am C-Terminus um sechs Aminosäuren verkürzt ist. Bei der Reaktion werden sowohl von der helikalen Domäne als auch von ihrem

verkürzten Fragment Dimere gebildet. Da dem verkürzten Fragment das CaaX-Motiv fehlt (3.6), belegt dieses Ergebnis, dass an der Interaktion das CaaX-Motiv nicht beteiligt ist.

Die Abbildung 32 E) zeigt die densitometrische Auswertung der Signalintensität der Proteinbanden mit dem AIDA Image Analyzer Programm:

Die helikale Domäne α 7-13 bildet Di- und Trimere, wobei zuerst mehr Dimere gebildet werden. Nach der zehnten Minute verschiebt sich das Verhältnis zugunsten der Trimere. Die isolierte helikale Domäne α 12-13 zeigt nach der fünften Minute eine deutliche Dimerisierung.

Im Unterschied zu der isolierten helikalen Domäne α 12-13 bildet α 7-13 nicht nur Dimere, sondern auch Trimere. Das Ergebnis zeigt, dass es zwei unterschiedliche Bereiche der Proteinoberfläche gibt, mit der die isolierte helikale Domäne mit anderen Molekülen in Wechselwirkung treten kann. Die für die Trimerisierung der helikalen Domäne benötigte Interaktionsfläche könnte auf den Helices α 7-11 lokalisiert sein. Es ist auch möglich, dass die Helices α 7-11 für die Stabilisierung des Trimeres benötigt werden. Es besteht die Möglichkeit, dass auch das Wildtyp-Protein über die helikale Domäne mit zwei Molekülen interagieren kann.

Im Unterschied zu der helikalen Domäne α 12-13 bildet α 12 deutlich weniger Dimere. Dazu muss beachtet werden, dass die isolierte helikale Domäne α 12 - wie es in den Kapiteln [3.5] gezeigt wird - alleine vielleicht zu instabil ist, um Dimere zu bilden.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es möglich ist, die Protein-Proteinkomplexe von hGBP1 kovalent zu verknüpfen, wurde die GTP-Hydrolyse-Aktivität dieser Komplexe bestimmt.

3.8.4 Die GTP-Hydrolyse-Aktivität des kovalent verknüpften Wildtyp-Proteins von hGBP1

Es ist bekannt, dass die GTP-Hydrolyse-Aktivität des Wildtyp-Proteins von hGBP1 kooperativ ist⁵⁰. Die Kooperativität wird durch die Abhängigkeit der Geschwindigkeit der GTP-Hydrolyse von der Enzymkonzentration belegt⁵⁰.

Wenn die kovalent verknüpften Protein-Protein-Komplexe (Di-, Tri- und Oligomere) im nativen Zustand vorliegen, sollte die Hydrolysegeschwindigkeit bei dem behandelten Protein größer sein als bei dem unbehandelten Protein.

Durch die Analyse der GTP-Hydrolyse-Aktivität sollte untersucht werden, ob die verknüpften Protein-Protein-Komplexe eine gesteigerte GTP-Hydrolyse-Aktivität zeigen. Dadurch würde belegt, dass sich die Proteine in einem nativen Zustand befinden.

Die Messung der GTPase-Aktivität erfolgte bei 37 °C anhand der Hydrolyse von 1 mM GTP durch 1 μ M Protein in Puffer C. Den Ansätzen wurden 50 μ M Rinderserumalbumin zur Stabilisierung des Proteins

zugesetzt, um eine bessere Reproduzierbarkeit zu erreichen. Die bei der kovalenten Verknüpfung der Proteine verwendeten Nukleotide wurden vor dem Experiment mit Hilfe einer PD-10 Entsalzungssäule (Amersham Biosciences) entfernt.

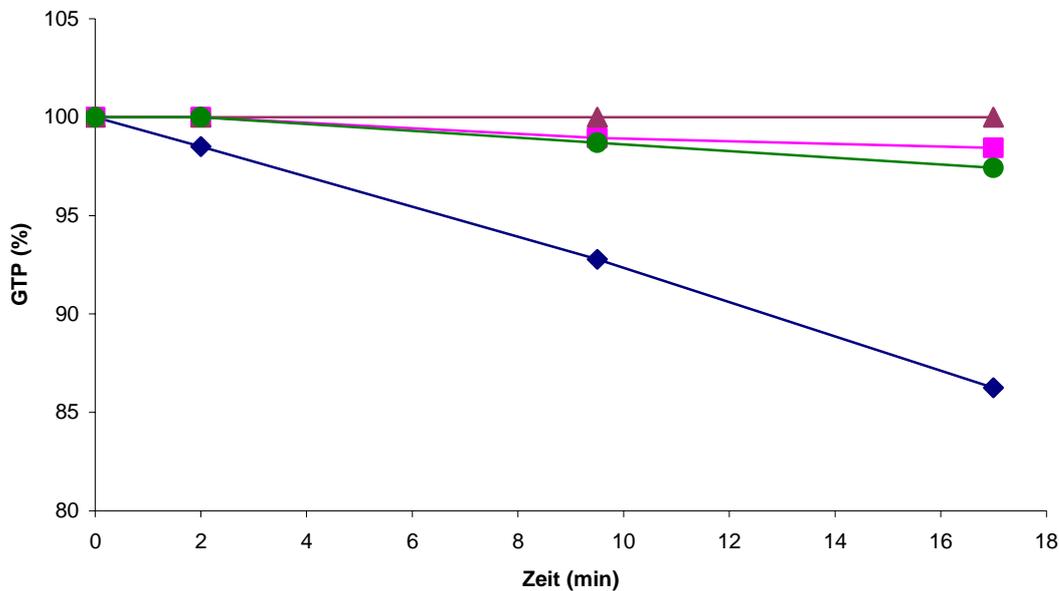


Abbildung 33: Einfluss der Modifikation mit EDC und NHS auf die GTP-Hydrolyse-Aktivität des Wildtyp-Proteins. Zeitlicher Verlauf der Hydrolyse von 1 mM GTP durch 1 μ M hGBP1 bei 37 °C in 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 5 mM MgCl₂, 2 mM DTE, 50 μ M Rinderserumalbumin. Gemessen wurde die Aktivität von unbehandeltem Protein (◆), EDC/NHS modifiziertes Protein ohne Nukleotid (●), EDC/NHS modifiziertes Protein mit GppNHp (■) bzw. GDP·AlF_x (▲). Das Protein, das im GDP·AlF_x-gebundenem Zustand verknüpft wird, hat keine Aktivität mehr. Die Proteine, die im GppNHp-gebundenen oder im Nukleotid freien Zustand verknüpft werden, besitzen eine minimale Restaktivität.

Der Vergleich der GTP-Hydrolyse-Aktivität des modifizierten mit dem nicht modifizierten Protein zeigt, dass die Behandlung mit EDC/NHS zu einer nahezu vollständigen Inaktivierung führt (Abbildung 33). Das Protein, das in dem GDP·AlF_x-gebundenen Zustand modifiziert wird, ist nach der Reaktion inaktiv. Die GTP-Hydrolyse-Aktivität der im nukleotidfreien bzw. im GppNHp-gebundenen Zustand modifizierten Proteine ist nach siebzehn Minuten um 81 bzw. 88 Prozent reduziert.

Die reduzierte GTPase-Aktivität ist ein Hinweis darauf, dass bei der Behandlung der Proteine eine Aminosäure modifiziert wird, die für die Nukleotidbindung oder die Hydrolyse des Phosphats benötigt wird. Eine weitere Möglichkeit ist, dass Aminosäuren modifiziert werden, die an der Interaktion der Proteine beteiligt sind. Diese Modifizierung könnte die Selbst-Assemblierung des Proteins während des GTP-Hydrolyse-Assays verhindern. Die zweite Möglichkeit erklärt jedoch nur eine Verminderung und nicht die fast völlige Inaktivierung der GTP-Hydrolyse-Aktivität.

3.9 Kalorimetrische Charakterisierung der Proteindomänen von hGBP1

3.9.1 Aufnahme und Analyse von DSC Daten

Die *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) kann unter anderem zur Untersuchung von DNA-Wechselwirkungen²⁶⁷, der Proteinfaltung²⁶⁸ und der Proteinkomplexbildung²⁶⁹ verwendet werden.

Die thermische Stabilität von hGBP1 wurde mit Hilfe der DSC untersucht^{270,271}. Dazu wird die Temperaturabhängigkeit der Wärmekapazität einer Proteinlösung gegen eine Referenz gemessen, wobei auch der Schmelzpunkt und die Schmelzenthalpie des Proteins bestimmt werden.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm „Microcal Origin 4.1 für DSC“ (Version 4.1, MicroCal Software Incorp., Northhampton, Massachusetts, USA). Dabei wurde ein „Mehr-Stufen-Übergangs-Modell“ (*non-two-state transition* Modell), verwendet (siehe Anhang 7.2.1).

Die DSC-Experimente wurden durchgeführt, um die thermodynamischen Parameter der Proteine wie die Schmelztemperatur T_m (50 % des Proteins ist denaturiert), die kalorimetrische Enthalpie (ΔH_{cal}) und die van't Hoffsche Enthalpie (ΔH_{vH}) zu bestimmen. Zuerst wurde untersucht, ob die Entfaltung der Proteine reversibel ist, da hohe Temperaturen zu einer Aggregation der entfalteten Proteine führen können. Die Aggregation und Präzipitation der entfalteten Proteine ist ein kinetisch kontrollierter, exothermer Prozess²⁷². Die freigesetzte Wärme führt zu einem „intrinsischen“ Schmelzprozess der Proteine. Die kalorimetrische Enthalpie ΔH_{cal} , die aus der vom Kalorimeter zugeführten Wärmemenge berechnet wird, kann dadurch verfälscht werden. Die Auswertung von irreversiblen Prozessen ist mit den Formel 8 und Formel 9 problematisch, da diese Gleichungen Gleichgewichtsprozesse beschreiben.

Für die Experimente wurden 50 μM Protein in einem Puffer aus 10 mM Phosphat (pH 7,5), 20 mM Glycin und 2 mM Mercaptoethanol verwendet. Um die Temperatur zu bestimmen, bei der das Protein vollständig entfaltet ist, erfolgte die erste Messung über einen Temperaturbereich von 15 °C bis 120 °C bei einer Heizrate von 1 K/min. Die Analyse der Reversibilität und die Bestimmung der thermodynamischen Parameter erfolgten in einem Temperaturbereich, der maximal fünf Kelvin über der Temperatur lag, bei der das Protein komplett entfaltet ist. Deutlich höhere Temperaturen führen zu einer Aggregation der entfalteten Proteine. Um die Reversibilität zu testen, wurde die Probe fünfmal erhitzt und wieder auf die Ausgangstemperatur gekühlt.

Die Abbildung 34 zeigt die Schmelzkurven eines fünffachen Aufschmelzens derselben Probe des Wildtyp-Proteins von hGBP1 (A), sowie von der isolierten helikalen Domäne $\alpha 12-13$ (B). Die Überlagerung der Rohdaten zeigt, dass die Entfaltung des Wildtyp-Proteins irreversibel ist, während die isolierte helika-

le Domäne α 12-13 zu fast 100 Prozent reversibel entfaltet wird. Eine vollständig reversible Entfaltung ist auch ohne Aggregation sehr selten.

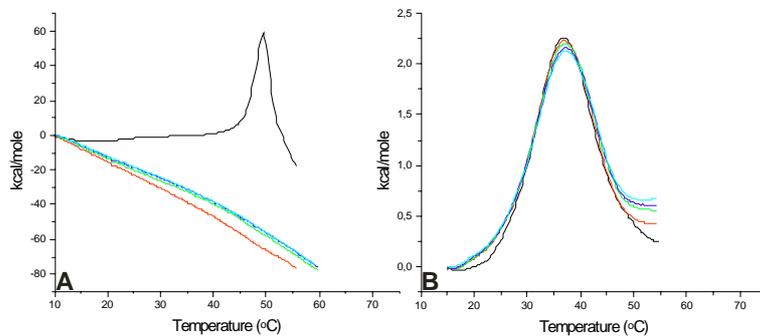


Abbildung 34: Analyse der reversiblen Entfaltung von hGBP1. A) Wildtyp. B) isolierte helikale-Domäne α 12-13. Fünf Schmelzkurven derselben Probe (50 μ M in 10 mM Phosphat (pH 7,5), 20 mM Glycin, 2 mM Mercaptoethanol) wurden hintereinander bei einer Heizrate von 1 K/min gemessen.

(— 1. Messung, — 2. Messung, — 3. Messung, — 4. Messung, — 5. Messung)

Die Abbildung 35 zeigt die Entfaltung der isolierten helikalen Domänen α 7-13 und α 7-11.

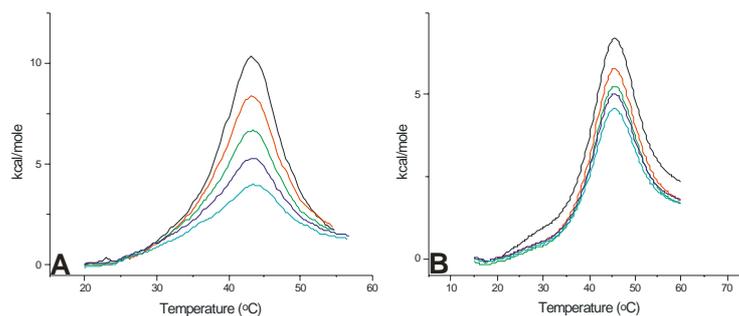


Abbildung 35: DSC-Schmelzkurven der isolierten helikalen Domänen α 7-13 und α 7-11. Überlagerung von fünf Schmelzkurven jeweils derselben Probe. A) α 7-13 B) α 7-11 Bei beiden helikalen Domänen liegt die Reversibilität bei ungefähr 80 Prozent.

(— 1. Messung, — 2. Messung, — 3. Messung, — 4. Messung, — 5. Messung)

Der Schmelzvorgang der isolierten helikalen Domänen α 7-13 (A) und α 7-11 (B) kann als näherungsweise reversibel angesehen und ihre thermodynamischen Parameter bestimmt werden. Im Gegensatz zu der isolierten helikalen Domänen α 12-13 ist ihre Entfaltung jeweils nur zu 80 Prozent reversibel. Ebenso wie beim Wildtyp-Protein ist die Entfaltung der isolierten G-Domäne irreversibel.

Für die helikale Domäne α 12 wurden keine Pufferbedingungen und kein Temperaturbereich gefunden, bei der eine Schmelzkurve gemessen werden konnte.

Die Analyse ergab, dass das Wildtyp-Protein und die isolierte G-Domäne irreversibel entfaltet werden, während die isolierten helikalen Domänen α 7-13, α 7-11 und α 12-13 weitgehend reversibel entfaltet werden.

3.9.2 Analyse von Komplexen mit Hilfe der DSC

Die Selbst-Assemblierung von Proteinen kann mit Hilfe der Differential Scanning Kalorimetrie untersucht werden. Bei einem monomeren Protein erfolgt der Übergang vom gefalteten (nativen) Protein (N) zum entfalteten (unfolded) Protein (U) unabhängig von der Konzentration.

Formel 4



Bei einer Protein-Protein-Interaktion (z.B. Dimer, Trimer, etc.) ist die Schmelztemperatur abhängig von dem Dissoziationsgleichgewicht der Proteine und damit von der Proteinkonzentration. Die Stöchiometrie der Dissoziation und der Entfaltung wird durch folgende Formel beschrieben:

Formel 5



Dabei entspricht „n“ der Anzahl der an der Selbst-Assemblierung beteiligten Proteine. Die Anzahl der Proteinmoleküle (n), die während eines thermisch induzierten strukturellen Übergangs miteinander kooperieren, kann über das Verhältnis von $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$ (Formel 6) bestimmt werden.

Formel 6

$$\frac{\Delta H_{vH}}{\Delta H_{cal}} = n$$

Um die thermodynamischen Parameter zu bestimmen, wurde mit dem Differential Scanning Kalorimeter von jedem Protein eine Schmelzkurve gemessen. Diese Messungen erfolgten unter den gleichen Bedingungen wie bei der Analyse der Reversibilität der Entfaltung. Die Abbildung 36 zeigt die Rohdaten (A) und die auf die Proteinkonzentration normalisierte Schmelzkurve nach der Subtraktion der Basislinie (B) der helikalen Domäne hGBP1 α 7-13.

Die Übergangstemperatur, auch Schmelztemperatur (T_m) genannt, die kalorimetrische Enthalpie ΔH_{cal} sowie die van't Hoffsche Enthalpie ΔH_{vH} wurden mit dem „Mehr-Stufen-Übergangs-Modell“ (Formel 8 und Formel 9, Anhang 7.2.1) der Auswertungssoftware: „Origin Microcal for DSC“ ermittelt. Die kalorimetrische Enthalpie wird aus der Fläche unter der Messkurve und die van't Hoffsche Enthalpie aus dem Kurvenverlauf bestimmt. Die kalorimetrische Enthalpieänderung bezieht sich auf die Wärmeänderung pro mol, während sich die van't Hoffsche Enthalpie auf die Wärmeänderung pro entfalteter (kooperativer) Einheit bezieht.

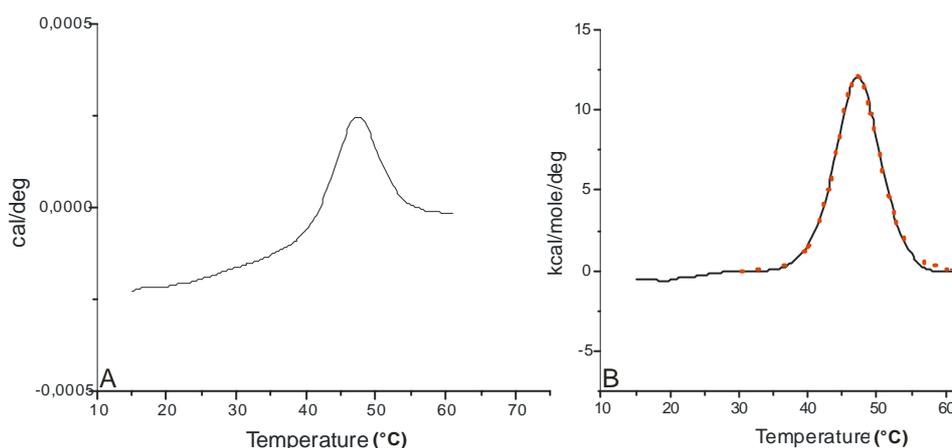


Abbildung 36: DSC-Schmelzkurve von 50 µM hGBP1 α7-13. Die Messung erfolgte in 10 mM Phosphat (pH 7,5), 20 mM Glycin und 2 mM Mercaptoethanol mit 1 K/min. Die Abbildung A) zeigt die Originalschmelzkurve als Wärmeaufnahme des Proteins pro Grad Temperaturänderung. In B) wurde die Schmelzkurve um den Beitrag des Puffers und die Basislinie korrigiert. Nach der Normalisierung auf die Proteinkonzentration von 50 µM konnten die erhaltenen Schmelzkurven mit dem „Mehr-Stufen-Übergangs-Modell“ (siehe Anhang 7.3.1) ausgewertet werden. (—) Messkurve, (···) mit dem „Mehr-Stufen-Übergangs-Modell“ angepasste Schmelzkurve.

Die gemessenen thermodynamischen Parameter sind in der Tabelle 14 dargestellt:

	Reversibilität [%]	T_m [°C]	ΔH_{cal} [kJ/mol] (monomer)	ΔH_{vH} [kJ/mol]	$\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$ = n
Wildtyp	0	48,4	1029	811	0,8
G-Dom.	0	≈ 35,0	--	--	--
α7-13	80	47,2	423	405	1,0
α7-11	80	45,7	268	274	1,0
α12-13	98	34,6	111	253	2,3

Tabelle 14: Zusammenstellung der Schmelzpunkte und der kalorimetrischen sowie der van't Hoff'schen Enthalpie von hGBP1 Wildtyp sowie verschiedener Domänenkonstrukten. Die Konzentration beträgt bei allen Proteinen jeweils 50 µM.

Das Wildtyp-Protein ist, wie das Verhältnis von $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$ zeigt, ein Monomer. Bei der isolierten G-Domäne erfolgt die Denaturierung des Proteins nach Überschreiten des Schmelzpunktes so schnell, dass eine Bestimmung von ΔH_{cal} und ΔH_{vH} nicht möglich war. Der Schmelzpunkt liegt jedoch deutlich tiefer als der vom Wildtyp-Protein.

Der Übergangstemperatur der helikalen Domäne α7-13 war 1 K niedriger als beim Wildtyp-Protein, die Schmelzenthalpie war jedoch deutlich reduziert. Die Domäne α7-11 hat einen Schmelzpunkt der 3 K niedriger ist als beim Wildtyp-Protein. Die Schmelzenthalpie des Proteins ist 73 Prozent niedriger als

beim Wildtyp-Protein und 37 Prozent niedriger als bei α 7-13. Die Analyse von $\Delta H_{\text{vH}}/\Delta H_{\text{cal}}$ zeigt für beide Domänen, dass sie unter diesen Pufferbedingungen als Monomer vorliegen.

Die Schmelztemperatur der isolierten helikalen Domäne α 12-13 ist um 14 K niedriger als beim Wildtyp-Protein und 13 K niedriger als bei α 7-13. Das Verhältnis von $\Delta H_{\text{vH}}/\Delta H_{\text{cal}}$ entspricht mit 2,3 dem eines Dimers.

Die Stöchiometrie der isolierten helikalen Domäne α 12-13, die aus dem Verhältnis von $\Delta H_{\text{vH}}/\Delta H_{\text{cal}}$ abgeleitet wurde, liefert einen weiteren Hinweis darauf, dass diese Domäne dimerisiert (siehe Kapitel 3.7.1, 3.7.2 und 3.8.3).

Im Folgenden wird die Dissoziationskonstante des Dimers bestimmt.

3.9.3 Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D mit Hilfe der ITC

Nachdem die Homodimerisierung der isolierten helikalen Domänen α 7-13 bzw. α 12-13 bewiesen werden konnte, sollte die Komplexbildungskonstante, bei der sich die Assoziation und die Dissoziation im Gleichgewicht befinden, bestimmt werden.

Bei einem Heterodimer kann die Assoziationskonstante mit Hilfe der Isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) bestimmt werden. Dazu wird die Wärmemenge gemessen, die bei der Titration der miteinander interagierenden Proteine verbraucht bzw. freigesetzt wird. Da das Wildtyp-Protein und die isolierten Domänen von hGBP1 jedoch Homodimere bilden, ist es nicht möglich ihre Assoziation durch eine Titration zu messen. Deswegen wurden die homodimeren Proteine (bei hoher Konzentration) durch Verdünnung in Puffer dissoziiert und die dafür aufgenommene Wärmemenge gemessen. Dazu wurden 0,5 mM des jeweiligen Proteins in der Spritze des ITCs vorgelegt und mit kleinen Volumina (4 - 8 μ l) in die Messzelle (1,4 ml) injiziert. Beim Wildtyp-Protein wurde die Verdünnung im nukleotidfreien Zustand untersucht. Die Experimente wurden bei einer konstanten Temperatur von 20 °C durchgeführt.

An die Daten wurde eine theoretische Kurve angepasst (Abbildung 37), um die Dissoziationskonstante des Homodimers zu bestimmen [7.2.2].

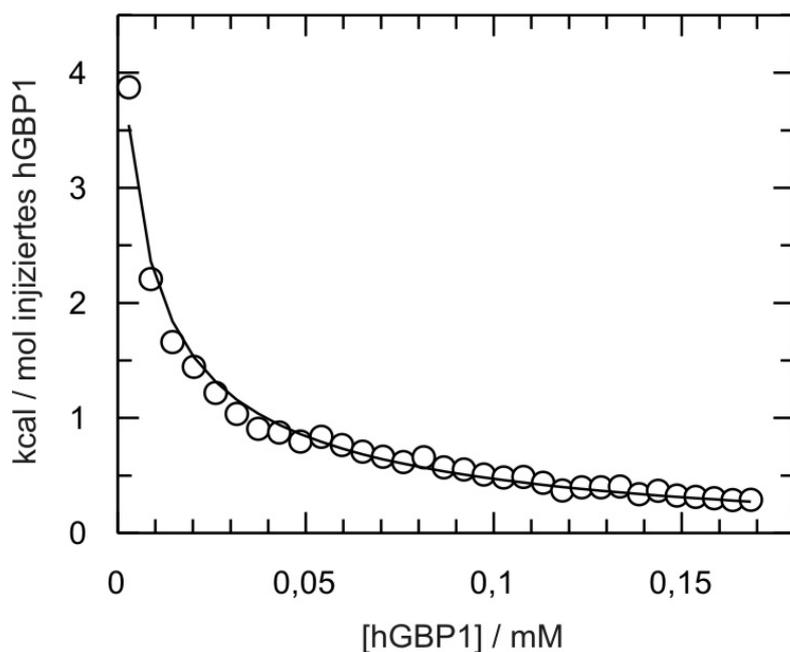


Abbildung 37: Bestimmung der Dissoziationskonstante von hGBP1 α 12-13 mit der Isothermen Titrationskalorimetrie. Bei einer konstanten Temperatur von 20 °C wurden 500 μ M hGBP1 α 12-13 in 8 μ l Schritten in Puffer X verdünnt.

Beim Wildtyp-Protein und den isolierten helikalen Domänen α 7-11 und α 12 kann bei diesem Experiment kein Dissoziationseffekt beobachtet werden. Dies war zu erwarten, da die oben beschriebenen Experimente gezeigt haben, dass diese Proteine Monomere sind.

Die Komplexbildungsdaten der helikalen Domänen α 7-13 und α 12-13 fasst die Tabelle 15 zusammen:

	Diss.-Enthalpie [kcal/mol]	K_D [μ M]
hGBP1 α 7-13	4,6	100
hGBP1 α 12-13	12,5	4,7

Tabelle 15: Zusammenfassung der Ergebnisse Dissoziationsexperimente der helikalen Domänen von hGBP1.

Mit dieser Methode konnte die Komplexbildung der isolierten helikalen Domänen α 7-13 nachgewiesen und die Dissoziationskonstante dieses Dimers mit 100 μ M quantifiziert werden. Die Dissoziationskonstante der isolierten helikalen Domäne α 12-13 beträgt 4,7 μ M. Dies bedeutet eine relativ hohe Affinität für das kleinere Konstrukt, was auch sehr gut den biochemischen Befunden und insbesondere mit den Ergebnissen der DSC-Analyse übereinstimmt. Im Gegensatz dazu wird hier für die komplette helikale Domäne (α 7-13) nur eine schwache Affinität des Dimers erhalten, die aber immer noch stark genug ist, um die qualitativen Befunde der Biochemischen Untersuchungen zu erklären.

3.10 Mit welchen Proteinen interagiert hGBP1?

Die Aufgabe des humanen Guanylat-bindenden Proteins 1 ist bisher weitgehend unbekannt. In Zellkultur-experimenten sind eine antivirale und eine anti-proliferative Wirkung nachweisbar. Um die Funktion des Proteins in der Zelle aufzuklären wurde untersucht, ob hGBP1 mit anderen Proteinen interagiert. Dazu wurde mit dem Hefe Zwei-Hybrid-System nach möglichen Interaktionspartnern gesucht. Für den Versuch wurde das *lexA* Zwei-Hybrid-System mit den Vektoren pBTM116 und VP16 verwendet. In den Vektor pBTM116 wird dabei die cDNA des Köderproteins und in den Vektor VP16 die cDNA-Bank insertiert. Die Expression der Aminosäure Histidin dient als Selektionsmarker für die Interaktion des Köderproteins mit einem Proteinen aus der cDNA-Bank.

Für den Versuch wurden Hefezellen verwendet, die mit dem Köderplasmid pBTM116-hGBP1C589S transformiert worden waren. Es wurde eine Mutante von hGBP1 verwendet, bei der das Cystein des CaaX-Motivs zu einem Serin mutiert worden ist. Diese Mutation wurde eingeführt, um die Farnesylierung und damit die Membranbindung des Proteins zu verhindern. Dadurch sollte die Effizienz des Zwei-Hybrid-Systems gesteigert werden.

Bei dem Experiment wurde ein Milligramm einer embryonalen *full mouse* cDNA-Bank verwendet, die freundlicherweise von Dr. Hanzal-Bayer zu Verfügung gestellt wurde. Die cDNA war von ihm aus der mRNA ganzer, 9½ und 10½ Tage alter embryonaler Mäuse synthetisiert worden. Die mRNA war mit Hilfe eines *NotI*-Primers in die entsprechende cDNA umgeschrieben und über die *NotI/NotI* Schnittstelle ungerichtet in das pVP16-Plasmid kloniert worden.

Das Köderplasmid und die cDNA-Bank wurden mit der in [2.1.15] beschriebenen Lithiumacetat-Methode in *S. cerevisiae* L40 transformiert. Die transformierten Hefezellen wurden auf THULLy-Festagarplatten ausgestrichen. Von diesen Platten wurden die in den folgenden fünf Tagen wachsenden Hefekolonien auf eine Masterplatte überführt. Anschließend wurde die Zellen auf Platten mit einem *Leu*-Medium überführt, wodurch sie das pBTM116-Plasmid, auf das nicht mehr selektioniert wurde, verloren. Das VP16-Plasmid wurde aus den Zellen extrahiert und sequenziert um die potentiellen Interaktionspartner zu bestimmen.

Um die Transformationseffizienz zu ermitteln, erfolgten Kontrollausstriche auf UTL-Nährböden, auf denen alle doppelt transformierten Hefezellen Kolonien bilden. Diese Platten wurden nach drei Tagen ausgezählt. Die Berechnung der Transformationseffizienz (Trf) erfolgte mit folgender Gleichung:

Formel 7
$$\text{Trf} = (\text{cfu}/\mu\text{g transformierter DNA}) * (V_{\text{ges}}/V_{\text{Probe}})$$

cfu = *colony forming units* (auf UTL-Nährböden)

V_{ges} = Gesamtvolumen des Transformationsansatz

V_{Probe} = Volumen des Kontrollausstrich

Die Anzahl der getesteten Klone wurde wie folgt berechnet: $\text{cfu} \cdot (V_{\text{ges}}/V_{\text{Probe}})$.

$V_{\text{ges}} = 30 \text{ ml}$, $V_{\text{Probe}} = 100 \mu\text{l}$, $\text{cfu} = 1,71 \cdot 10^6$ Kolonien

In dem Ansatz wurden insgesamt $5,28 \cdot 10^8$ Transformanden bei einer Transformationseffizienz von $5,28 \cdot 10^5$ Kolonien pro μg cDNA untersucht.

Auf dem Selektionsmedium (THULLy ohne 3-AT) wuchsen nach 6 Tagen 48 Klone. Die Klone wurden auf zwei Masterplatten (THULLy ohne 3AT bzw. THULLy mit 3AT) überführt, um bei den möglichen Interaktionspartnern zwischen denen mit einer starken bzw. schwachen Wechselwirkung zu unterscheiden.

Bei einigen Hefestämmen, wie z.B. bei den in diesem Zwei-Hybrid-System verwendeten *S. cerevisiae* L40, gibt es eine schwache Expression des Hefeproteins HIS3. Dadurch kommt es zu einem so genannten falsch positiven Wachstum von Hefezellen auf THULLy-Platten ohne 3-AT (3-Aminotriazol). Die Expression von HIS3 wird durch die Zugabe von 3-AT inhibiert.

Es gab 5 Klone mit starker und 43 Klone mit schwacher Wechselwirkung. Alle 48 Klone wurden sequenziert. Da die DNA jedes potentiellen Interaktionspartners mehrfach transformiert wurde, sollten im Falle einer Interaktion auch mehrere Klone desselben Proteins auf der Masterplatte wachsen. Unter den 48 Klonen gab es jedoch nur zwei Klone, die dasselbe Protein enthielten. Es wurden folgende Interaktionspartner mit starker Wechselwirkung identifiziert:

Bezeichnung des Klons im 2-Hybrid-Screen	Protein	Bemerkung
A33	TNF- α	
A27	Rac GTPase aktivierendes Protein	Leseraster verschoben,
A21	Pyruvat Kinase 3	Leseraster gedreht, Peptid 20 AS lang
A12	Hsp 70	Leseraster gedreht, Peptid 10 AS lang
A6	cDNA clone CR15-1.58-392/379-45	Leseraster gedreht, Peptid 47 AS lang

Tabelle 16: Übersicht über die potentiellen Interaktionspartner mit starker Wechselwirkung

Unter den 43 Klonen mit schwacher Interaktion waren acht Klone mit Plasmiden ohne Insert und 32 Klone bei denen entweder das Insert 3'-5' in pVP16 kloniert worden war, oder die nicht im richtigen Leseraster inseriert worden waren.

Bezeichnung des Klons im 2-Hybrid-Screen	Protein	Bemerkung
A7 und A28	Septin Nedd 5	Klon zweimal vorhanden, Insert gedreht
A34		Keine Sequenzhomologie gefunden. 48 AS lang
A36		Keine Sequenzhomologie gefunden. 72 AS lang

Tabelle 17: Potentielle Interaktionspartner mit schwacher Wechselwirkung.

Die Klone A7 und A28 waren die einzigen, mit denen derselbe potentielle Interaktionspartner gefunden wurde. Die Verifizierung der Interaktion erfolgt durch die Kotransformation der DNA der potentiellen Interaktionspartner mit der hGBP1-DNA. Dazu wurde die DNA der potentiellen Interaktionspartner in den Vektor pBTM116 kloniert. Durch die Kotransformation mit den Leervektoren von pBTM116 bzw. VP16 sollten falsch positive Interaktionspartner identifiziert werden, die selber DNA binden und die Synthese des Selektionsmarker Histidin induzieren.

Es wurden folgende Kotransformationen getestet:

- pBTM116-hGBP1C589S / VP16-IAP
- pBTM116-IAP / VP16-hGBP1C589S
- pBTM116⁻ /VP16-IAP
- pBTM116-IAP / VP16⁻

(IAP: DNA des potentiellen Interaktionspartner, ⁻: Leervektor)

Die Kotransformation der Interaktionspartner mit einer starken Wechselwirkung ergab, dass es sich bei der Interaktion von hGBP1 mit dem Rac GTPase aktivierenden Protein um ein falsch positives Wachstum handelt. Dies wurde durch die Kotransformation des Rac GTPase aktivierendem Protein mit den Leervektoren pBTM116 bzw. VP16 nachgewiesen. Diese führte ebenfalls zu einem deutlichen Wachstum auf den Selektionsmedien. Die Interaktionen der vier anderen Proteine mit hGBP1 erwiesen sich als nicht reproduzierbar.

Keine der mit dem Zwei-Hybrid-System gefundenen schwachen Wechselwirkungen zwischen hGBP1 und einem der potentiellen Interaktionspartner war reproduzierbar.

Mit dem Zwei-Hybrid-System wurde in der analysierten cDNA-Bank kein Interaktionspartner von hGBP1 gefunden.

3.11 Interagiert hGBP1 mit einem Kernkörperprotein?

Mit Lokalisationsstudien untersuchten Martin Schwemmler et al. die Verteilung von hGBP1 in der Zelle. Dazu wurden humane Osteosarcoma Zellen (UTA6) mit Plasmiden transfiziert, welche die DNA für N-terminal Flag-Markiertes hGBP1 enthielten. Nach 48 Stunden konnten sie den Großteil des hGBP1 im Cytosol und einen Teil des Proteins im Nukleus lokalisieren. Durch Koloalisationsstudien von hGBP1 mit Mx1 und SP100 sind die Proteine in denselben Kernkörperchen nachweisbar (Martin Schwemmler, persönliche Mitteilung).

Mit dem Zwei-Hybrid-System sollte durch die gezielte Kotransformation von hGBP1 mit bekannten Kernkörperproteinen getestet werden, ob eines der Proteine mit hGBP1 interagiert. Die Proteine sind von Othmar G. Engelhardt mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems als mögliche Interaktionspartner von Mx1 identifiziert worden ²⁷³. Die Plasmid-DNA folgender Proteine (Tabelle 18) wurde freundlicherweise von Othmar G. Engelhardt zur Verfügung gestellt.

Kernkörperprotein	Plasmid
BLM	pB42AD
CELTIX	pB42AD
hDaxx	pGilda
hDaxx	pB42AD
EST R89157	pB42AD
EST AK000009.1	pB42AD
FLASH	pB42AD
P96PIF	pB42AD
PIAS1	pB42AD
PKM	pGilda
PKM	pB42AD
PML 633	pGilda
PML 633	pB42AD
Pm-ScI 75	pB42AD
SAE2	pB42AD
Sp100	pB42AD
SUMO-1	pGilda
SUMO-1	pB42AD
TDG	pB42AD
TOPORS	pB42AD

Tabelle 18: Übersicht der potentiell interagierenden Kernkörperproteine

Die Kotransformation erfolgte mit der in [2.1.13] beschriebenen Methode. Zur Kontrolle erfolgte die Kotransformation der DNA der Kernkörperproteine mit den Leervektoren. Das verwendete Zwei-Hybrid-System nutzt die Expression von Leucin bzw. der β -Galaktosidase als Selektionsmarker.

Nur bei der Kotransformation des pB42AD-PML-Konstrukts mit dem pGilda-hGBP1-Konstrukt gibt es ein Wachstum auf den Leucin-Mangelmedien. Die Kontrolltransformation mit dem pGilda Leervektor zeigt jedoch, dass es sich um ein falsch positives Wachstum handelt.

Es gibt keine Interaktion zwischen hGBP1 und den Kernkörperproteine CELTIX, hDaxx, p96PIF, PKM, SAE2, Sp100, SUMO-1, TDG, TOPORS, EST R89157 und EST AK000009.1.

Bei der Kotransformation der Kernkörperproteinen BLM, FLASH, PIAS und Pm-Sci 75 mit hGBP1 kann nur eine schwache Expression der β -Galaktosidase nachgewiesen werden. Es gibt jedoch keine nachweisbare Expression des Selektionsmarkers Leucin. Deshalb kann es sich nur um eine sehr schwache und damit falsch positive Interaktion handeln.

Mit dem Zwei-Hybrid-System erfolgte eine Kotransformation von hGBP1 mit der cDNA von potentiellen Interaktionspartnern bzw. mit einer cDNA-Bank. Die Experimente zeigen, dass keines der getesteten Kernkörperproteine mit hGBP1 interagiert. Auch durch die Kotransformation mit einer cDNA-Bank konnte kein Interaktionspartner nachgewiesen werden. Möglicherweise werden die Interaktionspartner von hGBP1 erst exprimiert, wenn ihre Expression in Folge einer antiviralen oder antiproliferativen Reaktion z.B. durch Cytokine induziert worden ist.

4 Diskussion

In dieser Arbeit ist es gelungen, stabile isolierte Domänen sowie verschiedene Mutanten des humanen Guanylat-bindenden Protein 1 zu klonieren und zu präparieren. Die verschiedenen Mutationen und Konstrukte wurden generiert, um ihren Einfluss auf die Selbst-Assemblierung von hGBP1 zu untersuchen. Die Analyse der Selbst-Assemblierung erfolgte mit verschiedenen Methoden *in vivo* und *in vitro*. Zusätzlich wurden mit dem Hefe Zwei-Hybrid-Assay mögliche Interaktionspartner gesucht. Dazu wurde sowohl eine cDNA-Bank analysiert, als auch verschiedene Proteine, die als mögliche Interaktionspartner geeignet erschienen.

4.1 Die Oligomerisierung von hGBP1

Die Guanylat-bindenden Proteine sowie die homologen Atlastine bilden mit den Dynaminen, den Dynamin-ähnlichen Proteinen und Mx die Dynamin-Superfamilie^{53,274}.

Die Zuordnung der Guanylat-bindenden Proteine und der Atlastine in die Dynamin-Superfamilie erfolgt vor allem auf Grund ähnlicher biochemischer Eigenschaften sowie phylogenetischer Analysen. Ein Vergleich der Sequenz zeigt, dass die GBPs/Atlastine und die Dynamine möglicherweise aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein hervorgegangen sind²⁷⁵.

Die charakteristische Struktur der Mitglieder der Dynaminfamilie besteht aus einer G-Domäne, einer Mitteldomäne und einer GTPase-Effektor-Domäne (GED). Zusätzlich besitzen die echten Dynamine eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH) und eine Prolin-reiche-Domäne (PRD).

Eine gemeinsame Eigenschaft der GBPs und der Dynamine ist eine niedrige Affinität zu GTP und die Abhängigkeit der GTPase-Aktivität vom Grad der Selbst-Assemblierung. Bei der Selbst-Assemblierung der Mx-Proteine und der Dynamine werden Tetramere zu multimeren Strukturen zusammengelagert. Bei den Mx-Proteinen sowie den Dynaminen ist die Funktion der helikalen Domänen bei der Oligomerisierung der Proteine nachgewiesen worden.

Die C-terminale GTPase-Effektor-Domäne von Mx, die für die schnelle GTP-Hydrolyse benötigt wird, interagiert im Zwei-Hybrid-System mit der nukleotidbindenden Domäne und der Mitteldomäne^{185,186}. Für Dynamin ist mit verschiedenen Methoden ein ähnliches Muster von Interaktionen zwischen der GTPase-Effektor-Domäne und der Mitteldomäne bzw. der GTPase-Domäne nachgewiesen worden^{276,277}. Die GED von Dynamin beeinflusst dabei nicht nur die GTP-Hydrolyse sondern ist auch wichtig für die Oligomerisierung⁵⁶.

Für die helikale Domäne von hGBP1 wird angenommen, dass sie einen ähnlichen Einfluss auf die Selbst-Assemblierung und die GTP-Hydrolyse haben könnte⁵⁰.

Die Selbst-Assemblierung des Mx-Proteins ist abhängig von der Salzkonzentration, der Temperatur und der Präsenz von Nukleotiden. Unter physiologischen Salzkonzentrationen assembliert es zu langen faserartigen Strukturen. In Anwesenheit von Guaninnukleotiden ordnet sich Mx in Form von Ringen und Spiralen an¹⁸⁸. Die Selbst-Assemblierung von Dynamin erfolgt ebenfalls in Spiralen^{68,188}.

Im Unterschied zu Dynamin und Mx ist für hGBP1 - *in vitro* - die nukleotidabhängige Bildung von Dimeren und Tetrameren belegt, jedoch keine Assemblierung zu höheren geordneten Strukturen^{50,57}. Die Selbst-Assemblierung führt dabei zu einer Steigerung der Hydrolyse-Aktivität. Da hGBP1 im GppNHp-gebundenen und im nukleotidfreien Zustand mit nur einem Molekül pro asymmetrischer Einheit kristallisiert, wurden die Aussagen über eine mögliche Struktur des Dimers anhand der beobachteten Kristallkontakte getroffen, die eine besonders große Interaktionsfläche aufweisen²³¹. Daraus wurden für das Dimer von hGBP1 zwei verschiedene mögliche Strukturen vorgeschlagen. Bei dem ersten Dimer (A) wird eine Interaktion zwischen der G-Domäne und der helikalen Domäne angenommen, während bei dem zweiten Dimer (B) die G-Domänen interagieren²³¹.

In dieser Arbeit wurde die Oligomerisierung von hGBP1 zuerst anhand der Interaktionen des Wildtyp-Proteins sowie verschiedener Punktmutanten analysiert. Mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Interaktionsassays wurde untersucht, ob die Interaktion der Proteine auch *in vivo* nachgewiesen werden kann. Bei Proteinen, die Homodimere bilden, kann mit dieser Methode untersucht werden, welchen Einfluss die Mutation eines der interagierenden Proteine auf die Dimerisierung hat. Bei hGBP1 wurde damit der Einfluss der Nukleotidbindung, der GTP-Hydrolyse und der Farnesylierung auf die Protein-Interaktion charakterisiert.

4.1.1 Der Einfluss der Nukleotidbindung und der Nukleotidhydrolyse

Der Einfluss der Nukleotidbindung auf die Selbst-Assemblierung wurde mit Hilfe von Mutanten analysiert, die GTP sehr viel schwächer (K51A und D184N) binden als das Wildtyp-Protein⁵⁷. Mit der Mutanten R48A, die GTP gleich stark wie das Wildtyp-Protein bindet jedoch hundertfach schlechter hydrolysiert, wurde der Effekt der GTP-Hydrolyse auf die Interaktion untersucht.

Die Mutation des konservierten Lysins aus der P-Schleife führt bei Dynamin und bei den Mx-Proteinen zu einem Verlust ihrer Funktion. Für Dynamin ist belegt, dass diese Mutation zu einer dominanten Blockade der Vesikelabschnürung während der Endocytose führt^{278,279}. Die Oligomerisierung des Proteins wird durch die Mutation jedoch nicht blockiert und die Mutante kann weiterhin die GTPase-Aktivität des Wildtyp-Proteins stimulieren⁷². Die Mutation des konservierten Lysins bewirkt bei den Mx-Proteinen einen Verlust der antiviralen Aktivität und der Fähigkeit GTP zu binden und zu hydrolysieren²⁸⁰.

Bei hGBP1 ist für das konservierte Lysin 51 ebenfalls eine wichtige Funktion im GTPase-Zyklus belegt⁵⁷. Eine Mutation dieser Aminosäure zu Alanin führt wie bei den Mx-Proteinen zu einer stark verminderten Nukleotidbindung und Hydrolyse-Aktivität. Im Hefe Zwei-Hybrid-System interagiert die Mutante

weder als Homodimer mit sich selbst noch als Heterodimer mit dem Wildtyp-Protein. Darin unterscheidet sich diese Mutante von der entsprechenden in Dynamin, bei der die Oligomerisierung nicht blockiert ist. Die Mutante D184N weist eine mehr als zwanzigfach schwächere GTP-Bindung als das Wildtyp-Protein auf. Mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems und der Größenausschlusschromatographie kann wie bei der Mutante K51A weder eine Bildung von Homodimeren noch eine Interaktion mit dem Wildtyp-Protein nachgewiesen werden. Sowohl die Mutation des Lysins 51 als auch die des Aspartats 184 belegen die Notwendigkeit der GTP-Bindung für die Selbst-Assemblierung von hGBP1.

Die Mutation des Arginin 48 in der P-Schleife führt im Vergleich zum Wildtyp-Protein zu einer Reduzierung der GTPase-Aktivität auf ein hundertstel⁵⁷. Mit der Größenausschlusschromatographie ist für R48A wie für das Wildtyp-Protein die Bildung von Dimeren im GppNHp-gebundenen Zustand nachweisbar. Im GDP·AlF_x-gebundenen Zustand blieb die Mutante monomer⁵⁷. Die Analysen der Selbst-Assemblierung der Argininmutante zeigen, dass es einen Unterschied zwischen den *in vivo* und den *in vitro* Ergebnissen gibt. Im Unterschied zu den *in vitro* Experimenten bildet die Argininmutante im Zwei-Hybrid-System keine Homodimere sondern interagiert nur mit GTP-hydrolysierenden Mutanten oder dem Wildtyp-Protein zu Heterodimeren.

Im Zwei-Hybrid-System zeigt sich außerdem ein interessanter Unterschied zwischen dem Wildtyp-Protein und der isolierten G-Domäne. Während beim vollständigen Protein die Mutation des Arginins 48 zu einem Alanin zu einer Blockade der Selbst-Assemblierung führt, wird die Dimerisierung der isolierten G-Domäne durch die Mutation des Arginins verstärkt. Dieser Widerspruch konnte bisher noch nicht geklärt werden.

Einen Hinweis auf eine unterschiedliche Oligomerisierung geben auch subzelluläre Lokalisationsstudien, die von Martin Schwemmler durchgeführt wurden. Die Lokalisationsstudien zeigen, dass das Wildtyp-Protein sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus nachgewiesen werden kann, wobei er dort spezifisch an die Kernkörperchen angelagert wird. Anders als das Wildtyp-Protein kann die Argininmutante nur und die Lysinmutante fast nur im Nukleus nachgewiesen werden. Beide werden allerdings nicht an die Kernkörperchen angelagert.

Die Kointransformation der Zellen mit dem Wildtyp-Protein und der Argininmutante führt im Unterschied zur Lysinmutante zu einer nachweisbaren Anlagerung der Mutante an die Kernkörperchen (Martin Schwemmler, persönliche Mitteilung). Dieser Befund könnte darauf zurückzuführen sein, dass R48A nicht aber K51A in der Lage ist, mit dem Wildtyp-Protein zu interagieren.

4.1.2 Die Farnesylierung

Das humane Guanylat-bindende Protein 1 hat an seinem C-Terminus ein CaaX-Motiv. Dieses Motiv wird bei vielen Proteinen durch eine posttranslationale Isoprenylierung modifiziert, wobei eine Farnesyl- oder Geranylgeranylgruppe an das Protein gebunden wird. Die Isoprenoide ermöglichen eine Anlagerung der

Proteine an eine Membran und sind bei einigen Proteinen an der Interaktion mit anderen Proteinen beteiligt²⁸¹.

Die Farnesylierung des C-terminalen CaaX-Motivs CTIS von hGBP1 ist *in vivo* nachgewiesen worden²¹⁸. Dabei wird jedoch ein Teil des exprimierten Proteins nicht farnesyliert. Sowohl das modifizierte als auch das unmodifizierte Protein wurden vorwiegend im löslichen Anteil des Zelllysats gefunden^{218,219}. Bei Endothelzellen wird hGBP1 auch nach der Behandlung mit Cytokinen hauptsächlich im Cytoplasma nachgewiesen²¹³. Da bisher nur wenig über die zelluläre Lokalisation von hGBP1 und insbesondere die Lokalisation an Membranen bekannt ist, ist die Funktion der Farnesylierung unklar^{213,218}.

Das Cystein 589 des CaaX-Motives wurde zu Serin mutiert, um den Einfluss der Farnesylierung auf die Selbst-Assemblierung zu untersuchen. Im Zwei-Hybrid-System ergab die Analyse der Oligomerisierung der C589S Mutante, dass diese nur sehr schwach mit dem Wildtyp-Protein interagiert und keine Homodimere mehr bildet. Der negative Effekt der Mutation wird jedoch kompensiert, wenn in einem der interagierenden Proteine zusätzlich das Arginin 48 zu Alanin mutiert ist. In der Größenausschlusschromatographie verhält sich die C589S Mutante wie das Wildtyp-Protein. Bei diesen Experimenten ist zu berücksichtigen, dass nur bei den Eukaryonten die für die Isoprenylierung des CaaX-Motives benötigte Farnesyltransferase oder die Geranylgeranyltransferasen I und II vorkommen²⁸². Deshalb sind die in *E. coli* exprimierten Proteine, die bei den *in vitro* Experimenten verwendet wurden, nicht farnesyliert.

Der in den Hefezellen beobachtete Effekt kann damit auf die fehlende Isoprenylierung zurückgeführt werden. Das bedeutet, dass die Selbst-Assemblierung von hGBP1 durch die Farnesylierung des Proteins verstärkt wird.

Einen Unterschied zwischen dem Wildtyp-Protein und der C589S Mutante zeigen auch die Ergebnisse der von Martin Schwemmle durchgeführten Lokalisationsstudien. Während das Wildtyp-Protein sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus an den Kernkörperchen nachweisbar ist, wird die C589S Mutante nicht an die Kernkörperchen angelagert und ist fast ausschließlich im Nukleoplasma vorhanden. Das Resultat der Lokalisationsstudie der C589S Mutante ähnelt damit dem Ergebnis der Lysinmutante K51A (Martin Schwemmle, persönliche Mitteilung).

4.1.3 Welche Domänen von hGBP1 sind an der Interaktion beteiligt?

Die Kristallstruktur von hGBP1 zeigt, dass zwei große Domänen das Protein bilden: eine globuläre α/β -GTPase-Domäne (G-Domäne) und eine gestreckte α -helikale Domäne (α 7-13)⁵⁰. Die helikale Domäne wird anhand ihrer Struktur in zwei Subdomänen unterteilt, die aus fünf bzw. zwei α -Helices bestehen, die Helixbündel bilden. Die erste Subdomäne (α 7-11) wird als Mitteldomäne und die zweite Subdomäne (α 12-13) als GTPase-Effektor-Domäne (GED) bezeichnet, da die Größe der Domänen mit denen in Dynamin, Mx und den Dynamin-verwandten Proteinen übereinstimmt. Außerdem wird für die Mittel- und

die GTPase-Effektor-Domäne von Dynamin eine Sekundärstruktur vorhergesagt, die ausschließlich aus α -Helices besteht, die eine Tendenz zur Ausbildung von Helixbündeln haben sollen⁵⁷.

Mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems wurde untersucht, welche Domänen von hGBP1 an der Selbst-Assemblierung beteiligt sind und mit welchen anderen Domänen sie interagieren. Dafür wurden die G-Domäne, die helikale Domäne (α 7-13) sowie die Subdomänen (α 7-11 und α 12-13) kloniert und ihre Interaktion zu Homo- oder Heterodimeren analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass es eine Interaktion zwischen den G-Domänen sowie zwischen der G-Domäne und dem Wildtyp-Protein gibt. Es ist jedoch keine Interaktion nachweisbar zwischen der G-Domäne und der helikalen Domäne α 7-13. Damit könnte die Interaktion dem Modell B entsprechen, bei dem das Dimer über die Interaktion der G-Domänen gebildet wird.

Außerdem konnte erstmals auch für die isolierte helikale Domäne α 7-13 die Bildung von Homodimeren nachgewiesen werden. Von verschiedenen Mitgliedern der Dynamin Superfamilie wie Dynamin, Dnm1p, Drp1 und MxA ist bekannt, dass die Mitteldomäne sowie die C-terminale GTPase-Effektor-Domäne (GED) miteinander zu Homo- und Heterodimeren interagieren^{142,185,283,284}. Die Homodimerisierung der isolierten helikalen Domäne α 7-13 entspricht damit der Interaktion der entsprechenden Domänen der anderen Proteine der Dynamin Familie.

Die helikale Domäne α 7-13 besteht aus den Helixbündeln α 7-11 und α 12-13, deren Interaktionen separat analysiert wurden. Im Unterschied zu Dynamin kann eine Dimerisierung der Mitteldomäne von hGBP1 (α 7-11) nicht nachgewiesen werden. Die GTPase-Effektor-Domäne (α 12-13) interagiert zu Dimeren, deshalb erfolgt die Homodimerisierung der helikalen Domäne α 7-13 wahrscheinlich über eine Interaktion der Helices α 12-13.

Ein wichtiger Unterschied zwischen hGBP1 und den Proteinen Dynamin sowie Drp1 besteht darin, dass deren GTPase-Domäne mit der Mitteldomäne und der C-terminalen GED interagiert. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die GTPase-Domäne dieser Proteine sowie die des Proteins Dnm1p keine Homodimere bildet. Bei diesen Proteinen erfolgt die Oligomerisierung ausschließlich über die C-terminalen Domänen, wobei es zu einer Stimulierung der GTPase-Aktivität kommt.

Während die Interaktion von Dynamin, Dnm1p oder MxA zur Bildung von multimeren Strukturen führt, interagiert das Wildtyp-Protein von hGBP1 je nach gebundenem Nukleotid zu einem Dimer oder einem Tetramer. Für die Dimerisierung und für die Stimulierung der GTPase-Aktivität scheint die Interaktion der G-Domäne von hGBP1 auszureichen^{50,57}. Die GTPase-Aktivität des Wildtyp-Proteins kann jedoch auch durch die Zugabe der isolierten helikalen Domäne α 7-13 stimuliert werden. Die stimulierende Wirkung der helikalen Domäne tritt jedoch erst bei höheren Proteinkonzentrationen auf. Sie ist dabei deutlich schwächer als die Selbststimulation des Wildtyp-Proteins⁵⁷.

Wenn die Dimerisierung von hGBP1 auf der Interaktion der GTPase-Domäne beruht, könnten sich zwei Dimere über ihre helikalen Domänen zu einem Tetramer zusammenlagern.

4.2 In welcher Form assemblieren die helikalen Domänen?

Für die Untersuchung der Interaktion der helikalen Domänen *in vitro* wurden diese in Expressionsvektoren kloniert und präpariert.

Die Analyse der exprimierten Proteine mit Hilfe der CD-Spektroskopie zeigt, dass die Struktur der isolierten Domänen der Struktur der Domänen im Wildtyp-Protein entspricht. Die Untersuchung zeigt jedoch auch, dass die Struktur der isolierten helikalen Domäne $\alpha 12$ mit einer Schmelztemperatur T_m von unter 30 °C extrem instabil ist.

Die *in vitro* Analysen der Selbst-Assemblierung der isolierten Domänen erfolgten mit der analytischen Größenausschlusschromatographie und der Dynamischen Lichtstreuung (DLS).

Mit beiden Methoden kann gezeigt werden, dass die isolierte helikale Domäne $\alpha 7-13$ Dimere bildet. Die mit Hilfe der DLS bestimmte Molekülmasse der Subdomäne $\alpha 7-11$ entspricht der eines Monomers und die der Subdomäne $\alpha 12-13$ der eines Dimers. Die mit der Größenausschlusschromatographie bestimmte Molekülmasse der Subdomäne $\alpha 7-11$ liegt dagegen zwischen den Massen, die einem Monomer bzw. einem Dimer entsprechen würde. Für die Subdomäne $\alpha 12-13$ ergeben die Messungen die Molekülmasse eines Trimers und für die Subdomäne $\alpha 12$ liegt die Masse zwischen der eines Dimers und Trimers. Die nicht eindeutigen Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie sind möglicherweise auf die außergewöhnlich langgestreckte Struktur der Subdomänen zurückzuführen. Bei der Bestimmung der Molekülmasse aus der Dynamischen Lichtstreuung wurde die langgestreckte Form der helikalen Subdomänen als Modell zugrundegelegt. Dies wurde bei der Größenausschlusschromatographie nicht berücksichtigt, da die Kalibrierung mit globulären Proteinen erfolgte. Als Folge erhält man bei gestreckten Strukturen eine scheinbar höhere Molmasse. Mit zwei weiteren unabhängigen Methoden (Differential Scanning Kalorimetrie und Cross Linking) konnte außerdem, übereinstimmend mit den DLS-Messungen, für $\alpha 12-13$ die Bildung von Dimeren gezeigt werden. Die isolierte helikale Domäne $\alpha 7-13$ sowie die Subdomäne $\alpha 12-13$ liegen in Lösung demnach als Dimer, die Subdomäne $\alpha 7-11$ als Monomer vor. Die Dimerisierung der helikalen Domäne $\alpha 7-13$ beruht folglich auf der Interaktion der Helices $\alpha 12-13$.

Um den Beitrag der helikalen Domänen zur Selbst-Assemblierung des Wildtyp-Proteins beurteilen zu können, wurde die Dissoziationskonstante (K_D) der helikalen Domäne $\alpha 7-13$ und der Subdomäne $\alpha 12-13$ mit der Isothermen Titrationskalorimetrie bestimmt. Für die helikale Domäne $\alpha 7-13$ wurde eine Dissoziationskonstante von 100 μM und für die Subdomäne $\alpha 12-13$ von 4,7 μM bestimmt. Die relativ hohe Affinität für die Subdomäne $\alpha 12-13$ passt sehr gut zu den biochemischen Befunden und insbesondere zu den Ergebnissen der DSC-Analyse. Im Gegensatz dazu wird hier für die komplette helikale Domäne ($\alpha 7-13$) nur eine schwache Affinität des Dimers erhalten. Die Assoziation der Helices $\alpha 12-13$ wird offensichtlich durch die Anwesenheit der Subdomäne $\alpha 7-11$ abgeschwächt. Die Interaktion der helikalen Domänen ist

zu schwach, um eine Dimerisierung des Wildtyp-Proteins im nukleotidfreien Zustand zu ermöglichen. Erst nach einer Konformationsänderung die mit der Nukleotidbindung und/oder der Dimerisierung der G-Domäne einhergeht, kann der Bereich α 12-13 so stark beitragen, wie es für die isolierte Subdomäne beobachtet wird.

Zu einer Dimerisierung des Wildtyp-Proteins, im nukleotidfreien Zustand, kann es auf Grund einer relativ schwachen Affinität der helikalen Domänen so mit nicht kommen. Daraus folgt, dass es im nukleotidgebundenen Zustand zu einer Konformationsänderung kommen muss, damit der Bereich α 12-13 so stark beitragen kann, wie es hier für die isolierte Domäne beobachtet wird.

4.3 Modell der Tetramerisierung von hGBP1

Für die Charakterisierung der verschiedenen von hGBP1 gebildeten Oligomere werden stabile Komplexe benötigt. Die hGBP1 Moleküle, die zu Oligomere assemblieren, können mit Hilfe von chemischen „Cross-Linkern“ kovalent verknüpft werden, um auf die Art ihrer strukturellen Verknüpfung rückschließen zu können. Mit dieser Methode können auch Komplexe nachgewiesen werden, die aufgrund ihrer schwachen Interaktion mit der Größenausschlusschromatographie nicht detektierbar sind.

Die Tabelle 19 fasst die mit der Größenausschlusschromatographie und der kovalenten Verknüpfung nachweisbaren Komplexe zusammen.

	Größenausschlusschromatographie				„Cross Linking“			
	Monomer	Dimer	Trimer	Tetramer	Monomer	Dimer	Trimer	Tetramer
Wt.	+				+			
Wt. + GDP	+					+	+	
Wt. + GppNHp		+				+	+	+
Wt. + GDP·AlF _x				+			+	+

Tabelle 19: Vergleich der mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie und der kovalenten Verknüpfung nachweisbaren Komplexe.

Mit der Größenausschlusschromatographie sind eine Dimerisierung des Wildtyp-Proteins in der GppNHp-gebundenen und eine Tetramerisierung in der GDP·AlF_x-gebundenen Form nachweisbar⁵⁷. Bei der kovalenten Verknüpfung der Komplexe entstehen jedoch im GppNHp-gebundenen Zustand nicht nur Dimere sondern vor allem Tri- und Tetramere. Die Verknüpfung des Wildtyp-Proteins im GDP·AlF_x-gebundenen Zustand ergibt eine Mischung aus Trimeren, Tetrameren sowie einigen höheren Oligomeren. Die isolierte G-Domäne bildet vor allem Dimere und liegt nur zu einem deutlich geringeren Teil als Tetramer vor. Die isolierte helikale Domäne α 7-13, hingegen, liegt vor allem, und α 12-13 liegt ausschließlich als Dimer vor. Dieses Ergebnis zeigt, dass für die Tetramerisierung des Wildtyp-Proteins die

Interaktion der G-Domäne alleine nicht ausreicht. An der Ausbildung des Tetramers muss demzufolge die helikale Domäne beteiligt sein.

Diese Ergebnisse legen folgendes Modell für die Tetramerisierung von hGBP1 nahe:

Eine vom gebundenen Nukleotid abhängige Wechselwirkung der G-Domänen führt zunächst zu einer Dimerisierung zweier monomerer, GTP-gebundener hGBP1 Proteine. Diese Dimere können sich über eine sekundäre Interaktion, welche durch die helikale Domäne vermittelt wird, zu einem Tetramer zusammenschließen.

Die Beteiligung der G-Domäne und der helikalen Domäne der Interaktion kann anhand des in der Abbildung 38 dargestellten Modells beschrieben werden. Das Modell beschreibt einen möglichen Reaktionsweg, der zur Bildung von kovalent verknüpften Di-, Tri- und Tetrameren führt.

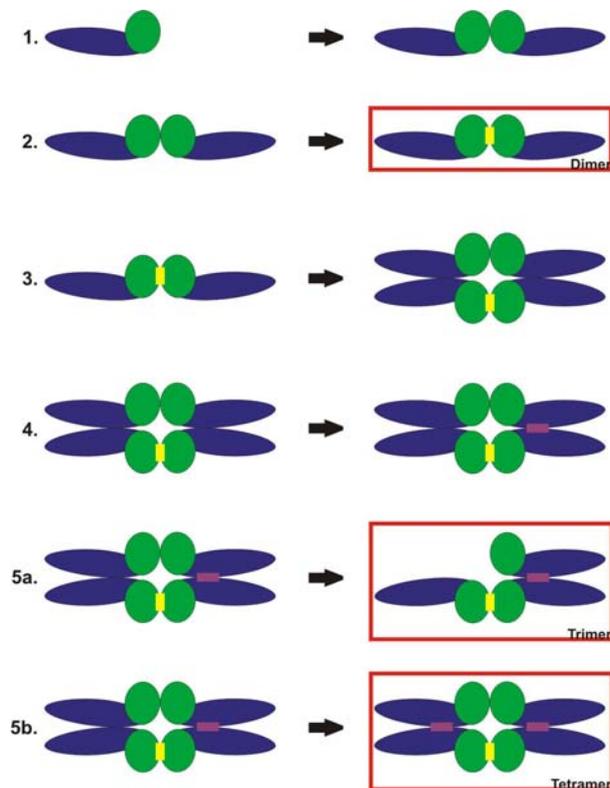


Abbildung 38: Modell zur Bildung von kovalent verknüpften Di-, Tri- und Tetrameren. In dem Modell werden die möglichen Verknüpfungen durch die gelb bzw. magenta gefärbten Rechtecke symbolisiert.

Über ihre G-Domänen (grün) interagieren zwei Moleküle des Wildtyp-Proteins von hGBP1 und bilden ein Dimer (1), das anschließend durch EDC bzw. DMS kovalent verknüpft (gelb) wird (2). Anschließend interagieren ein verknüpftes und ein nicht verknüpftes Dimer über ihre helikalen Domänen (blau) und bilden ein Tetramer (3). Durch den „Cross Linker“ erfolgt eine kovalente Verknüpfung (Magenta), wobei wahrscheinlich zuerst nur eine Bindung entsteht (4). Anschließend kann entweder das nicht verknüpfte Molekül dissoziieren, so dass ein verknüpftes Trimer übrig bleibt (5a), oder es wird durch eine weitere Verknüpfung ein stabiles Tetramer gebildet (5b). Der Schritt (5a) erklärt, warum bei diesem Versuch vor allem kovalent verknüpfte Trimere entstehen. Die hohe Konzentration an Trimeren, die experimentell

beobachtet wird, ist darauf zurückzuführen, dass eine einzelne Verknüpfungsreaktion wahrscheinlicher ist als zwei gleichzeitige Verknüpfungen.

In diesem Modell ist das Dimer des Wildtyp-Proteins von hGBP1 als elongierte Struktur dargestellt, in der die helikalen Domänen voneinander wegzeigen (Abbildung 39). Außerdem wird eine Konformation des Tetramers angenommen, bei der eine Interaktion der helikalen Domänen über die Helices α_{12} oder α_{13} erfolgen kann.

Um eine Vorstellung davon zu erhalten, wie das Dimer des Wildtyp-Proteins aussehen könnte, wurde die kristallisierte Struktur des Dimers der G-Domäne 1-317²⁸⁵ mit der Struktur der helikalen Domänen des unverkürzten Proteins überlagert. Die Abbildung 39 zeigt die dabei entstehende hypothetische Struktur des Wildtypdimers.

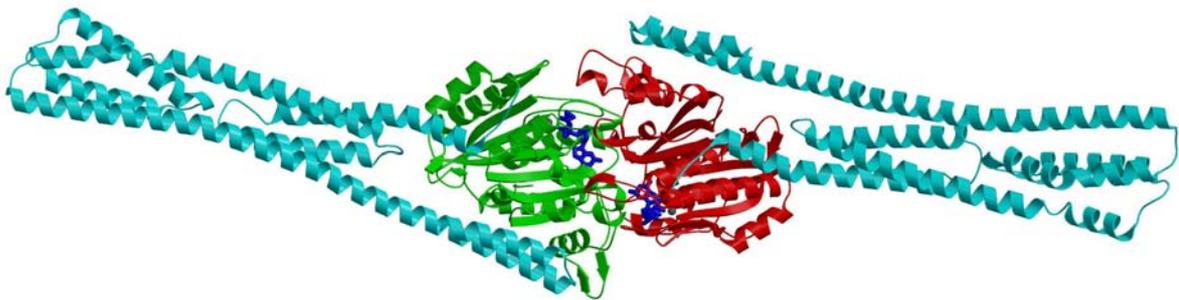


Abbildung 39: Kombination der Struktur des Dimers der isolierten G-Domäne 1-317 mit der Struktur der helikalen Domänen des Wildtyp-Proteins.

Die Überlagerung der Struktur der isolierten G-Domäne 1-317 und die der GTPase-Domäne des Wildtyp-Proteins zeigt eine weitgehende Übereinstimmung der beiden Strukturen (siehe Abbildung 40)²⁸⁵.

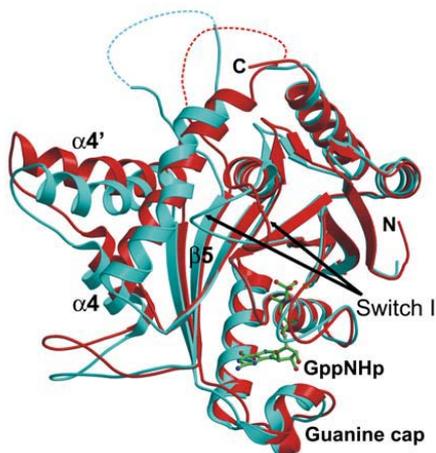


Abbildung 40: Überlagerung der Struktur der isolierten G-Domäne 1-317 (in Rot) mit der GTPase-Domäne des Wildtyp-Proteins von hGBP1 (in Cyan) im GppNHp-gebundenen Zustand²⁸⁵.

Größere Unterschiede gibt unter anderem zwischen den Helices α_4 und $\alpha_{4'}$, sowie dem Beginn der Helix $\alpha_{4'}$. Die Strukturunterschiede zwischen den überlagerten G-Domänen (Abbildung 40) könnten auf die

Dimerisierung der G-Domänen zurückzuführen sein. Deshalb ist anzunehmen, dass sich die tatsächliche Dimerstruktur möglicherweise von der in der Abbildung 39 gezeigten unterscheidet. Da im Wildtyp-Protein die Helices $\alpha 3'$ und $\alpha 4'$ den Kontakt zwischen der GTPase-Domäne und den C-terminalen Helices $\alpha 12$ und $\alpha 13$ herstellen, könnte hier eine Konformationsänderung von der G-Domäne auf die helikale Domäne übertragen werden. Für die exakte Darstellung der Struktur des Dimers, muss somit der Einfluss, den die Helices $\alpha 3'$ und $\alpha 4'$ auf die Helices $\alpha 12$ und $\alpha 13$ haben, geklärt werden. Eine weitere Möglichkeit ist, dass diese Konformationsänderung durch das Fehlen der helikalen Domäne verursacht wird, und somit die Helices $\alpha 3'$ und $\alpha 4'$ mehr Freiheitsgrade zur Verfügung haben.

Die Analyse der sekundären Interaktion, die zur Bildung eines Tetramers führt und die durch die helikale Domäne vermittelt wird, erfolgte als Teil der Diplomarbeit von Adrian Syguda²⁸⁶. Durch seine Untersuchungen konnte auf eine parallele Anordnung der Interaktionspartner geschlossen werden. Die Dimerisierung der helikalen Domäne $\alpha 12$ -13 erfolgt dabei über eine Interaktion der beiden Helices $\alpha 12$.

Mit weiteren Untersuchungen wird zu klären sein, ob die Dimerisierung der helikalen Domäne $\alpha 7$ -13 nach dem gleichen Schema erfolgt und wie die Interaktion der helikalen Domäne im Tetramer aussieht. Dabei muss insbesondere untersucht werden, wie sich die Nukleotidbindung und die Strukturänderung in der G-Domäne auswirken.

4.4 GTP- Hydrolyse im kovalent verknüpftem hGBP1

Die Hydrolyse von GTP wird von der Bildung höherer Ordnungsstrukturen beschleunigt. Diese Kooperativität sollte anhand von kovalent verknüpftem hGBP1 untersucht werden.

Jedoch führte die Behandlung der Proteine mit „Cross-Linkern“ zu einer stark reduzierten GTP-Hydrolyse-Aktivität. Daher war es leider nicht möglich, gezielt die Hydrolyse-Aktivität von Dimeren oder anderen Proteinkomplexen zu analysieren. Dies geht wahrscheinlich auf eine Beschädigung der Nukleotidbindungstasche durch die chemische Modifikation zurück.

Eine Modifikation der Nukleotidbindungstasche erklärt auch die unterschiedliche Effektivität bei der Verknüpfung der isolierten helikalen Domänen $\alpha 7$ -13 bzw. $\alpha 12$ -13 im Vergleich zum Wildtyp-Protein bzw. der isolierten G-Domäne. Die isolierten helikalen Domänen $\alpha 7$ -13 und $\alpha 12$ -13 werden fast vollständig verknüpft. Beim Wildtyp-Protein und der isolierten G-Domäne wird nur ein Teil des in die Reaktion eingesetzten Proteins verknüpft. Das kann dadurch erklärt werden, dass es eine Konkurrenzreaktion gibt zwischen der Bindung des Nukleotids und der Modifikation der Aminosäuren der Nukleotidbin-

dungstasche durch die Cross-linker Agenzien. Nach der Modifikation der Bindungstasche werden die Nukleotide nicht mehr gebunden und damit werden auch keine Protein-Protein-Komplexe mehr gebildet.

4.5 Die helikale Domäne stabilisiert die G-Domäne

Die Funktion der helikalen Domäne besteht nicht nur aus ihrem Beitrag zur Selbst-Assemblierung. Ein weiterer Beitrag besteht aus der Stabilisierung der Struktur von hGBP1. Die Stabilität der Struktur wurde sowohl mit Hilfe der CD-Spektroskopie als auch mit der Differential Scanning Kalorimetrie (DSC) untersucht. Dazu wurde die Schmelztemperatur T_m bestimmt, bei der die Hälfte des Proteins entfaltet ist.

	CD-Spektroskopie (T_m) in [°C]	DSC (T_m) in [°C]
Wildtyp	46	48,4
G-Domäne	35	~35,0
α7-13	41	47,2
α7-11	33	45,7
α12	<< 30	<< 30,0
α12-13	30	34,6

Tabelle 20: Vergleich der Schmelztemperaturen des Wildtyp-Proteins und der isolierten Domänen.

Mit Ausnahme der helikalen Domäne α 7-11 wurden mit beiden Methoden gut übereinstimmende Schmelztemperaturen erhalten. Die Differential Scanning Kalorimetrie ist dabei die wesentlich präzisere Messmethode, da bei ihr eine genauere Kontrolle der Messtemperatur möglich ist.

Die DSC-Messungen zeigen, dass sich die Schmelztemperaturen der helikalen Subdomänen (α 7-11 bzw. α 12-13) deutlich unterscheiden. Die Schmelztemperaturen der helikalen Domänen α 7-11 und α 7-13 sind fast identisch. Dagegen sind die Schmelztemperaturen der helikalen Domänen α 12-13 und α 12 deutlich niedriger. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Stabilität der helikalen Domänen α 7-13 vor allen auf den Helices α 7-11 beruht. Zusätzlich zeigen die Daten, dass die Schmelztemperatur der helikalen Domäne α 7-13 fast identisch ist mit der Schmelztemperatur des Wildtyp-Proteins.

Mit ungefähr 35 °C ist die Schmelztemperatur der isolierten G-Domäne deutlich niedriger als die des Wildtyp-Proteins mit 48,4 °C. Anders als bei den helikalen Domänen verläuft die Entfaltung der G-Domäne wie die des Wildtyp-Proteins irreversibel. Die irreversible Entfaltung des Wildtyp-Proteins ist damit auf die G-Domäne zurückzuführen, die während ihrer Entfaltung aggregiert.

Da bei einer physiologischen Temperatur von 35 °C die G-Domäne zur Hälfte entfaltet ist, hat die helikalen Domäne - speziell die Helices α 7-11 – die Funktion, die Struktur des Proteins zu stabilisieren.

4.6 Gibt es einen Interaktionspartner von hGBP1?

Zu den bisher nicht geklärten Fragen gehört die Funktion von hGBP1. In Zellkulturen ist sowohl ein antiviraler als auch ein anti-proliferativer Effekt nachweisbar^{31,212}. Bei dem antiproliferativen Effekt inhibiert die Expression von hGBP1 die Expression der Matrix Metalloproteinase-1²²⁷. Es ist jedoch nicht bekannt, ob hGBP1 dabei mit anderen Proteinen interagiert.

Mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems sollten mögliche Interaktionspartner von hGBP1 gefunden werden. Bei der Analyse einer cDNA-Bank wurden keine Interaktionspartner gefunden. Für dieses Ergebnis gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Eine mögliche Erklärung ist, dass die cDNA der Interaktionspartner nicht in der cDNA-Bank vorhanden ist. Dabei könnte es sich um Proteine handeln, bei denen die Transkription der mRNA erst induziert werden muss, z.B. durch Interferon- γ . Aus diesem Grund sollten für weitere Experimente mit dem Zwei-Hybrid-System eine induzierte cDNA-Bank verwendet werden.

Die nachgewiesenen antiviralen Eigenschaften könnten darauf zurückzuführen sein, dass hGBP1 mit einem oder mehreren Virusproteinen interagiert. Eine solche Interaktion konnte für das humane MxA nachgewiesen werden. Es blockiert den Import der Virenhüllproteine des Thogoto Virus in den Kern¹⁸⁴. Ein solcher Interaktionspartner kann nur durch die Analyse von viralen cDNA-Banken identifiziert werden.

Sowohl für MxA als auch für Dynamin ist eine Interaktion mit verschiedenen Proteinen aus dem Sumoylierungssystem nachweisbar^{176,287}. Da es Hinweise auf eine Lokalisation von hGBP1 in den Kernkörperchen gibt, wurde die Interaktion von hGBP1 mit verschiedenen Kernkörperproteinen untersucht. Es konnte jedoch für keines der getesteten Proteine eine starke Interaktion nachgewiesen werden.

5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die biochemische und biophysikalische Charakterisierung der Selbst-Assemblierung des humanen Guanylat-bindenden Proteins 1. Dazu wurde der Beitrag verschiedener Aminosäuren sowie der G-Domäne und speziell der helikalen Domäne von hGBP1 untersucht.

In einer vorangegangenen Arbeit wurde die Struktur des Wildtyp-Proteins von hGBP1 mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt, anhand derer zwei mögliche Strukturen für das Dimer vorgeschlagen wurden. In dieser Arbeit konnte mit dem Hefe 2-Hybrid-System gezeigt werden, dass es die in dem ersten Modell vorgeschlagene Interaktion zwischen der G-Domäne und der helikalen Domäne nicht gibt. Die in dem zweiten Modell angenommene Interaktion zwischen den G-Domänen konnte mit dem 2-Hybrid-System, mit der analytischen Größenausschlusschromatographie und durch die kovalente Verknüpfung mit chemischen Cross Linkern experimentell bestätigt werden.

Zusätzlich zu der Selbst-Assemblierung der isolierten G-Domäne konnte mit dem 2-Hybrid-System gezeigt werden, dass es auch eine bisher unbekannte Selbst-Assemblierung der isolierten helikalen Domäne ($\alpha 7-13$) gibt. Da es bisher keine Hinweise auf eine Selbst-Assemblierung über die helikalen Domäne gab, wurde diese mit weiteren Methoden näher untersucht. Die Selbst-Assemblierung der helikalen Domäne ($\alpha 7-13$) kann mit der Größenausschlusschromatographie, der Dynamischen Lichtstreuung und durch die kovalente Verknüpfung mit chemischen Cross Linkern nachgewiesen werden. Die helikale Domäne ($\alpha 7-13$) wird in zwei Subdomänen unterteilt, die aus den Helices $\alpha 7-11$ bzw. $\alpha 12-13$ bestehen. Die Analyse der Subdomänen mit den genannten Methoden zeigt eindeutig eine Selbst-Assemblierung der Subdomäne $\alpha 12-13$. Für die Subdomäne $\alpha 7-11$ war keine eindeutige Interaktion nachweisbar. Damit konnte gezeigt werden, dass die Selbst-Assemblierung der helikalen Domäne $\alpha 7-13$ auf der Interaktion der Helices $\alpha 12-13$ beruht.

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie und der Differential Scanning Kalorimetrie wurde die thermische Stabilität des Wildtyp-Proteins und der isolierten Domänen untersucht. Die Schmelztemperatur des Wildtyp-Proteins wurde mit 48 °C und die der isolierten G-Domäne mit ungefähr 35 °C bestimmt. Bei beiden Proteinen verlief die Entfaltung irreversibel. Für die isolierte helikale Domäne $\alpha 7-13$ wurde eine Schmelztemperatur von 47 °C und für die Subdomäne $\alpha 7-11$ von 45 °C bestimmt. Die Subdomäne $\alpha 12-13$ hat mit 35 °C eine deutlich niedrigere Schmelztemperatur. Im Unterschied zu der G-Domäne verläuft die Entfaltung der helikalen Domänen reversibel, so dass sie einer genaueren thermodynamischen Analyse zugänglich ist. Für die Subdomäne $\alpha 12-13$ konnte mit Hilfe der Differential Scanning Kalorimetrie gezeigt werden, dass es bei Temperaturerhöhung neben der Entfaltung auch zu einer Dissoziation eines homodimeren Proteinkomplexes kommt. Damit kann auch mit der Differential Scanning Kalorimetrie die Dimerisierung der Subdomäne $\alpha 12-13$ nachgewiesen werden, während dies aus technischen Gründen (irreversible Entfaltung und Präzipitation bei höheren Temperaturen) für die G-Domäne nicht gelingen konnte.

Mit Hilfe der Isothermen Titrationskalorimetrie wurden die Dissoziationskonstanten (K_D) der isolierten helikalen Domäne $\alpha 7-13$ mit $100 \mu\text{M}$ und der Subdomäne $\alpha 12-13$ mit $4,7 \mu\text{M}$ bestimmt. Diese relativ schwache Assoziation über die helikalen Domänen ist nicht ausreichend, damit das Wildtyp-Protein im nukleotidfreien Zustand dimerisiert. Außerdem bedeuten diese Ergebnisse, dass es im Wildtyp-Protein zu einer gewissen Strukturänderung kommen muss, damit der Bereich $\alpha 12-13$ so stark beitragen kann, wie es hier für die isolierte Domäne beobachtet wird. Das Wildtyp-Protein von hGBP1 bildet im nukleotidgebundenen Zustand nicht nur Dimere sondern auch Tetramere. Im Unterschied zum Wildtyp-Protein können für die isolierte G-Domäne vorwiegend Dimere nachgewiesen werden. Die nachweisbare Tetramerisierung des Wildtyp-Proteins ist darauf zurückzuführen, dass zusätzlich zu der Interaktion der G-Domäne auch die helikalen Domänen interagieren. Die schwache Assoziation der helikalen Domäne summiert sich mit der Assoziation der G-Domäne und führt so zu einer stärkeren Interaktion durch die das Tetramer stabilisiert wird.

Interessante Schlussfolgerungen konnten auch aus den Experimenten mit Punktmutanten gewonnen werden. Es zeigte sich, dass die GTP-Bindung auch in Hefezellen notwendig ist, damit hGBP1 Homodimere bilden kann (siehe K51A und D184N), und dass die Blockade der GTP-Hydrolyse (siehe R48A) in ihrer Auswirkung auf die Dimerisierung einen noch nicht geklärten Widerspruch zwischen der G-Domäne und dem vollständigen Protein ergibt. Zudem wurde mit Hilfe des Hefe 2-Hybrid Systems erkennbar, dass die Farnesylierung die Dimerisierung verstärkt.

Zwei geplante Projekte dieser Arbeit führten nicht zum Erfolg. Zum einen gelang es nicht, GTP-Hydrolyse und Nukleotidbindung in dauerhaft verknüpften hGBP1 Dimeren zu untersuchen. Offenbar haben die chemischen Cross-link Agentien Aminosäureseitenketten in der Nukleotidbindungstasche modifiziert. Zum anderen konnte im Hefe Zwei-Hybrid Screen kein Interaktionspartner für hGBP1 identifiziert werden. Vermutlich sind diese unter den anderen Proteinen zu suchen, deren Synthese wie hGBP1 auch erst durch Interferon induziert wird. Daher wäre eine Genbank aus stimulierten Zellen zu erstellen und für einen erneuten Screen zu verwenden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war.

Diese Arbeit zeigt, dass biochemische und biophysikalische Untersuchungen wichtige Informationen in Ergänzung zu den Strukturbildern eines Proteins liefern. Diese Informationen können aus Röntgenstrukturanalysen nicht gewonnen werden, da diese nur ein statisches Bild liefern. Deswegen sind hoch dynamische Prozesse wie die GTP-Hydrolyse oder die Selbst-Assemblierung einiger Proteine mit der Röntgenstrukturanalyse nicht zu erfassen, da sie in dieser Form nicht kristallisieren.

Die aus den Helices $\alpha 7-13$ bestehende helikale Domäne von hGBP1 liefert einen Beitrag zur Selbst-Assemblierung des Proteins. Wie weit dieser durch Nukleotidbindung und eine entsprechende Strukturänderung in der G-Domäne kontrolliert wird und zur biologischen Funktion von hGBP1 beiträgt, muss in weiteren Experimenten geklärt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Casadevall,A. & Pirofski,L.A. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.* **67**, 3703-3713 (1999).
2. Casadevall,A. & Pirofski,L.A. Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect. Immun.* **68**, 6511-6518 (2000).
3. Casadevall,A. & Pirofski,L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J. Infect. Dis.* **184**, 337-344 (2001).
4. van Baalen,M. Coevolution of recovery ability and virulence. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **265**, 317-325 (1998).
5. Dupas,S., Carton,Y. & Poirie,M. Genetic dimension of the coevolution of virulence-resistance in Drosophila - parasitoid wasp relationships. *Heredity* **90**, 84-89 (2003).
6. Lara-Tejero,M. & Galan,J.E. Cytolethal distending toxin: limited damage as a strategy to modulate cellular functions. *Trends Microbiol.* **10**, 147-152 (2002).
7. Thrall,P.H. & Burdon,J.J. Evolution of virulence in a plant host-pathogen metapopulation. *Science* **299**, 1735-1737 (2003).
8. Hoffmann,J.A., Kafatos,F.C., Janeway,C.A. & Ezekowitz,R.A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313-1318 (1999).
9. Janeway,C.A., Jr. & Medzhitov,R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**:197-216., 197-216 (2002).
10. Ploegh,H.L. Viral strategies of immune evasion. *Science* **280**, 248-253 (1998).
11. Janeway,C.A., Jr. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 7461-7468 (2001).
12. O'Shea,J.J., Ma,A. & Lipsky,P. Cytokines and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 37-45 (2002).
13. Spriggs,M.K. Virus-encoded modulators of cytokines and growth factors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **10**, 1-4 (1999).
14. Candotti,F., Notarangelo,L., Visconti,R. & O'Shea,J. Molecular aspects of primary immunodeficiencies: lessons from cytokine and other signaling pathways. *J. Clin. Invest* **109**, 1261-1269 (2002).
15. Liew,F.Y. T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 55-60 (2002).
16. Pestka,S., Langer,J.A., Zoon,K.C. & Samuel,C.E. Interferons and their actions. *Annu. Rev. Biochem.* **56**:727-77., 727-777 (1987).
17. Boehm,U., Klamp,T., Groot,M. & Howard,J.C. Cellular responses to interferon-gamma [Review]. *Annual Review of Immunology* **15**, 749-795 (1997).
18. Goodbourn,S., Didcock,L. & Randall,R.E. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* **81**, 2341-2364 (2000).
19. Barchet,W. *et al.* Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo. *J. Exp. Med.* **195**, 507-516 (2002).
20. Dalod,M. *et al.* Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J. Exp. Med.* **195**, 517-528 (2002).

21. Levy, D.E. Whence interferon? Variety in the production of interferon in response to viral infection. *J. Exp. Med.* **195**, F15-F18 (2002).
22. Boehm, U. *et al.* Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-gamma. *Journal of Immunology* **161**, 6715-6723 (1998).
23. Murray, H.W. The interferons, macrophage activation, and host defense against nonviral pathogens. *J. Interferon Res.* **12**, 319-322 (1992).
24. O'Shea, J.J., Ma, A. & Lipsky, P. Cytokines and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 37-45 (2002).
25. Schindler, C. & Darnell, J.E., Jr. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **64:621-51.**, 621-651 (1995).
26. Decker, T., Stockinger, S., Karaghiosoff, M., Muller, M. & Kovarik, P. IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J. Clin. Invest* **109**, 1271-1277 (2002).
27. Lau, J.F. & Horvath, C.M. Mechanisms of Type I interferon cell signaling and STAT-mediated transcriptional responses. *Mt. Sinai J. Med.* **69**, 156-168 (2002).
28. Levy, D.E. & Darnell, J.E., Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 651-662 (2002).
29. Samuel, C.E. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 778-809, table (2001).
30. Haller, O. & Kochs, G. Interferon-induced mx proteins: Dynamin-like GTPases with antiviral activity [Review]. *Traffic* **3**, 710-717 (2002).
31. Anderson, S.L., Carton, J.M., Lou, J., Xing, L. & Rubin, B.Y. Interferon-induced guanylate binding protein-1 (GBP-1) mediates an antiviral effect against vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus. *Virology* **256**, 8-14 (1999).
32. Bourne, H.R., Sanders, D.A. & McCormick, F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**, 125-132 (1990).
33. Bourne, H.R., Sanders, D.A. & McCormick, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**, 117-127 (1991).
34. Saraste, M., Sibbald, P.R. & Wittinghofer, A. The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 430-434 (1990).
35. Walker, J.E., Saraste, M. & Runswick, M.J. & N.J. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**, 945-951 (1982).
36. Nassar, N. *et al.* The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue. *Nature* **375**, 554-560 (1995).
37. Hilgenfeld, R. Regulatory GTPases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 810-817 (1995).
38. Pai, E.F., Kabsch, W., Krengel, U., Holmes, K.C. & John, J. & W.A. Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* **341**, 209-214 (1989).
39. Schlichting, I. *et al.* Time-resolved X-ray crystallographic study of the conformational change in Ha-Ras p21 protein on GTP hydrolysis. *Nature* **345**, 309-315 (1990).
40. Vetter, I.R. & Wittinghofer, A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**, 1299-1304 (2001).
41. Rensland, H. *et al.* Substrate and product structural requirements for binding of nucleotides to H-ras p21: the mechanism of discrimination between guanosine and adenosine nucleotides. *Biochemistry* **34**, 593-599 (1995).

42. Milburn, M.V. *et al.* Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* **247**, 939-945 (1990).
 43. Pai, E.F. *et al.* Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J.* **9**, 2351-2359 (1990).
 44. Wei, Y. *et al.* Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 699-703 (1997).
 45. Ostermeier, C. & Brunger, A.T. Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A. *Cell* **96**, 363-374 (1999).
 46. Amor, J.C., Harrison, D.H., Kahn, R.A. & Ringe, D. Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP. *Nature* **372**, 704-708 (1994).
 47. Coleman, D.E. *et al.* Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science* **265**, 1405-1412 (1994).
 48. Noel, J.P., Hamm, H.E. & Sigler, P.B. The 2.2 Å crystal structure of transducin-alpha complexed with GTP gamma S. *Nature* **366**, 654-663 (1993).
 49. la Cour, T.F., Nyborg, J., Thirup, S. & Clark, B.F. Structural details of the binding of guanosine diphosphate to elongation factor Tu from *E. coli* as studied by X-ray crystallography. *EMBO J.* **4**, 2385-2388 (1985).
 50. Prakash, B., Praefcke, G.J.K., Renault, L., Wittinghofer, A. & Herrmann, C. Structure of human guanylate-binding protein 1 representing a unique class of GTP-binding proteins. *Nature* **403**, 567-571 (2000).
 51. Freymann, D.M., Keenan, R.J., Stroud, R.M. & Walter, P. Structure of the conserved GTPase domain of the signal recognition particle. *Nature* **385**, 361-364 (1997).
 52. Montoya, G., Kaat, K., Moll, R., Schafer, G. & Sinning, I. The crystal structure of the conserved GTPase of SRP54 from the archaeon *Acidianus ambivalens* and its comparison with related structures suggests a model for the SRP-SRP receptor complex. *Structure. Fold. Des* **8**, 515-525 (2000).
 53. van der Blik, A.M. Functional diversity in the dynamin family. *Trends in Cell Biology* **9**, 96-102 (1999).
 54. Danino, D. & Hinshaw, J.E. Dynamin family of mechanoenzymes [Review]. *Current Opinion in Cell Biology* **13**, 454-460 (2001).
 55. Muhlberg, A.B., Warnock, D.E. & Schmid, S.L. Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase. *EMBO J.* **16**, 6676-6683 (1997).
 56. Sever, S., Muhlberg, A.B. & Schmid, S.L. Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature* **398**, 481-486 (1999).
 57. Praefcke, G.J.K. Das humane Guanylat-bindende Protein 1: Modell oder Sonderfall der Dynamin-verwandten GTP-bindenden Proteine. 2001. Ruhr-Universität Bochum.
- Ref Type: Thesis/Dissertation
58. Song, B.D. & Schmid, S.L. A molecular motor or a regulator? Dynamin's in a class of its own. *Biochemistry* **42**, 1369-1376 (2003).
 59. Paschal, B.M., Shpetner, H.S. & Vallee, R.B. MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. *J. Cell Biol.* **105**, 1273-1282 (1987).
 60. Shpetner, H.S. & Vallee, R.B. Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell* **59**, 421-432 (1989).
 61. Noda, Y., Nakata, T. & Hirokawa, N. Localization of dynamin: widespread distribution in mature neurons and association with membranous organelles. *Neuroscience* **55**, 113-127 (1993).
 62. Scaife, R. & Margolis, R.L. Biochemical and immunochemical analysis of rat brain dynamin interaction with microtubules and organelles in vivo and in vitro. *J. Cell Biol.* **111**, 3023-3033 (1990).

63. Urrutia,R., Henley,J.R., Cook,T. & McNiven,M.A. The dynamins: redundant or distinct functions for an expanding family of related GTPases? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 377-384 (1997).
64. Cao,H., Garcia,F. & McNiven,M.A. Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* **9**, 2595-2609 (1998).
65. Cook,T., Mesa,K. & Urrutia,R. Three dynamin-encoding genes are differentially expressed in developing rat brain. *J. Neurochem.* **67**, 927-931 (1996).
66. Warnock,D.E. & Schmid,S.L. Dynamin GTPase, a force-generating molecular switch. *Bioessays* **18**, 885-893 (1996).
67. Binns,D.D. *et al.* Correlation between self-association modes and GTPase activation of dynamin. *Journal of Protein Chemistry* **18**, 277-290 (1999).
68. Hinshaw,J.E. & Schmid,S.L. Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* **374**, 190-192 (1995).
69. Carr,J.F. & Hinshaw,J.E. Dynamin assembles into spirals under physiological salt conditions upon the addition of gdp and gamma-phosphate analogues. *J. Biol. Chem.* **272**, 28030-28035 (1997).
70. Tuma,P.L. & Collins,C.A. Activation of dynamin GTPase is a result of positive cooperativity. *J. Biol. Chem.* **269**, 30842-30847 (1994).
71. Warnock,D.E., Terlecky,L.J. & Schmid,S.L. Dynamin GTPase is stimulated by crosslinking through the C-terminal proline-rich domain. *EMBO J.* **14**, 1322-1328 (1995).
72. Warnock,D.E., Hinshaw,J.E. & Schmid,S.L. Dynamin self-assembly stimulates its gtpase activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 22310-22314 (1996).
73. Niemann,H.H., Knetsch,M.L., Scherer,A., Manstein,D.J. & Kull,F.J. Crystal structure of a dynamin GTPase domain in both nucleotide-free and GDP-bound forms. *EMBO J.* **20**, 5813-5821 (2001).
74. Okamoto,P.M., Tripet,B., Litowski,J., Hodges,R.S. & Vallee,R.B. Multiple distinct coiled-coils are involved in dynamin self-assembly. *J. Biol. Chem.* **274**, 10277-10286 (1999).
75. Smirnova,E., Shurland,D.L., Newman-Smith,E.D., Pishvae,B. & van der Blik,A.M. A model for dynamin self-assembly based on binding between three different protein domains. *J. Biol. Chem.* **274**, 14942-14947 (1999).
76. Klein,D.E., Lee,A., Frank,D.W., Marks,M.S. & Lemmon,M.A. The pleckstrin homology domains of dynamin isoforms require oligomerization for high affinity phosphoinositide binding. *J. Biol. Chem.* **273**, 27725-27733 (1998).
77. Salim,K. *et al.* Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J.* **15**, 6241-6250 (1996).
78. Zheng,J. *et al.* Identification of the binding site for acidic phospholipids on the pH domain of dynamin: implications for stimulation of GTPase activity. *J. Mol. Biol.* **255**, 14-21 (1996).
79. Lee,A., Frank,D.W., Marks,M.S. & Lemmon,M.A. Dominant-negative inhibition of receptor-mediated endocytosis by a dynamin-1 mutant with a defective pleckstrin homology domain. *Curr. Biol.* **9**, 261-264 (1999).
80. Vallis,Y., Wigge,P., Marks,B., Evans,P.R. & McMahon,H.T. Importance of the pleckstrin homology domain of dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Curr. Biol.* **9**, 257-260 (1999).
81. David,C., McPherson,P.S., Mundigl,O. & De Camilli,P. A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 331-335 (1996).
82. Gout,I. *et al.* The GTPase dynamin binds to and is activated by a subset of SH3 domains. *Cell* **75**, 25-36 (1993).

83. Herskovits, J.S., Shpetner, H.S., Burgess, C.C. & Vallee, R.B. Microtubules and Src homology 3 domains stimulate the dynamin GTPase via its C-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 11468-11472 (1993).
84. Rasmussen, R.K. *et al.* Mixed-lineage kinase 2-SH3 domain binds dynamin and greatly enhances activation of GTPase by phospholipid. *Biochem. J.* **335**, 119-124 (1998).
85. Ringstad, N., Nemoto, Y. & De Camilli, P. The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptotagmin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 8569-8574 (1997).
86. Seedorf, K. *et al.* Dynamin binds to SH3 domains of phospholipase C gamma and GRB-2. *J. Biol. Chem.* **269**, 16009-16014 (1994).
87. Shpetner, H.S., Herskovits, J.S. & Vallee, R.B. A binding site for SH3 domains targets dynamin to coated pits. *J. Biol. Chem.* **271**, 13-16 (1996).
88. McPherson, P.S. Regulatory role of SH3 domain-mediated protein-protein interactions in synaptic vesicle endocytosis. *Cell Signal.* **11**, 229-238 (1999).
89. Shupliakov, O. *et al.* Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science* **276**, 259-263 (1997).
90. Barylko, B. *et al.* Synergistic activation of dynamin GTPase by Grb2 and phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* **273**, 3791-3797 (1998).
91. Chen, M.S. *et al.* Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a Drosophila gene involved in endocytosis. *Nature* **351**, 583-586 (1991).
92. van der Bliek, A.M. & Meyerowitz, E.M. Dynamin-like protein encoded by the Drosophila shibire gene associated with vesicular traffic. *Nature* **351**, 411-414 (1991).
93. Grigliatti, T.A., Hall, L., Rosenbluth, R. & Suzuki, D.T. Temperature-sensitive mutations in Drosophila melanogaster. XIV. A selection of immobile adults. *Mol. Gen. Genet.* **120**, 107-114 (1973).
94. Koenig, J.H. & Ikeda, K. Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockage of membrane retrieval. *J. Neurosci.* **9**, 3844-3860 (1989).
95. Kosaka, T. & Ikeda, K. Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of Drosophila melanogaster, shibirets1. *J. Cell Biol.* **97**, 499-507 (1983).
96. Kosaka, T. & Ikeda, K. Possible temperature-dependent blockage of synaptic vesicle recycling induced by a single gene mutation in Drosophila. *J. Neurobiol.* **14**, 207-225 (1983).
97. Damke, H., Baba, T., Warnock, D.E. & Schmid, S.L. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J. Cell Biol.* **127**, 915-934 (1994).
98. Herskovits, J.S., Burgess, C.C., Obar, R.A. & Vallee, R.B. Effects of mutant rat dynamin on endocytosis. *J. Cell Biol.* **122**, 565-578 (1993).
99. van der Bliek, A.M. *et al.* Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J. Cell Biol.* **122**, 553-563 (1993).
100. Takei, K., McPherson, P.S., Schmid, S.L. & De Camilli, P. Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature* **374**, 186-190 (1995).
101. Wigge, P., Vallis, Y. & McMahon, H.T. Inhibition of receptor-mediated endocytosis by the amphiphysin SH3 domain. *Curr. Biol.* **7**, 554-560 (1997).
102. Sweitzer, S.M. & Hinshaw, J.E. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* **93**, 1021-1029 (1998).
103. Zhang, P.J. & Hinshaw, J.E. Three-dimensional reconstruction of dynamin in the constricted state. *Nature Cell Biology* **3**, 922-926 (2001).

104. Stowell,M.H., Marks,B., Wigge,P. & McMahon,H.T. Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat. Cell Biol.* **1**, 27-32 (1999).
105. Kozlov,M.M. Dynamin: possible mechanism of "Pinchase" action. *Biophys. J.* **77**, 604-616 (1999).
106. Kozlov,M.M. Fission of biological membranes: interplay between dynamin and lipids. *Traffic.* **2**, 51-65 (2001).
107. Burger,K.N., Demel,R.A., Schmid,S.L. & de Kruijff,B. Dynamin is membrane-active: lipid insertion is induced by phosphoinositides and phosphatidic acid. *Biochemistry* **39**, 12485-12493 (2000).
108. Sever,S., Damke,H. & Schmid,S.L. Dynamin : GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Cell Biology* **150**, 1137-1147 (2000).
109. Krishnan,K.S. *et al.* Nucleoside diphosphate kinase, a source of GTP, is required for dynamin-dependent synaptic vesicle recycling. *Neuron* **30**, 197-210 (2001).
110. Baillat,G., Gaillard,S., Castets,F. & Monneron,A. Interactions of phocein with nucleoside-diphosphate kinase, Eps15, and Dynamin I. *J. Biol. Chem.* **277**, 18961-18966 (2002).
111. Narayanan,R. & Ramaswami,M. Regulation of dynamin by nucleoside diphosphate kinase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **35**, 49-55 (2003).
112. Marks,B. *et al.* GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature* **410**, 231-235 (2001).
113. Rothman,J.H., Raymond,C.K., Gilbert,T., O'Hara,P.J. & Stevens,T.H. A putative GTP binding protein homologous to interferon-inducible Mx proteins performs an essential function in yeast protein sorting. *Cell* **61**, 1063-1074 (1990).
114. Clark,S.G., Shurland,D.L., Meyerowitz,E.M., Bargmann,C.I. & van der Bliek,A.M. A dynamin GTPase mutation causes a rapid and reversible temperature-inducible locomotion defect in *C. elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 10438-10443 (1997).
115. Gammie,A.E., Kurihara,L.J., Vallee,R.B. & Rose,M.D. DNM1, a dynamin-related gene, participates in endosomal trafficking in yeast. *J. Cell Biol.* **130**, 553-566 (1995).
116. Imoto,M., Tachibana,I. & Urrutia,R. Identification and functional characterization of a novel human protein highly related to the yeast dynamin-like GTPase Vps1p. *J. Cell Sci.* **111**, 1341-1349 (1998).
117. Smirnova,E., Shurland,D.L., Ryazantsev,S.N. & van der Bliek,A.M. A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J. Cell Biol.* **19**;143, 351-358 (1998).
118. Yoon,Y., Pitts,K.R., Dahan,S. & McNiven,M.A. A novel dynamin-like protein associates with cytoplasmic vesicles and tubules of the endoplasmic reticulum in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **140**, 779-793 (1998).
119. Jones,B.A. & Fangman,W.L. Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev.* **6**, 380-389 (1992).
120. Pelloquin,L., Belenguer,P., Menon,Y. & Ducommun,B. Identification of a fission yeast dynamin-related protein involved in mitochondrial DNA maintenance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**, 720-726 (1998).
121. Pelloquin,L., Belenguer,P., Menon,Y., Gas,N. & Ducommun,B. Fission yeast Msp1 is a mitochondrial dynamin-related protein. *J. Cell Sci.* **112**, 4151-4161 (1999).
122. Alexander,C. *et al.* OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat. Genet.* **26**, 211-215 (2000).
123. Delettre,C. *et al.* Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat. Genet.* **26**, 207-210 (2000).
124. Gu,X. & Verma,D.P. Phragmoplastin, a dynamin-like protein associated with cell plate formation in plants. *EMBO J.* **15**, 695-704 (1996).

125. Gu,X. & Verma,D.P. Dynamics of phragmoplastin in living cells during cell plate formation and uncoupling of cell elongation from the plane of cell division. *Plant Cell* **9**, 157-169 (1997).
126. Kang,S.G. *et al.* Molecular cloning of an Arabidopsis cDNA encoding a dynamin-like protein that is localized to plastids. *Plant Mol. Biol.* **38**, 437-447 (1998).
127. Park,J.M. *et al.* A dynamin-like protein, ADL1, is present in membranes as a high-molecular-mass complex in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol* **115**, 763-771 (1997).
128. Park,J.M. *et al.* A dynamin-like protein in Arabidopsis thaliana is involved in biogenesis of thylakoid membranes. *EMBO J.* **17**, 859-867 (1998).
129. Staeheli,P., Horisberger,M.A. & Haller,O. Mx-dependent resistance to influenza viruses is induced by mouse interferons alpha and beta but not gamma. *Virology* **132**, 456-461 (1984).
130. Staeheli,P. & Haller,O. Interferon-induced human protein with homology to protein Mx of influenza virus-resistant mice. *Mol. Cell Biol.* **5**, 2150-2153 (1985).
131. Ekena,K., Vater,C.A., Raymond,C.K. & Stevens,T.H. The VPS1 protein is a dynamin-like GTPase required for sorting proteins to the yeast vacuole. *Ciba Found. Symp.* **176:198-211**; **discussion 211-4.**, 198-211 (1993).
132. Vater,C.A., Raymond,C.K., Ekena,K., Howald-Stevenson,I. & Stevens,T.H. The VPS1 protein, a homolog of dynamin required for vacuolar protein sorting in Saccharomyces cerevisiae, is a GTPase with two functionally separable domains. *J. Cell Biol.* **119**, 773-786 (1992).
133. Wilsbach,K. & Payne,G.S. Vps1p, a member of the dynamin GTPase family, is necessary for Golgi membrane protein retention in Saccharomyces cerevisiae. *EMBO J.* **12**, 3049-3059 (1993).
134. Bensen,E.S., Costaguta,G. & Payne,G.S. Synthetic genetic interactions with temperature-sensitive clathrin in Saccharomyces cerevisiae. Roles for synaptojanin-like Inp53p and dynamin-related Vps1p in clathrin-dependent protein sorting at the trans-Golgi network. *Genetics* **154**, 83-97 (2000).
135. Ekena,K. & Stevens,T.H. The Saccharomyces cerevisiae MVP1 gene interacts with VPS1 and is required for vacuolar protein sorting. *Mol. Cell Biol.* **15**, 1671-1678 (1995).
136. Hoepfner,D., van den,B.M., Philippsen,P., Tabak,H.F. & Hettema,E.H. A role for Vps1p, actin, and the Myo2p motor in peroxisome abundance and inheritance in Saccharomyces cerevisiae. *J. Cell Biol.* **155**, 979-990 (2001).
137. Bleazard,W. *et al.* The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat. Cell Biol.* **1**, 298-304 (1999).
138. Otsuga,D. *et al.* The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biol.* **19;143**, 333-349 (1998).
139. Sesaki,H. & Jensen,R.E. Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J. Cell Biol.* **147**, 699-706 (1999).
140. Yaffe,M.P. The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science* **283**, 1493-1497 (1999).
141. Yoon,Y., Pitts,K.R. & McNiven,M.A. Mammalian dynamin-like protein DLP1 tubulates membranes. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2894-2905 (2001).
142. Fukushima,N.H., Brisch,E., Keegan,B.R., Bleazard,W. & Shaw,J.M. The GTPase effector domain sequence of the Dnm1p GTPase regulates self-assembly and controls a rate-limiting step in mitochondrial fission. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2756-2766 (2001).
143. Shin,H.W. *et al.* Intermolecular and interdomain interactions of a dynamin-related GTP-binding protein, Dnm1p/Vps1p-like protein. *J. Biol. Chem.* **274**, 2780-2785 (1999).
144. Shin,H.W., Shinotsuka,C., Torii,S., Murakami,K. & Nakayama,K. Identification and subcellular localization of a novel mammalian dynamin-related protein homologous to yeast Vps1p and Dnm1p. *J. Biochem. (Tokyo)* **122**, 525-530 (1997).

145. Labrousse,A.M., Zappaterra,M.D., Rube,D.A. & van der Blik,A.M. C-elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Molecular Cell* **4**, 815-826 (1999).
146. Mozdy,A.D., McCaffery,J.M. & Shaw,J.M. Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J. Cell Biol.* **151**, 367-380 (2000).
147. Shaw,J.M. & Nunnari,J. Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol.* **12**, 178-184 (2002).
148. Smirnova,E., Griparic,L., Shurland,D.L. & van der Blik,A.M. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2245-2256 (2001).
149. Cerveny,K.L. & Jensen,R.E. The WD-repeats of Net2p interact with Dnm1p and Fis1p to regulate division of mitochondria. *Mol. Biol. Cell* **14**, 4126-4139 (2003).
150. Legesse-Miller,A., Massol,R.H. & Kirchhausen,T. Constriction and dnm1p recruitment are distinct processes in mitochondrial fission. *Mol. Biol. Cell* **14**, 1953-1963 (2003).
151. Koch,A. *et al.* Dynamin-like protein 1 is involved in peroxisomal fission. *J. Biol. Chem.* **278**, 8597-8605 (2003).
152. Shepard,K.A. & Yaffe,M.P. The yeast dynamin-like protein, Mgm1p, functions on the mitochondrial outer membrane to mediate mitochondrial inheritance. *J. Cell Biol.* **144**, 711-720 (1999).
153. Sesaki,H., Southard,S.M., Yaffe,M.P. & Jensen,R.E. Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2342-2356 (2003).
154. Herlan,M., Vogel,F., Bornhovd,C., Neupert,W. & Reichert,A.S. Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J. Biol. Chem.* **278**, 27781-27788 (2003).
155. Wong,E.D. *et al.* The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J. Cell Biol.* **151**, 341-352 (2000).
156. Wong,E.D. *et al.* The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.* **160**, 303-311 (2003).
157. Olichon,A. *et al.* The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett.* **523**, 171-176 (2002).
158. Lopez-Bautista,J.M., Waters,D.A. & Chapman,R.L. Phragmoplastin, green algae and the evolution of cytokinesis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 1715-1718 (2003).
159. Zhang,Z., Hong,Z. & Verma,D.P. Phragmoplastin polymerizes into spiral coiled structures via intermolecular interaction of two self-assembly domains. *J. Biol. Chem.* **275**, 8779-8784 (2000).
160. Gao,H., Kadirjan-Kalbach,D., Froehlich,J.E. & Osteryoung,K.W. ARC5, a cytosolic dynamin-like protein from plants, is part of the chloroplast division machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 4328-4333 (2003).
161. Kim,Y.W. *et al.* Arabidopsis dynamin-like 2 that binds specifically to phosphatidylinositol 4-phosphate assembles into a high-molecular weight complex in vivo and in vitro. *Plant Physiol* **127**, 1243-1255 (2001).
162. Arimura,S. & Tsutsumi,N. A dynamin-like protein (ADL2b), rather than FtsZ, is involved in Arabidopsis mitochondrial division. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 5727-5731 (2002).
163. Mikami,K., Iuchi,S., Yamaguchi-Shinozaki,K. & Shinozaki,K. A novel Arabidopsis thaliana dynamin-like protein containing the pleckstrin homology domain. *J. Exp. Bot.* **51**, 317-318 (2000).
164. Jin,J.B. *et al.* A new dynamin-like protein, ADL6, is involved in trafficking from the trans-Golgi network to the central vacuole in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**, 1511-1526 (2001).
165. Lee,S.H. *et al.* The intermolecular interaction between the PH domain and the C-terminal domain of Arabidopsis dynamin-like 6 determines lipid binding specificity. *J. Biol. Chem.* **277**, 31842-31849 (2002).

166. Charleston,B. & Stewart,H.J. An interferon-induced Mx protein: cDNA sequence and high-level expression in the endometrium of pregnant sheep. *Gene* **137**, 327-331 (1993).
167. Horisberger,M.A. & Gunst,M.C. Interferon-induced proteins: identification of Mx proteins in various mammalian species. *Virology* **180**, 185-190 (1991).
168. Ko,J.H. *et al.* Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken Mx gene. *Genome Res.* **12**, 595-601 (2002).
169. Pavlovic,J., Zurcher,T., Haller,O. & Staeheli,P. Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. *J. Virol.* **64**, 3370-3375 (1990).
170. Staeheli,P., Yu,Y.X., Grob,R. & Haller,O. A double-stranded RNA-inducible fish gene homologous to the murine influenza virus resistance gene Mx. *Mol. Cell Biol.* **9**, 3117-3121 (1989).
171. Arnheiter,H., Skuntz,S., Noteborn,M., Chang,S. & Meier,E. Transgenic mice with intracellular immunity to influenza virus. *Cell* **62**, 51-61 (1990).
172. Hefti,H.P. *et al.* Human MxA protein protects mice lacking a functional alpha/beta interferon system against La crosse virus and other lethal viral infections. *J. Virol.* **73**, 6984-6991 (1999).
173. Pavlovic,J. *et al.* Enhanced virus resistance of transgenic mice expressing the human MxA protein. *J. Virol.* **69**, 4506-4510 (1995).
174. Meier,E., Kunz,G., Haller,O. & Arnheiter,H. Activity of rat Mx proteins against a rhabdovirus. *J. Virol.* **64**, 6263-6269 (1990).
175. Staeheli,P., Haller,O., Boll,W., Lindenmann,J. & Weissmann,C. Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell* **44**, 147-158 (1986).
176. Engelhardt,O.G., Ullrich,E., Kochs,G. & Haller,O. Interferon-induced antiviral Mx1 GTPase is associated with components of the SUMO-1 system and promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Experimental Cell Research* **271**, 286-295 (2001).
177. Zurcher,T., Pavlovic,J. & Staeheli,P. Mouse Mx2 protein inhibits vesicular stomatitis virus but not influenza virus. *Virology* **187**, 796-800 (1992).
178. Schnorr,J.J. *et al.* MxA-dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line. *J. Virol.* **67**, 4760-4768 (1993).
179. Zurcher,T., Pavlovic,J. & Staeheli,P. Mechanism of human MxA protein action: variants with changed antiviral properties. *EMBO J.* **11**, 1657-1661 (1992).
180. Haller,O., Frese,M. & Kochs,G. Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev. Sci. Tech.* **17**, 220-230 (1998).
181. Di Paolo,C., Hefti,H.P., Meli,M., Landis,H. & Pavlovic,J. Intramolecular backfolding of the carboxyl-terminal end of MxA protein is a prerequisite for its oligomerization. *J. Biol. Chem.* **274**, 32071-32078 (1999).
182. Flohr,F., Schneider-Schaulies,S., Haller,O. & Kochs,G. The central interactive region of human MxA GTPase is involved in GTPase activation and interaction with viral target structures. *FEBS Letters* **463**, 24-28 (1999).
183. Kochs,G. & Haller,O. GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (Orthomyxoviridae). *J. Biol. Chem.* **274**, 4370-4376 (1999).
184. Kochs,G. & Haller,O. Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 2082-2086 (1999).
185. Schumacher,B. & Staeheli,P. Domains mediating intramolecular folding and oligomerization of MxA GTPase. *J. Biol. Chem.* **273**, 28365-28370 (1998).

186. Schwemmle, M., Richter, M.F., Herrmann, C., Nassar, N. & Staeheli, P. Unexpected structural requirements for GTPase activity of the interferon-induced MxA protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 13518-13523 (1995).
 187. Janzen, C., Kochs, G. & Haller, O. A monomeric GTPase-negative MxA mutant with antiviral activity. *J. Virol.* **74**, 8202-8206 (2000).
 188. Kochs, G., Haener, M., Aebi, U. & Haller, O. Self-assembly of human MxA GTPase into highly ordered dynamin-like oligomers. *J. Biol. Chem.* **277**, 14172-14176 (2002).
 189. Knight E Jr & Korant, B.D. Fibroblast interferon induces synthesis of four proteins in human fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**, 1824-1827 (1979).
 190. Cheng, Y.S., Colonno, R.J. & Yin, F.H. Interferon induction of fibroblast proteins with guanylate binding activity. *J. Biol. Chem.* **258**, 7746-7750 (1983).
 191. Cheng, Y.S., Becker-Manley, M.F., Chow, T.P. & Horan, D.C. Affinity purification of an interferon-induced human guanylate-binding protein and its characterization. *J. Biol. Chem.* **260**, 15834-15839 (1985).
 192. Carlow, D.A., Teh, S.J. & Teh, H.S. Specific antiviral activity demonstrated by TGTP, a member of a new family of interferon-induced GTPases. *J. Immunol.* **161**, 2348-2355 (1998).
 193. Gilly, M. & Wall, R. The IRG-47 gene is IFN-gamma induced in B cells and encodes a protein with GTP-binding motifs. *J. Immunol.* **148**, 3275-3281 (1992).
 194. Lafuse, W.P., Brown, D., Castle, L. & Zwilling, B.S. Cloning and characterization of a novel cDNA that is IFN-gamma-induced in mouse peritoneal macrophages and encodes a putative GTP-binding protein. *J. Leukoc. Biol.* **57**, 477-483 (1995).
 195. Sorace, J.M., Johnson, R.J., Howard, D.L. & Drysdale, B.E. Identification of an endotoxin and IFN-inducible cDNA: possible identification of a novel protein family. *J. Leukoc. Biol.* **58**, 477-484 (1995).
 196. Taylor, G.A. *et al.* Identification of a novel GTPase, the inducibly expressed GTPase, that accumulates in response to interferon gamma. *J. Biol. Chem.* **271**, 20399-20405 (1996).
 197. Uthaiyah, R.C., Praefcke, G.J., Howard, J.C. & Herrmann, C. IIGP1, an interferon-gamma-inducible 47-kDa GTPase of the mouse, showing cooperative enzymatic activity and GTP-dependent multimerization. *J. Biol. Chem.* **278**, 29336-29343 (2003).
 198. Collazo, C.M. *et al.* Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection. *J. Exp. Med.* **194**, 181-188 (2001).
 199. MacMicking, J.D., Taylor, G.A. & McKinney, J.D. Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science* **302**, 654-659 (2003).
 200. Halonen, S.K., Taylor, G.A. & Weiss, L.M. Gamma interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* in astrocytes is mediated by IGTP. *Infect. Immun.* **69**, 5573-5576 (2001).
 201. Taylor, G.A. *et al.* Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFN-gamma-inducible gene IGTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 751-755 (2000).
 202. Zerrahn, J., Schaible, U.E., Brinkmann, V., Guhlich, U. & Kaufmann, S.H.E. The IFN-inducible Golgi- and endoplasmic reticulum-associated 47-kDa GTPase IIGP is transiently expressed during listeriosis. *Journal of Immunology* **168**, 3428-3436 (2002).
 203. Cheng, Y.S., Patterson, C.E. & Staeheli, P. Interferon-induced guanylate-binding proteins lack an N(T)KXD consensus motif and bind GMP in addition to GDP and GTP. *Mol. Cell Biol.* **11**, 4717-4725 (1991).
 204. Meyerdieks, A. Charakterisierung der Interferon gamma induzierten Gene IFP 35, Nociceptin/QFQ und hGBP3. 1998. Universität Hannover.
- Ref Type: Thesis/Dissertation
205. Zhu, P.P. *et al.* Cellular Localization, Oligomerization, and Membrane Association of the Hereditary Spastic Paraplegia 3A (SPG3A) Protein Atlastin. *J. Biol. Chem.* **278**, 10111-10117 (2003).

206. Vestal,D.J. *et al.* Murine GBP-2: a new IFN-gamma-induced member of the GBP family of GTPases isolated from macrophages. *J. Interferon Cytokine Res.* **18**, 977-985 (1998).
207. Han,B.H., Park,D.J., Lim,R.W., Im,J.H. & Kim,H.D. Cloning, expression, and characterization of a novel guanylate-binding protein, GBP3 in murine erythroid progenitor cells. *Biochim. Biophys. Acta* **191**, 373-386 (1998).
208. Nguyen,T.T., Hu,Y., Widney,D.P., Mar,R.A. & Smith,J.B. Murine GBP-5, a new member of the murine guanylate-binding protein family, is coordinately regulated with other GBPs in vivo and in vitro. *J. Interferon Cytokine Res.* **22**, 899-909 (2002).
209. Wynn,T.A., Nicolet,C.M. & Paulnock,D.M. Identification and characterization of a new gene family induced during macrophage activation. *J. Immunol.* **147**, 4384-4392 (1991).
210. Asundi,V.K., Stahl,R.C., Showalter,L., Conner,K.J. & Carey,D.J. Molecular cloning and characterization of an isoprenylated 67 kDa protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1217**, 257-265 (1994).
211. Schwemmle,M., Kaspers,B., Irion,A., Staeheli,P. & Schultz,U. Chicken guanylate-binding protein. Conservation of GTPase activity and induction by cytokines. *J. Biol. Chem.* **271**, 10304-10308 (1996).
212. Guenzi,E. *et al.* The helical domain of GBP-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation by inflammatory cytokines. *EMBO J.* **20**, 5568-5577 (2001).
213. Lubeseder-Martellato,C. *et al.* Guanylate-binding protein-1 expression is selectively induced by inflammatory cytokines and is an activation marker of endothelial cells during inflammatory diseases. *American Journal of Pathology* **161**, 1749-1759 (2002).
214. Vestal,D.J., Gorbacheva,V.Y. & Sen,G.C. Different subcellular localizations for the related interferon-induced GTPases, MuGBP-1 and MuGBP-2: implications for different functions? *J. Interferon Cytokine Res.* **20**, 991-1000 (2000).
215. Praefcke,G.J.K., Geyer,M., Schwemmle,M., Kalbitzer,H.R. & Herrmann,C. Nucleotide-binding characteristics of human guanylate-binding protein 1 (hGBP1) and identification of the third GTP-binding motif. *Journal of Molecular Biology* **292**, 321-332 (1999).
216. Neun,R., Richter,M.F., Staeheli,P. & Schwemmle,M. GTPase properties of the interferon-induced human guanylate-binding protein 2. *FEBS Lett.* **390**, 69-72 (1996).
217. Schwemmle,M. & Staeheli,P. The interferon-induced 67-kDa guanylate-binding protein (hGBP1) is a GTPase that converts GTP to GMP. *J. Biol. Chem.* **269**, 11299-11305 (1994).
218. Nantais,D.E., Schwemmle,M., Stickney,J.T., Vestal,D.J. & Buss,J.E. Prenylation of an interferon-gamma-induced gtp-binding protein - the human guanylate binding protein, hugbp1. *Journal of Leukocyte Biology* **60**, 423-431 (1996).
219. Stickney,J.T. & Buss,J.E. Murine guanylate-binding protein: incomplete geranylgeranyl isoprenoid modification of an interferon-gamma-inducible guanosine triphosphate-binding protein. *Mol. Biol. Cell* **11**, 2191-2200 (2000).
220. Vestal,D.J. *et al.* Rat p67 GBP is induced by interferon-gamma and isoprenoid-modified in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **224**, 528-534 (1996).
221. Gorbacheva,V.Y., Lindner,D., Sen,G.C. & Vestal,D.J. The interferon (IFN)-induced GTPase, mGBP-2 - Role in IFN-gamma-induced murine fibroblast proliferation. *J. Biol. Chem.* **277**, 6080-6087 (2002).
222. Prochazka,M., Staeheli,P., Holmes,R.S. & Haller,O. Interferon-induced guanylate-binding proteins: mapping of the murine Gbp-1 locus to chromosome 3. *Virology* **145**, 273-279 (1985).
223. Pepper,M.S. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 1104-1117 (2001).
224. Silletti,S., Kessler,T., Goldberg,J., Boger,D.L. & Cheresh,D.A. Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin alpha vbeta 3 by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 119-124 (2001).

225. Egeblad,M. & Werb,Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 161-174 (2002).
226. Daja,M.M., Niu,X., Zhao,Z., Brown,J.M. & Russell,P.J. Characterization of expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **6**, 15-26 (2003).
227. Guenzi,E. *et al.* The guanylate binding protein-1 GTPase controls the invasive and angiogenic capability of endothelial cells through inhibition of MMP-1 expression. *EMBO J.* **22**, 3772-3782 (2003).
228. Virolle,T. *et al.* Egr1 promotes growth and survival of prostate cancer cells. Identification of novel Egr1 target genes. *J. Biol. Chem.* **278**, 11802-11810 (2003).
229. Luan,Z. *et al.* A novel GTP-binding protein hGBP3 interacts with NIK/HGK. *FEBS Lett.* **530**, 233-238 (2002).
230. Kunzelmann,S. Kinetische Untersuchungen zum Mechanismus der GTP-Hydrolyse durch humanes Guanylat-bindendes Protein 1. 2002. Ruhr-Universität Bochum.
- Ref Type: Thesis/Dissertation
231. Prakash,B., Renault,L., Praefcke,G.J.K., Herrmann,C. & Wittinghofer,A. Triphosphate structure of guanylate-binding protein 1 and implications for nucleotide binding and GTPase mechanism. *EMBO J.* **19**, 4555-4564 (2000).
232. Praefcke,G.J. *et al.* Identification of residues in the human guanylate-binding protein 1 critical for nucleotide binding and cooperative GTP hydrolysis. *J. Mol. Biol.* **344**, 257-269 (2004).
233. Mullis,K.B. & Faloona,F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350 (1987).
234. Chung,C.T., Niemela,S.L. & Miller,R.H. One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**, 2172-2175 (1989).
235. Sanger,F. & Coulson,A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **94**, 441-448 (1975).
236. Sanger,F., Nicklen,S. & Coulson,A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**, 5463-5467 (1977).
237. Bartel,P.L. & Fields,S. Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. *Methods Enzymol.* **254**, 241-263 (1995).
238. Fields,S. & Song,O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246 (1989).
239. Schiestl,R.H. & Gietz,R.D. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* **16**, 339-346 (1989).
240. Gill,S.C. & von Hippel,P.H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326 (1989).
241. Laemmli,U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
242. Schagger,H. & von Jagow,G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379 (1987).
243. Johnson,W.C., Jr. Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **17**, 145-166 (1988).
244. Lobley,A., Whitmore,L. & Wallace,B.A. DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics.* **18**, 211-212 (2002).
245. Compton,L.A. & Johnson,W.C., Jr. Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal. Biochem.* **155**, 155-167 (1986).

246. Manavalan,P. & Johnson,W.C., Jr. Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Anal. Biochem.* **167**, 76-85 (1987).
247. Sreerama,N. & Woody,R.W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* **287**, 252-260 (2000).
248. Provencher,S.W. & Glockner,J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* **20**, 33-37 (1981).
249. Sreerama,N., Venyaminov,S.Y. & Woody,R.W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis. *Anal. Biochem.* **287**, 243-251 (2000).
250. Beavis,R.C. & Chait,B.T. Rapid, sensitive analysis of protein mixtures by mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 6873-6877 (1990).
251. Pierce,M.M., Raman,C.S. & Nall,B.T. Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods* **19**, 213-221 (1999).
252. Wiseman,T., Williston,S., Brandts,J.F. & Lin,L.N. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* **179**, 131-137 (1989).
253. Grabarek,Z. & Gergely,J. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Anal. Biochem.* **185**, 131-135 (1990).
254. Kunkel,G.R., Mehrabian,M. & Martinson,H.G. Contact-site cross-linking agents. *Mol. Cell Biochem.* **34**, 3-13 (1981).
255. Staros,J.V., Wright,R.W. & Swingle,D.M. Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Anal. Biochem.* **156**, 220-222 (1986).
256. Lenzen,C., Cool,R.H. & Wittinghofer,A. Analysis of intrinsic and CDC25-stimulated guanine nucleotide exchange of p21ras-nucleotide complexes by fluorescence measurements. *Methods Enzymol.* **255**, 95-109 (1995).
257. Praefcke,G.J. *et al.* Identification of residues in the human guanylate-binding protein 1 critical for nucleotide binding and cooperative GTP hydrolysis. *J. Mol. Biol.* **344**, 257-269 (2004).
258. Estojak,J., Brent,R. & Golemis,E.A. Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements. *Mol. Cell Biol.* **15**, 5820-5829 (1995).
259. Browne,D.T. & Kent,S.B. Formation of non-amidine products in the reaction of primary amines with imido esters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **67**, 126-132 (1975).
260. Davies,G.E. & Stark,G.R. Use of dimethyl suberimidate, a cross-linking reagent, in studying the subunit structure of oligomeric proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **66**, 651-656 (1970).
261. Staros,J.V., Morgan,D.G. & Appling,D.R. A membrane-impermeant, cleavable cross-linker. Dimers of human erythrocyte band 3 subunits cross-linked at the extracytoplasmic membrane face. *J. Biol. Chem.* **256**, 5890-5893 (1981).
262. Coleman,D.E. *et al.* Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science* **265**, 1405-1412 (1994).
263. Rittinger,K., Walker,P.A., Eccleston,J.F., Smerdon,S.J. & Gamblin,S.J. Structure at 1.65 Angstrom of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. *Nature* **389**, 758-762 (1997).
264. Scheffzek,K. *et al.* The ras-rasgap complex - structural basis for gtpase activation and its loss in oncogenic ras mutants. *Science* **277**, 333-338 (1997).
265. Sondek,J., Lambright,D.G., Noel,J.P., Hamm,H.E. & Sigler,P.B. GTPase mechanism of Gproteins from the 1.7-A crystal structure of transducin alpha-GDP-AIF-4. *Nature* **372**, 276-279 (1994).

266. Wang,X., Simpson,J.H. & Nelson,D.J. ¹H and ³¹P NMR study of speciation in systems containing ADP, Al³⁺, and fluoride. *J. Inorg. Biochem.* **58**, 29-47 (1995).
267. Chakrabarti,M.C. & Schwarz,F.P. Thermal stability of PNA/DNA and DNA/DNA duplexes by differential scanning calorimetry. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4801-4806 (1999).
268. Lansbury J.E. & Chowdry,B.Z. Biocalorimetry. John Wiley & Sons, New York (1998).
269. Lassalle,M.W. *et al.* Dimer-to-tetramer transformation: loop excision dramatically alters structure and stability of the ROP four alpha-helix bundle protein. *J. Mol. Biol.* **279**, 987-1000 (1998).
270. Privalov,P.L. Stability of proteins: small globular proteins. *Adv. Protein Chem.* **33**, 167-241 (1979).
271. Privalov,P.L. Stability of proteins. Proteins which do not present a single cooperative system. *Adv. Protein Chem.* **35**, 1-104 (1982).
272. Ladbury J.E. & Chowdry,B.Z. Biocalorimetry. John Wiley & Sons, New York (1998).
273. Engelhardt,O.G., Ullrich,E., Kochs,G. & Haller,O. Interferon-induced antiviral Mx1 GTPase is associated with components of the SUMO-1 system and promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Experimental Cell Research* **271**, 286-295 (2001).
274. Praefcke,G.J. & McMahon,H.T. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 133-147 (2004).
275. Praefcke,G.J. & McMahon,H.T. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 133-147 (2004).
276. Okamoto,P.M., Tripet,B., Litowski,J., Hodges,R.S. & Vallee,R.B. Multiple distinct coiled-coils are involved in dynamin self-assembly. *J. Biol. Chem.* **274**, 10277-10286 (1999).
277. Smirnova,E., Shurland,D.L., Newman-Smith,E.D., Pishvaeae,B. & van der Blik,A.M. A model for dynamin self-assembly based on binding between three different protein domains. *J. Biol. Chem.* **274**, 14942-14947 (1999).
278. Damke,H., Baba,T., Warnock,D.E. & Schmid,S.L. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J. Cell Biol.* **127**, 915-934 (1994).
279. Damke,H., Binns,D.D., Ueda,H., Schmid,S.L. & Baba,T. Dynamin GTPase domain mutants block endocytic vesicle formation at morphologically distinct stages. *Molecular Biology of the Cell* **12**, 2578-2589 (2001).
280. Pitossi,F. *et al.* A functional GTP-binding motif is necessary for antiviral activity of Mx proteins. *Journal of Virology* **67**, 6726-6732 (1993).
281. Sinensky,M. Functional aspects of polyisoprenoid protein substituents: roles in protein-protein interaction and trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* **1529**, 203-209 (2000).
282. Maurer-Stroh,S., Washietl,S. & Eisenhaber,F. Protein prenyltransferases. *Genome Biol.* **4**, 212 (2003).
283. Okamoto,P.M., Tripet,B., Litowski,J., Hodges,R.S. & Vallee,R.B. Multiple distinct coiled-coils are involved in dynamin self-assembly. *J. Biol. Chem.* **274**, 10277-10286 (1999).
284. Zhu,P.P. *et al.* Intra- and intermolecular domain interactions of the C-terminal GTPase effector domain of the multimeric dynamin-like GTPase Drp1. *J. Biol. Chem.* **279**, 35967-35974 (2004).
285. Ghosh,A. Relationship between function and 3D-structure of interferon inducible GTPases . 2004.
Ref Type: Thesis/Dissertation
286. Syguda,A. Strukturelle und biophysikalische Charakterisierung des dimeren hGBP1. 2004.
Ref Type: Thesis/Dissertation
287. Mishra,R.K. *et al.* Dynamin interacts with members of the sumoylation machinery. *J. Biol. Chem.* **279**, 31445-31454 (2004).

288. Studier, F.W. & M.B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* **189**, 113-130 (1986).
289. Gibson, T.J. Studies on the Epstein-Barr virus genome. 1984. University of Cambridge, U.K.
Ref Type: Thesis/Dissertation
290. Bullock, W.O. & Fernandez, J.M. & S.J.M. XL1-BLUE a high efficiency plasmid transforming rec-A Escherichia--Coli strain with beta galactosidase selection. *Biotechniques* **5**, 376-377 (1987).
291. Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M. & Cooper, J.A. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* **74**, 205-214 (1993).

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AlCl ₃	Aluminiumchlorid
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
3-AT	3-Aminotriazol
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
C _p	Wärmekapazität bei konstantem Druck
CD	Circulardichroismus
C _T	totale Proteinkonzentration
d	Schichtdicke
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSC	Differential Scanning Calorimetry
D _T	translationaler Diffusionskoeffizient
DTE	1,4-Dithioerythritol
ε	Absorptionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FPLC	<i>Fast pressure liquid chromatography</i>
g	Gramm, Erdbeschleunigung
ΔG	freie Enthalpie, (Gibbs Energie)
Gal	Galaktose
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDI	Guaninnukleotid-Dissoziationinhibitor
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
Gl.	Gleichung
GppNHp	Guanosin-5'-(β,γ-imido)-triphosphat
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTPase	GTP-hydrolysierendes Enzym
GuaHCl	Guanidiniumhydrochlorid
ΔH	Enthalpie
$\Delta H_{m,i}^{vH}$, ΔH _{vH}	van't Hoff'sche Schmelzenthalpie
$\Delta H_{m,i}^{cal}$, ΔH _{cal}	kalorimetrische Schmelzenthalpie
HCl	Salzsäure
hGBP1	human Guanylate binding protein 1
HPLC	High Performance liquid chromatography
i	Anzahl der strukturellen Domänen eines Proteins
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon-α-Rezeptor
IFNGR	Interferon-γ-Rezeptor

IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie (<i>isothermal titration calorimetry</i>)
K	Gleichgewichtskonstante oder Kelvin
k_B	Boltzmannkonstante
Kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton (1kDa = 1000 g* mol ⁻¹)
K_D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
kJ	Kilojoule
$K_{m,i}$	Schmelzgleichgewichtskonstante der i-ten strukturellen Proteindomäne
λ	Wellenlänge
LB	Luria Bertani (Medium)
μ M	Mikromolar
M	Molar
mA	Miliampère
Maldi-TOF	Matrix-assisted Laser Desorbition/Ionization time of flight
min	Minute/-n
MES	2-(N-Morpholinoethan)sulfonsäure
MG	Molekulargewicht
M_{theor}	aus der Aminosäuresequenz berechnetes Molekulargewicht
N	natives Protein
NaF	Natriumfluorid
NHS	N-Hydroxysuccinimide
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEG #	Polyethylenglycol mit einem mittleren Molekulargewicht von # Da
PEEK	polyetherether Ketone
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Θ	Gemessene Elliptizität in Grad
R	Universelle Gaskonstante (8,314 J*mol ⁻¹ *K ⁻¹)
R_h	hydrodynamischer Radius
R_{ges}	alle gemessenen Radien bei einer DLS-Messung
Raf	Raffinose
UpM	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
ΔS	Entropie
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Synthetic dropout (Medium)
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SU	Signal unit (Signalstärke)
T	Temperatur
T_m	Schmelztemperatur
Tab.	Tabelle
TBA	Tetrabutylammoniumbromid
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoracid
Trf	Transformationseffizienz
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	entfaltetes Protein
Ura	Uracil
UV	Ultraviolett
V	Volumen
w/v	Masse pro Volumen (weight per volume)
Wt	Wildtyp-Protein

Für die Aminosäuren wurde der Ein- und Dreibuchstabencode verwendet:

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

7.2 Kalorimetrische Messungen

7.2.1 Differential Scanning Calorimetry

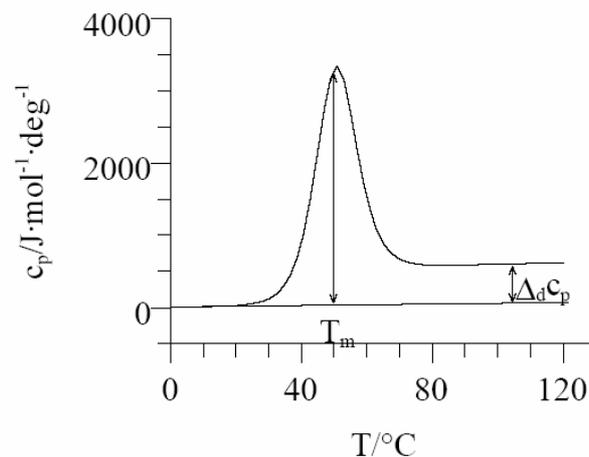


Abbildung 41 Darstellung einer simulierten DSC-Schmelzkurve: T_m gibt die Schmelztemperatur an, die aufgrund der Asymmetrie der Schmelzkurve nicht identisch ist mit der Temperatur, bei der die maximale Wärmeabsorption auftritt. Δc_p ist die Schmelzwärmekapazität. Die Fläche unter dem Schmelzpeak beschreibt die gesamte kalorimetrische Enthalpie der Denaturierung, während das Produkt aus der Peakhöhe bei einer bestimmten Temperatur (z. B. T_m) und der entsprechenden Temperatur die van't Hoff'sche Enthalpie angibt.

Es wurde ein „Mehr-Stufen-Übergangs-Modell“ (*non-two-state transition* Modell) ohne Änderung der Wärmekapazität ($\Delta C_p = 0$) bei dem Schmelzübergang für die thermisch induzierte Denaturierung zugrunde gelegt. Nur für einige kleine globuläre Proteine kann ein „Zweiübergangsmodell“ (*two-state transition* Modell) angenommen werden, welches das gesamte Protein als ein einheitliches, kooperatives System betrachtet^{270,271}. Die Ableitung der Gleichungen, die ein solches „Mehr-Stufen-Übergangs-Modell“ iterativ beschreiben, soll skizziert werden.

Mit dem Programm wurden die Rohdaten um die Referenzmessung (Puffer in beiden Zellen) korrigiert und die Basislinie wurde abgezogen (damit wird der Unterschied der Wärmekapazität vom gefalteten und

entfalteten Protein gleich Null gesetzt ($\Delta C_p = 0$). Das verwendete „Mehr-Stufen-Übergangs-Modell“ (*non-two-state transition* Modell), wird durch die folgenden Gleichungen beschrieben.

Formel 8

$$C_p(T) = \sum_{i=A}^Z \frac{K_{m,i}(T) \Delta H_{m,i}^{vH} H_{m,i}^{cal}}{(1 + K_{m,i}(T))^2 RT^2}$$

Formel 9

$$K_{m,i}(T) = e^{\left\{ \frac{-\Delta H_{m,i}^{vH}}{RT} \left(1 - \frac{T}{T_m} \right) \right\}}$$

- i: Anzahl der strukturellen Domänen eines Proteins
 $C_p(T)$: Wärmekapazität bei konstantem Druck in $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
 $K_{m,i}(T)$: Gleichgewichtskonstante des Schmelzprozesses für die i-te strukturelle Einheit
 $\Delta H_{m,i}^{vH}$: van't Hoff'sche Schmelzenthalpie für die i-te strukturelle Einheit in $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$
 $H_{m,i}^{cal}$: kalorimetrische Schmelzenthalpie für die i-te strukturelle Einheit in $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$
R: universelle Gaskonstante in $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
T: aktuelle Messtemperatur in K
 T_m : Schmelztemperatur des Proteins in K

Die Gleichungen, die ein solches „Mehr-Stufen-Übergangs-Modell“ iterativ beschreiben, werden wie folgt hergeleitet.

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

Formel 10

$$K_{m,A} = \frac{f_{A'}}{f_A}; K_{m,B} = \frac{f_{B'}}{f_B}; K_{m,C} = \frac{f_{C'}}{f_C}$$

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

Formel 11
$$H_m^{cal} = H_N^{cal} + f_{A'} \Delta H_{m,A}^{cal} + f_{B'} \Delta H_{m,B}^{cal} + \dots$$

Der erste Term H_N^c ist die Enthalpie des nativen Proteins, der berücksichtigt werden muss, weil alle Enthalpieänderungen ΔH_m^c relativ zum nativen gefalteten Protein gemessen werden. Die molare Wärmekapazität $C_{p,m}$ des Systems wird durch die Ableitung der Gleichung (Formel 11) nach der Temperatur berechnet.

Formel 12
$$C_{p,m} = \left(\frac{dH_m^{cal}}{dT} \right)_p = \left(\frac{dH_{m,N}^{cal}}{dT} \right) + \left(\frac{d(f_{A'} \Delta H_{m,A}^{cal})}{dT} \right) + \dots = C_{p,m,N} + \left[f_{A'} \Delta C_{p,m,A} + \Delta H_{m,A}^{cal} \left(\frac{df_{A'}}{dT} \right) \right] + \dots$$

Da $f_A = 1 - f_{A'}$ ist, ergibt sich mit der Definition der Gleichgewichtskonstante aus (Formel 10):

Formel 13
$$f_{A'} = \frac{K_{m,A}}{1 + K_{m,A}}$$

Die Ableitung nach der Temperatur und Erweiterung mit $K_{m,A}$ ergibt:

Formel 14
$$\left(\frac{df_{A'}}{dT} \right) = \frac{1}{(1 + K_{m,A})^2} \left(\frac{dK_{m,A}}{dT} \right) = \frac{K_{m,A}}{(1 + K_{m,A})^2} \left(\frac{dK_{m,A}}{K_{m,A} dT} \right) = \frac{K_{m,A}}{(1 + K_{m,A})^2} \left(\frac{d \ln K_{m,A}}{dT} \right)$$

Die letzte Ableitung der Gleichung (Formel 14) ist aus der elementaren Thermodynamik als „van't Hoff'sche Gleichung“ bekannt:

Formel 15
$$\left(\frac{d \ln K_{m,A}}{dT} \right) = \frac{\Delta H_{m,A}^{vH}}{RT^2}$$

Wenn alle Parameter bei der gleichen Temperatur (T) bestimmt wurden, erhält man durch das Einsetzen der Gleichungen (Formel 13) bis (Formel 15) in die Gleichung (Formel 12) erhält man die für das Zwei-übergangsmodell und für das Mehr-Stufen-Übergangs-Modell gültige Gleichung (Formel 16):

Formel 16
$$C_{p,m} = C_{p,N} + \left[\frac{K_{m,A} \Delta C_{p,m,A}}{1 + K_{m,A}} + \frac{K_{m,A} \Delta H_{m,A}^{vH} \Delta H_{m,A}^{cal}}{(1 + K_{m,A})^2 RT^2} \right] + \dots$$

Unter der Annahme, dass bei konstantem Druck die Wärmekapazität von nativem und entfaltetem Protein gleich ist, können alle Terme auf der rechten Seite der Gleichung, welche die Wärmekapazität enthalten, gleich Null gesetzt werden.

Unter Berücksichtigung der Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstante ergibt sich

Formel 8

$$C_p(T) = \sum_{i=A}^Z \frac{K_{m,i}(T) \Delta H_{m,i}^{vH} H_{m,i}^{cal}}{(1 + K_{m,i}(T))^2 RT^2}$$

Die Gleichgewichtskonstante $K_{m,i}$ (Formel 9) berechnet sich nach Variablentrennung durch Integration der van't Hoff'schen Formel 15 von einer beliebigen Temperatur T bis zur Schmelztemperatur T_m auf der einen Seite und den zugehörigen Schmelzgleichgewichtskonstanten $K_{m,i}$ und 1 auf der anderen Seite der Gleichung. Die zu T_m gehörende Schmelzgleichgewichtskonstante ist 1, weil bei Erreichen der Schmelztemperatur der Anteil von gefaltetem und entfaltetem Protein gleich ist:

Formel 9

$$K_{m,i}(T) = e^{\left\{ \frac{-\Delta H_{m,i}^{vH}}{RT} \left(1 - \frac{T}{T_m} \right) \right\}}$$

Wichtig ist die Unterscheidung zwischen der molaren kalorimetrischen und der molaren van't Hoff'schen Enthalpieänderung. Die molare kalorimetrische Enthalpieänderung ist die Gesamtenthalpieänderung des Schmelzprozesses, die durch die Fläche unter dem auf die Proteinkonzentration normalisierten Schmelzpeak (Abbildung 41) gegeben ist. Die molare van't Hoff'sche Enthalpie ist die bei einer gegebenen Temperatur absorbierte molare Wärme (z.B. bei der Schmelztemperatur das Produkt $\Delta c_p(T_m) \cdot T_m$) und damit ein direktes Maß für die temperaturinduzierte Reaktion.

7.2.2 Isotherme Titrationskalorimetrie

Der Auswertung der Dissoziationsexperimente im ITC wurde ein einfaches Monomer-Dimer-Gleichgewicht zugrunde gelegt:



Daraus ergibt sich für die Konzentration an Dimeren c_D in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration c_{ges}

Formel 18

$$c_D = \left(\sqrt{K_D + 8 c_{ges}} - \sqrt{K_D} \right)^2 / 16$$

Die Anpassung einer theoretischen Kurve an die ITC-Dissoziationsdaten beruht auf der Berechnung der Dimerkonzentrationen in der Spritze (hohe Konz.) und nach jedem Titrationsschritt in der Zelle. Dabei wird die Differenz zur Konzentration im vorherigen Titrationsschritt berücksichtigt. Dadurch wird berechnet, wie viel Dimer bei jedem Titrationsschritt dissoziiert. Die Kurvenanpassung erfolgte mit dem Programm Scientist (MicroMath) mit folgender Gleichungsdatei:

```
// MicroMath Scientist Model File
IndVars: x1, x2
DepVars: NDH
Params: H, K
c=0.5
injb=0.00801675
cellv=1.3656
NDH=(-H/8)*(((sqrt(K+8*c)-sqrt(K))^2)*injb+((sqrt(K+8*x1)-sqrt(K))^2)*cellv-((sqrt(K+8*x2)-sqrt(K))^2)*(cellv+injb))/(injb*c)
//Parameter values
K=0.01
H=-5000
***
```

NDH ist die gemessene Wärmemenge pro mol injiziertem Protein; x1 und x2 sind die Konzentrationen des Proteins in der Zelle vor und nach der jeweiligen Injektion. Die Konstanten c, injv und cellv bezeichnen die Konzentration des Proteins in der Spritze, das Injektionsvolumen und das Volumen der Messzelle. Die Parameter K und H entsprechen der Dissoziationskonstante K_D des Dimers und die molare Assoziationsenthalpie.

7.3 Materialien

7.3.1 Geräte

CD-Spektropolarimeter	Jasco J-710, Japan Spectroscopic Co. Ltd., Tokyo, Japan
DSC	VP-DSC Mikrokolorimeter, MicroCal, Northhampton, MS, USA
DLS	DynamoPro Molecular Sizing für Proteinlösung mit Temperaturkontrollgerät
FPLC	P50-Pumpe, UV-1-Detektor, Pharmacia Biotech
Gelscanner	Bioprofil 5.0, Fröbel, Lindau
ÄKTAexplorer-HPLC	Amersham Pharmacia biotech (pH/C-900, UV-900, P-900)
HPLC	Waters 2690 Separation Module, Waters 996 Photodiode Array Detektor, Waters 474 Scanning Fluorescence Detektor
HPLC-Säule	SigmaChrom GFC-1300 (Supelco, Belfonte, USA)
Inkubationsschüttler	Multitron, Infors AG, Bottmingen, Schweiz
ITC	MCS ITC Kalorimeter, MicroCal, Northhampton, MS, USA
Maldi-TOF Massenspektrometer Voyager	PerSeptive Biosystems (Santa Fe, USA)
Minigelkammer	Mini-Protean II, BioRad
PCR-Thermocycler	Trio-Thermoblock (Biometra, Göttingen)

7.3.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in höchster Reinheit von verschiedenen Firmen geliefert:

Acetonitril, Acrylamid (AppliChem), Agar-Agar, Agarose (Gibco Brl, LifeTechnologies), AlCl_3 (Merck), Ampicillin (Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH), APS = Ammoniumperoxodisulfat (Merck), Bradford Reagenz (Coomassie Protein Assay Plus Reagens, Pierce, USA), Bromphenolblau, BSA = Rinderserumalbumin, Chloramphenicol, Coomassie brilliant blue G250 und R250 (Serva), Desoxynukleosid-5'Triphosphate, Dextranblau-Lösung, DMSO = Dimethylsulfoxid, DTE = Dithioerythrol (Gerbu Biotechnik GmbH, D), EDC = 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) EDTA = Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure-Dinatriumsalz (Gerbu Biotechnik GmbH, D), Essigsäure (Riedel-de Haën, D), Ethanol 100 %, Ethanol, Ethidiumbromid, Galaktose (Sigma G-0750), GDP = Guanosindiphosphat (Pharma Waldorf), Glycerin, HCl, Isopropanol (J. T. Baker, NL), IPTG = Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid, Lithiumacetat, Natriumacetat (Fluka), Natriumchlorid, Natriumhydroxid (J. T. Baker, NL), NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 (Baker, Deventer) NaN_3 = Natriumazid, NHS = N-hydroxysuccinimidyl Ester (Fluka, Buchs), PEG 3350 = Polyethylenglycol (Fluka), PMSF = Phenylmethansulfonylfluorid, SDS = Natriumdodecylsulfat (Gerbu Biotechnik GmbH, D), Sucrose, TBA-Br = Tetrabutylammonium-Bromid), TEMED = N, N, N', N'-Tetramethylethylen-diamin (Serva), Tricin, Tris = Tris (-hydroxymethyl)-aminomethan (Roth), Triton X-100,

7.3.3 Mikroorganismen

BL21(DE3)	<i>Escherichia coli</i> B, F ⁻ , hsdS (r _B ⁻ , m _B ⁻), gal, dcm, ompT, λ(DE3) ²⁸⁸
TG1	<i>Escherichia coli</i> SupE, hsdΔ5, thi, Δ(lac-proAB), F'[traD36, proAB ⁺ , lacI ^f , laqZΔM15] ²⁸⁹
XL1-Blue	<i>Escherichia coli</i> recA1, end A1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F', proAB, lacI ^f ZΔM15, Tn10(Tet ^r)], ²⁹⁰
L40	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MATα, trp 1-901, leu2-3, his3-200, 112 ade2 LYS2::(lexAop) 4-HIS3 URA::(lexAop)8-lacZ Gal4 gal80 ²⁹¹
EGY 48	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MATα, his3, trp1, ura3, LexA _{op(x6)} -LEU2

7.3.4 Medien

Bakterienmedien

LB-Medium	10 g/l Bactotrypton, 5 g/l Hefeextract, 10 g/l NaCl, 5 mM NaOH
LB-Platten-Agar	10 g/l Bactotrypton, 5 g/l Hefeextract, 10 g/l NaCl, 5 mM NaOH, 15g/l Bacto Agar
TB-Medium	12 g/l Bactotrypton, 24 g/l Hefeextract, 4 ml/l Glycerin, 17 mM KH ₂ PO ₄ , 17 mM K ₂ HPO ₄

Hefemedien

YPD-Medium	20 g/l BactopeptonE, 10 g/l Hefeextract, 40 ml/l sterilfiltrierte 50% Glukose
YPAD-Medium	YPD-Medium mit 0,1 g/l Adenin
Hefeminimalmedium	1,2 g/l Hefe-Nitrogen-Extrakt ohne Aminosäuren oder Ammoniumsulfat, 5 g/l Ammoniumsulfat, 10 g/l Succinat, 6 g/l NaOH, 40 ml/l 50 % Glukose, einfach konzentrierte Mangel-Nährlösung
Mangel-Nährlösung I	je 0,1 g/l Adenin, L-Arginin, L-Cystein, L-Leucin, L-Lysin, L-Threonin, L-Tryptophan, Uracil je 0,05 g/l L-Asparaginsäure, L-Histidin, L-Isoleucin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Prolin, L-Serin, L-Tyrosin, L-Valin
Mangel-Nährlösung II	2,0 g/l L-Threonin, 1,5 g/l L-Valin, 1,0 g/l L-Leucin, 0,5 g/l L-Phenylalanin, je 0,3 g/l L-Isoleucin, L-Lysin, L-Tyrosin, je 0,2 g/l L-Adenin, L-Arginin, L-Histidin, L-Methionin, L-Tryptophan, Uracil
SD-Medium	6,7 g/l Hefe-Nitrogen-Extrakt ohne Aminosäuren, 20 g/l Agar, 100 ml Mangel-Nährlösung II, 2 % Glukose, pH 5,8
SD Gal/Raf-Medium	6,7 g/l Hefe-Nitrogen-Extrakt ohne Aminosäuren, 20 g/l Agar, 100 ml Mangel-Nährlösung II, 2 % Galaktose (<0,01 % Glukose), 1 % Raffinose, pH 5,8

Hefeselektionsmedien

SD His ⁻ Trp ⁻ Ura ⁻	SD-Medium ohne Histidin, Tryptophan und Uracil
SD Gal/Raf His ⁻ Leu ⁻ Trp ⁻ Ura ⁻	SD Gal/Raf-Medium ohne Histidin, Tryptophan, Leucin und Uracil
SD Gal/Raf His ⁻ Trp ⁻ Ura ⁻ +BU-Salze +X-Gal	SD Gal/Raf-Medium ohne Histidin, Tryptophan und Uracil mit BU-Salzen und X-Gal
SD Gal/Raf His ⁻ Leu ⁻ Trp ⁻ Ura ⁻ +BU-Salze +X-Gal	SD Gal/Raf-Medium ohne Histidin, Tryptophan, Leucin und Uracil mit BU-Salzen und X-Gal
UTL-Medium	Hefeminimalmedium ohne Uracil, Tryptophan und Leucin
UTLy-Medium	Hefeminimalmedium ohne Uracil, Tryptophan und Lysin
THULLy-Medium	Hefeminimalmedium ohne Uracil, Tryptophan, Leucin, Lysin und Histidin

THULLy+3AT-Medium THULLy-Medium mit 25 mM des Histidin-Biosynthese-Inhibitor 3-Aminotriazol

X-Gal-Agarplatten:

Die Hefeselektionsmedien mit X-Gal wurden für die Blau-Weiß-Selektion benötigt. Dafür wurde das X-Gal (80 mg/l) und die BU-Salze (1x) dem SD Gal/Raf-Medium zugesetzt. Durch die BU-Salze (70 g/l Na₂HPO₄ 7 H₂O, 30 g/l NaH₂PO₄, pH 7,0) wurde das Medium bei einem konstanten pH von 7,0 gehalten. Dies ist der optimale pH-Wert für die β-Galactosidase. Außerdem liefern die BU-Salze das für den Galactosidase-Assay benötigte Phosphat.

7.3.5 Puffer

Anodenpuffer (10x)	242,25 g/l Tris pH 8,9 mit HCl eingestellt
BU-Salze	70 g/l Na ₂ HPO ₄ 7 H ₂ O, 30 g/l NaH ₂ PO ₄ , pH 7,0
DNA-Probenpuffer	40 % Sucrose, 0,1 % Xylencyanol FF, 5 mM EDTA, pH 8,0
PufferD	1 x PufferX, 500 mM NaCl, pH 7,4
HPLC-Puffer	10 mM Tetrabutylammoniumbromid, 0,2 mM Natriumazid, 100 mM Kaliumphosphat pH 6,5, 7,5% (v/v) Acetonitril
DSC-Puffer	10 mM Phosphatpuffer, pH 7,5, 20 mM Glycin, 2 mM Mercaptoethanol
Kathodenpuffer	121,2 g/l Tris, 180 g/l Tricin, 10 g/l SDS, 0,1 g/l NaN ₃ , mit HCl auf pH 8,25 eingestellt
Laemmli-Probenpuffer (5x)	12,5 ml Puffer, 2,5 g SDS, 12,5 ml Glycerin, Bromphenolblau
Ligationspuffer (10x)	600 mM Tris/HCl pH 7,5, 80 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT
LiAc-TE-Puffer	1 ml 1 M Lithiumacetat, 1 ml 10x TE-Puffer, 8 ml Aqua dest. steril
LiAc-TE-PEG3350-Puffer	1 ml 1 M Lithiumacetat, 1 ml 10x TE-Puffer, 8 ml 50 % PEG 3350
PBS-Puffer	130 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7,0 mM Na ₂ HPO ₄ , 4,0 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,2
Phosphatpuffer 0,1 M	14,42 g/l Na ₂ HPO ₄ , 2,4 g/- KH ₂ PO ₄ pH 7,5
Puffer A	5 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM MgCl ₂ , 500 mM NaCl, 10 % Glycerol, 20 mM Imidazol
Puffer B ₂₀	20 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 10 % Glycerol, 20 mM Imidazol
Puffer B ₅₀₀	20 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 10 % Glycerol, 500 mM Imidazol
Puffer C	50 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM MgCl ₂ , 2 mM DTE
Puffer X (10x)	500 mM Tris/HCl, 50 mM MgCl ₂ , 1 mM NaN ₃ pH 7,4
SDS Probenpuffer (5x)	50 ml Tris (200 mM, pH 6,8), 15 ml Glycerin, 1,2 g SDS, 0,06 g Bromphenolblau, 10 mM DTE
TAE-Puffer	242 g/l Tris, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5M EDTA pH 8,0 ad 1l Aqua dest.
TE-Puffer (10x)	100 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0 einzustellen mit HCl (25%), Autoklavieren
TBS	20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5
TBST	TBS + 0,05 % (w/v) Tween 20
Z-Puffer	60 mM Na ₂ HPO ₄ , 40 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM KCl, 1 mM MgSO ₄

7.3.6 Stammlösungen

Acrylamid-Stammlösung	30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid, gebrauchsfertig von AppliChem, Darmstadt
Dextranblau	0,2 % SDS, 200 mM EDTA, Spatelspitze Dextranblau pH 7,0
dNTP-Mix (25mM)	100 mM dATP, 100 mM dCTP, 100 mM dGTP, 100 mM dTTP
Entfärberlösung für Gele	10 % Ethanol in Aqua dest.
Färbelösung für Gele	40 % Ethanol, 0,5 % Coomassie brillant blue G250, 0,5 % Coomassie brillant blue R250, in Aqua dest.
Glycerin Stock	300 µl Bakterien in Kulturmedium, 700 µl Glycerin (autoklaviert), Lagerung bei -80 °C
Lachs-Spermien-DNA	9 mg/ml
Lithiumacetat (1 M)	5,1 g Lithiumacetat pH 7,8 (mit Essigsäure eingestellt), ad 50 ml Aqua dest., steril filtrieren
PEG 3350 (50%)	50 g PEG 3350 ad 100 ml Aqua dest.
PMSF	100 mM PMSF gelöst in Ethanol
Terminator-Mix (<i>BigDye-Terminator Kit</i> , ABI)	1,58 µM A-DyeDesoxy, 47,37 µM C-DyeDesoxy, 0,42 µM G-DyeDesoxy, 94,74 µM T-DyeDesoxy, 15,79 µM dATP, 15,79 µM dCTP, 15,79 µM dTTP, 78,95 µM dGTP, 168,42 mM Tris/HCl pH 9,0, 4,21 Ammoniumsulfat, 42,1 mM MgCl ₂ , 0,42 U/µl AmpliTaqFS-DNA-Polymerase
X-Gal	20 mg/ml X-Gal in N,N-Dimethylformamid (DMF)

7.3.7 Verbrauchsmaterialien

Sterilfilter FP030/3 2 µM und ME 24 0,2 µM	Schleicher & Schüll (Kassel)
Ultrafiltrationsröhrchen VIVASPIN 10 und 30	Vivascience (Lincoln, USA)

7.3.8 Reagenzienkits

Plasmid Mini- und Midikit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Dye Desoxy-Terminator-Mix	Perkin-Elmer, Überlingen
QuikChange™ Site directed mutagenesis Kit	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)

7.3.9 Säulenmaterialien

GSH-Sepharose Superflow	Amersham-Pharmacia (Freiburg)
Nickel-NTA-Agarose Superflow	Qiagen (Hilden)
Superdex 75 und 100	Amersham-Pharmacia (Freiburg)

7.3.10 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roch (Mannheim)
Trypsin	Sigma (Deisenhofen)
Pepsin	Sigma (Deisenhofen)
DNase I	Roch (Mannheim)
DpnI	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)
EcoRI	New England Biolabs (Schwalbach)
Pfu-DNA-Polymerase	New England Biolabs (Schwalbach)
SalI	New England Biolabs (Schwalbach)
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs (Schwalbach)
XhoI	New England Biolabs (Schwalbach)

7.3.11 Proteinmarker

SDS-7 Mg: 14,2; 20; 24; 29; 36; 45; 66 kDa	Sigma (Deisenhofen)
SDS-6H Mg: 29; 45; 66; 97,4; 116; 205 kDa	Sigma (Deisenhofen)
Precision Plus Protein™ Standard Dual Color 10; 15; 20; 25; 37; 50; 75; 100; 150; 220 kDa	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA 94547)
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Standard 4; 6; 16; 22; 36; 50; 64; 98; 148 kDa	Invitrogen (Carlsbad, California 92008)

7.3.12 Vektoren

Die Expression von hGBP1 Wt. und der isolierten G-Domäne (Aminosäuren 2 bis 327) erfolgte mit dem pQE9-Vektor von Qiagen (Hilden). Die Expression der isolierten helikalen Domänen von hGBP1 (Aminosäuren 318 bis 592, 318-463, 464-582 und 464-592) erfolgte mit dem pGEX 4T3-Vektor (Amersham-Pharmacia, Freiburg). Die Expression der C589S-Mutante erfolgte im pProEx HTb-Plasmid (Invitrogen). Zum Beginn der Arbeit war die Expression von hGBP1 mit dem pQE9-Plasmid etabliert. Eine Expression der helikalen Domänen und der C589S-Mutante im pQE9-Plasmid erwies sich als nicht möglich. Als Ersatz wurde zuerst das pGex 4T3-Plasmid verwendet. Später wurde das pProEx HTb-Plasmid verwendet, da die für die Abspaltung des Fusionsproteins benötigte TEV-Protease - anders als das für das pGEX 4T3-Plasmid benötigte Thrombin - im Labor aufgereingt werden kann.

7.3.12.1 Klonierungs- und Transkriptionsvektoren

Plasmid	Größe in kb	Charakteristika
pQE9	~ 3,4	IPTG induzierbarer <i>tac</i> Promotor, Amp-Resistenz, His-Tag,
pGex 4T3	~ 4,9	IPTG induzierbarer <i>tac</i> Promotor, Amp-Resistenz, GST-Tag, Thrombin-Erkennungsstelle
pProEX HTB	~ 4,8	IPTG induzierbarer <i>trc</i> Promotor, Amp-Resistenz, His-Tag, rTEV-Erkennungssequenz

7.3.12.2 Klonierungs- und Shuttle-Vektor für das Zwei-Hybrid-System

pBTM116	~ 5,6	Amp-Resistenz (Selektion in Bakterien), TRP1-Gen (Selektion in Hefen), Köderplasmid, enthält die DNA-Bindungsdomäne des <i>lexA</i> -Gen
pVP16	~ 3,3	Amp-Resistenz, <i>Leu2</i> -Gen (Selektion in Hefen), Beuteplasmid, das <i>lexA</i> -Gen codiert die Transkription aktivierende Domäne
pGilda	~ 6,6	Amp-Resistenz, <i>His3</i> -Gen (Selektion in Hefen), Köderplasmid, Galaktose induzierter <i>GAL1</i> -Promotor, enthält die DNA-Bindungsdomäne des <i>lexA</i> -Gen
pB42Ad	~ 6,5	Amp-Resistenz, <i>Trp1</i> -Gen (Selektion in Hefen), Beuteplasmid, Galaktose induzierter <i>GAL1</i> -Promotor, das Gen des B42-Peptids codiert die Transkription aktivierende Domäne
p8op-lacZ	~ 10,3	Amp-Resistenz, <i>URA3</i> -Gen (Selektion in Hefen), <i>LexA</i> reguliertes <i>LacZ</i> -Reportergen

7.3.13 Antibiotika

Ampicillin

GERBU Biotechnik GmbH (Gaiberg)

Das Antibiotikum wurde den Medien nach dem Sterilisieren bis zu einer Endkonzentration von 100 mg/l zugegeben.

7.3.14 Oligonukleotide

7.3.14.1 Sequenzierungsprimer

hGBP1 300-319-s	ATCTGGATGT GGTGTGTGCC
hGBP1 300-319-as	GGCACACACC ACATCCAGAT
hGBP1 570-589-s	TCAGCTGACT TTGTGAGCTT
hGBP1 570-589-as	AAGCTCACAA AGTCAGCTGA
hGBP1 651-685-s	CCCCTCACACCAGATGAGTACCTGACATAC TCCC
hGBP1 651-685-as	GGGAGTATGTCAGGTACTCATCTGGTGTGAGGGG
hGBP1 810-828-s	GCCCAGCTCG AGAAACTAC
hGBP1 810-828-as	CTTGTAGTTT CTCGAGCTGG
hGBP1 1000-1018-s	GCATGGAGAA CGCAGTCCT
hGBP1 1000-1018-as	AGGACTGCGT TCTCCATGC
hGBP1 1272-1315-s	GCATCATCAGATCGTTGCTCAGGTTTACTTCAGGTCATTT TCAG
hGBP1 1272-1315-as	CTGAAAATGACCTGAAGTAAACCTGAGCAACGATCTGATG ATGC
hGBP1 1419-1437-s	CCGAGGAAGG GGATACAGG
hGBP1 1419-1437-as	CCTGTATCCC CTTCCTCGG
hGBP1 1712-1731-s	GACCCTCGCT CTTAAACTTC
hGBP1 1712-1731-as	GAAGTTTAAAG AGCGAGGGTC
hGBP1 1850-1873-as-Sall	GAGAGAGTCGACTAGGGGTGACAGAAGGCTCTGG

7.3.14.2 Mutageneseprimer

Punktmutanten

hGBP1_R48A_s	GGCAATTGTGGGCTCTAC G CCACAGGCAAATCCTACC
hGBP1_R48A_as	GGTAGGATTTGCCTGT G CGTAGAGGCCACAATTGCC
hGBP1_K51A_s	GGCCTCTACCGCACAGG C GATCCTACCTGATGAACAAGC
hGBP1_K51A-as	GCTTGTTTCATCAGGTAGGAT G CGCCTGTGCGGTAGAGGCC
hGBP1_D103A_s	GACACCGAGGGTCTGGGAGCTGTAGAGAAGGGTGACAACC
hGBP1_D103A_as	GGTTGTCACCCTTCTCTACAGCTCC C CAGACCCTCGGTGTC
hGBP1_D184N_s	GTGTGGACACTGAGAAATTTCTCCCTGGAC
hGBP1_D184N_as	GTCCAGGGAGAAATTTCTCAGTGTCCACAC
hGBP1_K567A_s	GAGGGATTTCA A GCAGAAAGCAGAATAATG
hGBP1_K567A_as	CATTATTCTGCTTTCT G CCTTGAAATCCCTC
hGBP1_C589S_s	GAGACGACGAAAGGCATCTACCATAAGCTAAAGACC
hGBP1_C589S_as	GGTCTTTAGCTTATGGTAGATGCCTTTCGTCTCTC

Deletionsmutanten

hGBP1_1_s_BamH1	CGCGGATCC ATGGCATCAGAGATCCAC
hGBP1_994-1019_ΔC Sall	GAGAGAGGATCC GCAGTCCTGGCCTTGGCCCAGATAG
hGBP1_1011-1037_ΔN_A318- I322_s-BamH1 (α7s)	CGCGGATCC CCGTGCATGGAGAACGCA
hGBP1_996-1013_P310- A315_s_BamH1 (α7s)	GAGAGAGTCGACTT TATCAAGTCTGGTCTGTCTGGAGAATTG- CATCAGTC
hGBP1_1481-1511_T472- T481_as_Sall (α11as)	GAGAGAGGATCC CCTCACAGAAAAAGAAAAGGAGATT- GAAGTGG
hGBP1_1512-1542_L482- V491_s_BamH1 (α12s)	CGCGTCGACTC ATCCCTCTTTTAGTAGTTGCTC
hGBP1_E558-G564_as_Sall (α12as)	CGCGTCGACTC AGCTTATGGTACATGCCTTTTCG
hGBP1_R586-S592_as_Sall (α13as)	

8 Danksagung

Zum Abschluss ist es mir ein besonderes Anliegen, mich bei all den Menschen zu bedanken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Alfred Wittinghofer für die freundliche Aufnahme in die Abteilung für Strukturelle Biologie am Max-Planck-Institut in Dortmund bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christian Herrmann für die Überlassung des sehr interessanten Forschungsthemas, die hervorragende Betreuung und viele lehrreiche Diskussionen. Er hat es dabei stets verstanden, eine angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre zu schaffen.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Frank Wunderlich für die Übernahme des Erstgutachtens sowie bei Herrn Prof. Dr. August-Wilhelm Alfermann für die Übernahme des Zweitgutachtens und ihre stetige Unterstützung bedanken.

Für die Einführung in die Feinheiten der Laborarbeit und ihre schier endlose Geduld möchte ich mich bei Frau Sabine Wohlgemuth bedanken.

Für ihre sehr hilfreiche Unterstützung bei der Lösung mathematischer Probleme sowie für viele Diskussionen möchte ich mich bei Frau Simone Kunzelmann bedanken.

Bei Herrn Dr. Agnidipta Ghosh und bei Herrn Adrian Syguda möchte ich mich für ihre stete Diskussionsbereitschaft bedanken.

Bei meinen Freunden und Kollegen möchte ich mich für die freundschaftliche Atmosphäre sowie die vielfältige Unterstützung bedanken. Allen voran bei Dr. Michael Hanzal-Bayer, Dr. Christina Kiel, Stefan Kloep, Caroline Körner, Maik-Borris Lüdemann, Dr. Gerrit J.K. Praefcke, Dr. Holger Rehm, Michael Schell, Dr. Daniel Schwarz, Benjamin Stieglitz, Dr. Jens Tränkle, Dr. Revathy Uthaiya und Dr. Özkan Yildiz.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester. Ohne ihre ständige Förderung und Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

9 Lebenslauf

Utz Benschaid
Löwenstraße 29
44135 Dortmund

01.04.1971	Geboren in Wermelskirchen
1977-1980	Grundschule „Am Stadtpark“ in Remscheid
1980-1981	Grundschule „Hasten“ in Remscheid
1981-1991	Städtisches Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium in Remscheid
07/1991-06/1992	Wehrdienst in Wesel und Rendsburg
10/1992-07/1999	Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf
1998-1999	Diplomarbeit am Institut für Entwicklungs- & Molekularbiologie der Pflanzen AG Pflanzliche Zellkulturen unter Leitung von Professor Dr. A. W. Alfermann („Einfluß von Elicitoren und Bestandteilen des Kulturmediums auf Wachstum und Lignanbildung von <i>Linum album</i> Zellkulturen)
11.08.1999	Abschluss: Diplom-Biologe
07/1999-09/1999	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen
10/1999-12/2002	Doktorarbeit in der Abteilung für strukturelle Biologie des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie in Dortmund
06/2003-02/2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Physikalische Chemie I der Ruhr-Universität in Bochum

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.
Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Dortmund, den 05.02.2006

Utz Benschaid