

**NMR-Lösungsstruktur
der humanen Hck SH3-Domäne
im Komplex mit einem artifiziellen,
hochaffinen Peptid-Liganden**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

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

vorgelegt von

Diplom-Physiker
HOLGER SCHMIDT

aus

Wissen

Mai 2006

Aus dem Institut für physikalische Biologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. D. Willbold

Koreferent: Jun.-Prof. Dr. Matthias Stoldt

Tag der mündlichen Prüfung: **30.06.2006**

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	VI
Summary	IX
Zusammenfassung	XI
1 Einleitung	1
1.1 Src-Typ Protein-Tyrosin-Kinasen	2
1.2 Die hämatopoetische Zell-Kinase Hck	5
1.2.1 Die Rolle von Hck in der Fc γ -Rezeptor-Signaltransduktion	6
1.2.2 Die Rolle von Hck in der Zytokin-Signaltransduktion	8
1.2.3 Die Rolle von Hck in der Integrin-Signaltransduktion	9
1.2.4 Die Rolle von Hck bei der HIV-I Infektion	10
1.3 Die Src-Homologie 3 (SH3)-Domäne	12
1.3.1 Die Struktur der SH3-Domäne	12
1.3.2 Bindungseigenschaften der SH3-Domäne	13
1.4 NMR-Spektroskopie	16
1.5 Vorarbeiten	18
1.6 Zielsetzung der Arbeit	20
2 Material und Methoden	23
2.1 Verwendete Materialien	23
2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide	23
2.1.2 Peptide	23
2.1.3 Enzyme und Chemikalien	24
2.1.4 Sonstige Materialien	24
2.1.5 Datenbanken	25
2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Laemmli)	25
2.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	26

2.4	Reinigung des rekombinanten Proteins HckSH3	27
2.4.1	Expression von rekombinatem HckSH3	27
2.4.2	Zellaufschluss	28
2.4.3	Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose	29
2.4.4	Abspaltung des GST-Affinitäts- <i>tags</i> mittels PreScission-Protease	29
2.4.5	Größenausschluß-Chromatographie	30
2.5	Fluoreszenzspektroskopie	31
2.5.1	Dissoziationskonstanten-Bestimmung mittels Fluoreszenzspektroskopie	32
2.6	Kernresonanzspektroskopie	33
2.6.1	Probenvorbereitung	33
2.6.2	NMR-Experimente	33
2.6.3	NOE-Zuordnung und Strukturberechnung	36
2.6.4	Kartierung der Bindungsstelle aus Analyse der Differenz der chemischen Verschiebungen bei Peptidbindung	38
3	Ergebnisse	41
3.1	Expression und Reinigung des rekombinanten Proteins HckSH3 aus <i>E. coli</i>	41
3.2	Fluoreszenztitrations-Experimente mit PD1-Mutanten	44
3.3	Sequenzspezifische Resonanzzuordnung	45
3.3.1	Zuordnung der Proteinrückgrat-Resonanzen der freien Hck SH3-Domäne	47
3.3.2	Zuordnung der Proteinrückgrat-Resonanzen des HckSH3:PD1-Komplexes	48
3.3.3	Zuordnung der Seitenketten-Resonanzen des HckSH3:PD1-Komplexes	49
3.3.4	Zuordnung der Protonen-Resonanzen des PD1-Peptids	50
3.3.5	Vollständigkeit der Resonanzzuordnung	51
3.4	Bestimmung der struktureinschränkende Parameter aus NOE-Korrelationen	52
3.4.1	Analyse der NOE-abgeleiteten Distanzeinschränkungen	54
3.5	Raumstrukturberechnung und -analyse	56
3.6	Kartierung der HckSH3:PD1-Bindungsstelle	60
3.7	Untersuchung der HckSH3:PD1-Bindungsstelle	63
3.8	Untersuchung von H ₂ O-/D ₂ O-Austauschraten der HckSH3-Amidprotonen .	67
3.9	Vergleich mit anderen HckSH3-Strukturen	70
4	Diskussion	73
4.1	Standardverfahren für Proteinreinigungen lieferte ausreichende Mengen an rekombinatem HckSH3	73
4.2	NMR-spektroskopische Experimente ermöglichten nahezu vollständige Resonanzzuordnung	74
4.3	Lösungsstruktur des HckSH3:PD1-Komplexes	74
4.3.1	Die Bindung von PD1 stabilisiert die HckSH3-Struktur	75

4.3.2	HckSH3:PD1-Komplexstruktur zeigt einige deutliche Abweichungen zu bekannten HckSH3-Strukturen	76
4.3.3	Bindungsstellenkartierung bestätigt die Ergebnisse der Strukturanalysen	77
4.3.4	PD1 ist ein Klasse-I'-Ligand von HckSH3	77
4.3.5	Die aminoterminalen PD1-Aminosäurereste zeigen eine untypische Ligandensequenz mit neuen Bindungseigenschaften zu HckSH3 . . .	79
4.4	PD1 ist der erste hochaffine Nicht-Standard-Ligand für Src-Typ SH3-Domänen	83
4.5	Vorhersage-Algorithmen für SH3-Bindungspartner erkennen PD1 nicht als hochaffinen HckSH3-Liganden	84
4.6	Es existieren PD1-ähnliche Sequenzen im humanen Proteom	86
4.7	Ausblick	88
5	Anhang	91
5.1	Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	91
5.2	Ein- und Dreibuchstaben-Aminosäure-Kode	94
	Literaturverzeichnis	95
	Danksagung	114

Abbildungsverzeichnis

1.1	Kristallstruktur der inaktiven Kinase Src	3
1.2	Kristallstruktur der aktiven Kinase Src	4
1.3	Kristallstruktur der inaktiven Kinase Hck	6
1.4	Fc γ -Rezeptor-Signaltransduktionsweg	7
1.5	IL-6-Rezeptor-Signaltransduktionsweg	8
1.6	Integrin-Signaltransduktionswege	9
1.7	HIV-1 Nef im Komplex mit der Fyn SH3-Domäne	10
1.8	Lösungsstruktur der freien Hck SH3-Domäne	12
1.9	Poly-Prolin-Helix Typ II	13
1.10	Bindungstasche der SH3-Domänen	14
1.11	Fluoreszenztitration von PD1 zur Hck SH3-Domäne und CD-Spektroskopie des Komplexes	18
1.12	NMR-Titration von PD1 zur Hck SH3-Domäne	19
1.13	Kompetition von HIV-1 Nef und PD1 um die HckSH3-Bindung	20
3.1	Aminosäuresequenz der Hck SH3-Domäne	41
3.2	Expression und Reinigung des HckSH3-Proteins	42
3.3	Spaltung des GST-HckSH3-Fusionsproteins und Größenausschlusschroma- tographie	43
3.4	Fluoreszenz-Titration verschiedener Peptidliganden zu HckSH3	45
3.5	(^{15}N - ^1H)-HSQC- und (^{13}C - ^1H)-HSQC-Spektren von freier HckSH3 und des HckSH3:PD1-Komplexes	46
3.6	Sequenzspezifische Resonanzzuordnung des Proteinrückgrats mittels 3D HNCACB-Spektrum	48
3.7	($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$)-gefiltertes NOE-Spektrum des PD1-Peptids im HckSH3:PD1- Komplex	50
3.8	Beispiele für intermolekulare NOE-Korrelationen	53
3.9	Zur Strukturrechnung verwendete Distanzeinschränkungen pro Aminosäure- rest	54
3.10	Stereodarstellung einer Schar von 20 Raumstrukturen des HckSH3:PD1- Komplexes	56
3.11	R.m.s.-Abweichungen pro Aminosäurerest	58
3.12	Ramachandran-Plot der HckSH3-Reste des HckSH3:PD1-Komplexes	59
3.13	Ribbondarstellungen der Raumstruktur des HckSH3:PD1-Komplexes	60

3.14	(¹⁵ N- ¹ H)-HSQC-Spektren von freier und PD1-gebundener HckSH3	61
3.15	Änderung der chemischen Verschiebungen der HckSH3-Amidresonanzen bei PD1-Bindung	62
3.16	Darstellung der hydrophoben Bindungsfläche des HckSH3:PD1-Komplexes	63
3.17	Bindungsregion des HckSH3:PD1-Komplexes	64
3.18	Lys3-Positionen in der HckSH3-Kompasstasche	66
3.19	Tryptophan-Seitenketten-Konformation	67
3.20	H ₂ O-/D ₂ O-Austauschraten der HckSH3-Amidprotonen	69
3.21	R.m.s.-Abweichungen der HckSH3:PD1-Komplexstruktur zu Vergleichsstrukturen	71
3.22	Überlagerung der HckSH3-Vergleichstrukturen mit dem HckSH3:PD1-Komplex	72
4.1	Tyrosin-Seitenketten-Konformationen in Strukturen der c-Src SH3-Domäne	76
4.2	Kompasstasche und hydrophobe xP-Dipeptidbindungsstaschen des HckSH3 im Komplex mit PD1	78
4.3	Ankerrest-Positionen in verschiedenen Src-Typ SH3-Liganden	80
4.4	Ankerrest-Positionen in verschiedenen Abl SH3-Liganden	81

Tabellenverzeichnis

1.1	Familie der Src-Typ Protein-Tyrosin-Kinasen	2
2.1	Tabelle der verwendeten synthetischen Peptide	23
2.2	Tabelle der verwendeten Enzyme und Chemikalien	24
2.3	Tabelle der verwendeten sonstigen Materialien	24
2.4	Tabelle der verwendeten Vergleichsstrukturen	25
2.5	Akquisitions- und Prozessierungsparameter der NMR-Experimente	34
3.1	K_D -Werte der HckSH3:Peptid-Komplexe	44
3.2	Statistik der HckSH3:PD1-Raumstrukturberechnung	57
3.3	R.m.s.-Abweichungen des HckSH3:PD1-Komplexes zu anderen HckSH3-Strukturen	70
4.1	Ungewöhnliche SH3-Liganden-Konsensussequenzen	83
4.2	Vergleich der K_D -Werte von HckSH3-Liganden mit der Vorhersage des SH3-SPOT-Algorithmus	85
4.3	PD1-ähnliche Sequenzen eines potentiellen, physiologischen SH3-bindenden Proteins	86

Summary

The hematopoietic cell kinase Hck is a cytosolic protein-tyrosine kinase, which is involved in numerous signal transduction pathways and plays a significant role in immunogenic diseases like AIDS or leukemia. Hck interacts via its SH3 domain with other cellular or viral proteins resulting in regulation of kinase activity. Thus, the identification of the parameters responsible for the binding to other proteins is essential for understanding of protein-protein interactions as well as for the development of new drugs that would specifically inhibit these interactions.

Aim of this work was the determination of the solution structure of Hck SH3 domain (HckSH3) in complex with an artificial high affinity peptide ligand (PD1). Although some HckSH3 interaction studies were accomplished, this work presents the first complex structure of HckSH3.

The binding properties of HckSH3 were of particular interest, especially because the PD1 peptide shows an unusual amino acid sequence for a ligand to Src type SH3 domains, not in accordance with their consensus sequence. Instead the basic anchor residue usually found at position P₋₃ the PD1 peptide exhibits a hydrophobic tyrosine residue (Tyr4), while a basic leucine residue is positioned at P₋₄. Nevertheless, the PD1 peptide binds to HckSH3 with a surprisingly high affinity as can be seen by the measured K_D value of 0.23 μM , which ranges among the most affine binders known for SH3 peptide ligands.

The solution structure of the complex reveals the typical poly-proline helix conformation for the peptide residues Leu6 to Pro10. A comparison to other HckSH3 structures shows that the peptide adopts a class I' binding conformation, and no significant conformational changes in the overall structure of HckSH3 can be recognized.

The most prominent feature is the formation of a short antiparallel β -sheet in the RT loop of HckSH3 upon PD1 binding, which is not present in any other structure of HckSH3. This β -sheet is characterized by the formation of hydrogen bond interactions between the carbonyl and amide groups of the HckSH3 residues Y88 and F98 within the RT loop. H₂O/D₂O amide proton exchange experiments revealed an increase in exchange lifetimes of the protons involved in hydrogen bonding throughout the whole HckSH3 upon ligand binding, indicating that the PD1 interaction stabilises the overall structure of HckSH3.

Comparisons of the complex to other SH3:ligand complexes reveal the untypical binding mode of the aminoterminal PD1 residues to the HckSH3 compass pocket region. Due to a kink in the peptide backbone, the basic side chain of Lys3 at position P₋₄ points into the HckSH3 compass pocket and seems to fulfill the function of the anchor residue. The hydrophobic ring of peptide residue Tyr4 provides extensive contacts to the imidazole ring of H92 in the HckSH3 RT loop.

In case of the PD1 peptide the described new ligand recognition mode of HckSH3 results in a high affinity binding. Algorithms for the prediction of ligand binding to SH3 domains like SH3-SPOT fail to identify PD1 as high affinity ligand. Therefore, it seems to be necessary to reconsider the consensus sequence of Src type SH3 domains. This shows the important contribution of the HckSH3:PD1 complex structure in understanding the molecular basics

of SH3-ligand interactions. Additionally this knowledge is prerequisite for development of more reliable algorithms for the prediction of SH3-binding proteins as well as for drug design.

Zusammenfassung

Die hämatopoetische Zell-Kinase Hck ist eine zytosolische Protein-Tyrosin-Kinase und involviert in eine Vielzahl zellulärer Signaltransduktionswege. Sie spielt eine wichtige Rolle bei Immunkrankheiten wie AIDS und Leukämie. Essentiell für die Funktionalität von Hck ist die Wechselwirkung von körpereigenen und viralen Proteinen mit ihrer SH3-Domäne, die unter anderem für die Regulation der Kinaseaktivität verantwortlich ist. Die Identifizierung der Bindungsparameter von SH3-Domänen dient daher nicht nur dem Verständnis von zellulären Prozessen durch Einblicke in die Grundlagen von Protein-Protein-Wechselwirkungen, sondern auch zur Basis für die Entwicklung von Medikamenten, die diese Protein-Protein-Wechselwirkungen spezifisch inhibieren können. Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung der Lösungsstruktur der Hck SH3-Domäne (HckSH3) im Komplex mit einem artifiziellen, hochaffinen Peptidliganden (PD1). Obwohl bereits einige Bindungsstudien mit HckSH3 durchgeführt wurden, existiert bisher keine Komplexstruktur.

Die Untersuchung der Bindungseigenschaften von HckSH3 im Zusammenhang mit dem PD1-Peptid ist besonders interessant, da dieses Peptid nicht die für Src-Typ SH3-Domänen typische Konsensussequenz aufweist. Anstatt des basischen Ankerrests befindet sich ein hydrophober Tyrosinrest (Tyr4) an Position P₋₃, während sich ein basischer Lysin-Rest an Position P₋₄ befindet. Überraschenderweise besitzt das PD1-Peptid mit einem K_D -Wert von 0,23 μM für HckSH3 mit die höchste bekannte Affinität eines Peptidliganden zu SH3-Domänen.

Die Raumstruktur des HckSH3:PD1-Komplexes zeigt eine für SH3-bindende Liganden typische Poly-Prolin-Helix-Konformation der PD1-Peptidresiduen Leu6 bis Pro10. Der Vergleich mit anderen HckSH3-Strukturen lässt erkennen, dass das Peptid in Klasse-I'-Orientierung an HckSH3 bindet, eine signifikante Konformationsänderung innerhalb der HckSH3-Struktur ist nicht vorhanden.

Ein besonderes Merkmal ist die Ausbildung eines kurzen antiparallelen β -Faltblatts im flexiblen RT-Loop von HckSH3 bei der Bindung an PD1, der bisher in keiner HckSH3-Struktur vorhanden ist. Verursacht wird dies durch Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Carbonyl- und Amidgruppen der Aminosäuren Y88 und F98 im RT-Loop. $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Amidprotonen-Austauschexperimente zeigen, dass bei der Bildung des HckSH3:PD1-Komplexes eine Verstärkung der Wasserstoffbrückenbindungen in der gesamten HckSH3-Struktur stattfindet, die PD1-Bindung also die HckSH3-Struktur stabilisiert.

Im Vergleich des Komplexes mit anderen SH3:Peptidligand-Komplexen zeigt sich, dass die aminoterminalen Residuen des PD1-Peptids eine unübliche Struktur aufweisen. Durch einen Knick im Peptidrückgrat weist die basische Seitenkette des Lysin-Restes (Lys3) an Position P₋₄ in die HckSH3-Kompasstasche und übernimmt damit die Funktion des Ankerrestes. Der hydrophobe Ring des Tyr4 bildet extensive Kontakte zum Imidazolring des H92 im RT-Loop von HckSH3.

Dies deutet ein völlig neues Liganden-Erkennungsprinzip von HckSH3 an, welches im Fall

der HckSH3-PD1-Bindung eine hochaffine Bindung verursacht und von Algorithmen zur Vorhersage von SH3-bindenden Liganden nicht als solche erkannt wird. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Konsensussequenz von Src-Typ SH3-Domänen neu überdacht werden muss und zeigt den wichtigen Beitrag dieser Komplexstruktur zum Verständnis der SH3-Liganden-Wechselwirkung auf molekularer Ebene sowie zur Entwicklung besserer Vorhersage-Algorithmen für SH3-Liganden und neuer SH3-basierender Wirkstoffe.

Kapitel 1

Einleitung

Alle zellulären Blutbestandteile stammen von hämatopoetischen Stammzellen (pluripotente Zellen) im Knochenmark ab, die sich zu myeloiden und lymphatischen Vorläuferzellen entwickeln.

Die lymphatischen hämatopoetischen Zellen regulieren die adaptive Immunabwehr. Aus den lymphatischen Vorläuferzellen entstehen zwei Hauptgruppen von Lymphozyten, die B-Lymphozyten und die T-Lymphozyten. B-Lymphozyten entwickeln sich nach Aktivierung zu Plasmazellen und sind für die Antikörperproduktion verantwortlich. Die T-Lymphozyten bilden wiederum zwei Klassen. Zum einen die zytotoxischen T-Zellen, die Zellen abtöten können, zum anderen T-Zellen, die B-Zellen sowie Makrophagen aktivieren.

Die myeloiden hämatopoetischen Zellen gehören zur angeborenen Immunantwort und bilden die erste Verteidigung gegen Pathogene. Außerdem sind sie in der Lage, die lymphatischen hämatopoetischen Zellen zum Entzündungsherd zu locken und zu aktivieren, und somit die adaptive Immunabwehr auszulösen. Aus den myeloiden Vorläuferzellen entwickeln sich Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Mastzellen.

Granulozyten wandern zu Entzündungsherden und dienen dort als Effektorzellen, die andere Zellen des Immunsystems aktivieren. Außerdem sind sie in der Lage, Fremdkörper mittels Phagozytose oder Exozytose aufzunehmen und zu verdauen (Phagozyten). Zu den Granulozyten zählen die neutrophilen, eosinophilen und basophilen Zellen.

Makrophagen gehören ebenfalls zu den Phagozyten und induzieren bei ihrer Aktivierung die Sekretion von Mediatoren wie Zytokine (beeinflussen das Verhalten von Zellen mit Zytokinrezeptoren) und Chemokine ("locken" Zellen mit Chemokinrezeptoren an), die u.a. auch Entzündungsreaktionen auslösen.

Dendritische Zellen nehmen Antigene auf und präsentieren sie den Lymphozyten, die bei Erkennung dieses Antigens aktiviert werden.

Mastzellen setzen bei Aktivierung Substanzen zur Permeabilitätserhöhung von Gefäßen frei, zerstören Parasiten durch Exozytose, aktivieren eosinophile und basophile Zellen und lösen allergische Entzündungen aus.

1.1 Src-Typ Protein-Tyrosin-Kinasen

Die Zahl der humanen Gene, die Protein-Tyrosin-Kinasen kodieren, werden auf mehr als 1000 geschätzt, was mehr als 1% des menschlichen Genoms entspricht (Hanks & Hunter, 1995). Diese große Zahl an Protein-Tyrosin-Kinasen zeigt, dass sie wichtige Faktoren in zellulären Funktionen darstellen. Rezeptoren, die durch extrazelluläre Stimulation aktiviert werden, leiten Signale ins Zellinnere. Die Aufgabe der Protein-Tyrosin-Kinasen liegt in der Weiterleitung dieser Signale. Dies geschieht durch Übertragung von Phosphatgruppen auf Tyrosin-Hydroxylgruppen von Proteinen, welche durch diese Phosphorylierung für die Signalweiterleitung aktiviert werden (Krauss, 1997). Die Protein-Tyrosin-Kinasen sind mitverantwortlich für die Regulation von Zellmorphologie, -beweglichkeit, -wachstum, -reifung und -überleben.

Protein-Tyrosin-Kinasen teilen sich in zwei Gruppen auf. Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen sind Transmembran-Proteine, die über ihre extrazelluläre Domäne extrazellulären Liganden direkt binden können. Nicht-Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen dagegen besitzen keine Transmembrandomäne und sind zytoplasmisch oder an Plasma- bzw. intrazellulären Membranen mit Transmembranrezeptoren assoziiert. Die Familie der Src-Typ Protein-Tyrosin-Kinasen gehört zu den Nicht-Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen und besteht zur Zeit aus 11 Mitgliedern (Tabelle 1.1; Manning et al., 2002).

Tabelle 1.1: Familie der Src-Typ Protein-Tyrosin-Kinasen

Abkürzung	Name	Swiss-Prot Eintrag
Blk	B-lymphoide Kinase	P51451
Brk	Brust-Tumor Kinase	Q13882
Fgr	Gardner-Rasheed Katzen-Sarcoma virales Onkogen-Homolog	P09769
Frk	Fyn-ähnliche Kinase	P42685
Fyn	Fgr-/Yes-ähnliche Kinase	P06241
Hck	Hämatopoetische Zell-Kinase	P08631
Lck	Lymphozytenspezifische Kinase	P06239
Lyn	Lck/Yes-ähnliche Kinase	P07948
Src	Sarcoma virales Onkogen-Homolog	P12931
Srm	Src-ähnliche Kinase	Q9H3Y6
Yes	Yamaguchi Sarcoma virales Onkogen-Homolog	P07947

Sie zeichnen sich durch einen einheitlichen Aufbau aus (Abbildung 1.1), der im Folgenden beschrieben wird.

Aminoterminal befindet sich eine kurze Src-Homologie-4-Domäne (**SH4-Domäne**), die myristoyliert und z.T. auch palmitoyliert werden kann. Sie ist somit wichtig für die Membranassoziiierung der Kinasen an spezielle Mikrodomänen (Lipid Rafts), welche mit verschiedenen Lipiden, Cholesterol und Signaltransduktionsmolekülen angereichert sind (Dykstra et al., 2003; Rajendran & Simons, 2005).

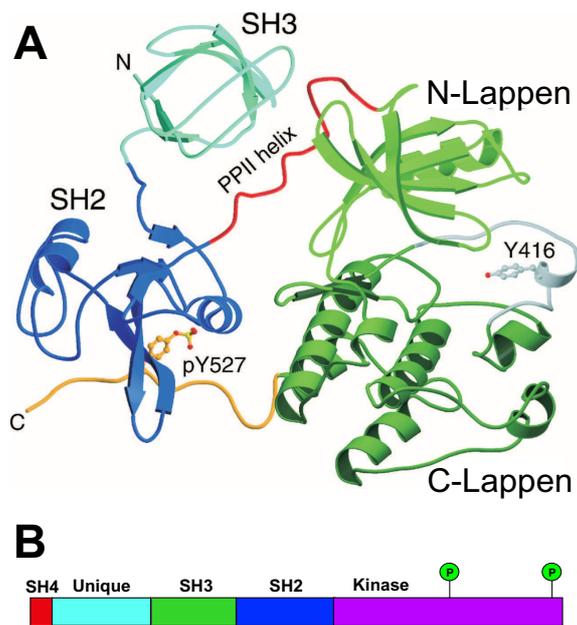


Abbildung 1.1: **A** Kristallstruktur der Protein-Tyrosin-Kinase Src im inaktiven Zustand (Xu et al., 1997). Die SH3-Domäne ist hellblau, die SH2-Domäne dunkelblau dargestellt. Der SH2-Kinase-Linker (rot) bildet eine PPII-Helix-Konformation und bindet an die SH3-Domäne. Der Tyrosinrest Y527 am Carboxyterminus (gelb) ist phosphoryliert und bindet an die SH2-Domäne, der Tyrosinrest Y416 im Aktivierungsloop (grau) ist dephosphoryliert (nach Hubbard & Till, 2000). **B** Schema der Src-Typ Protein-Tyrosin-Kinasedomänen.

Die Aminosäuresequenz der **Unique-Domäne** ist spezifisch für jede Kinase. Die Funktion der Unique-Domäne ist weitestgehend unbekannt, sie bindet an Rezeptormoleküle und besitzt einige Serin- und Threonin-Phosphorylierungsstellen (Brown & Cooper, 1996). Im Falle der lymphozytenspezifischen Kinase Lck geht sie eine für die Immunantwort wichtige Interaktion mit den Korezeptoren CD4 und CD8 ein, bei deren Zink-abhängiger Bindung sie eine α -helikale Struktur ausbildet (Kim et al., 2003). Johnson et al. (2000) entdeckten eine Tyrosin-Phosphorylierungsstelle in der Hck Unique-Domäne, die die Aktivität der Kinase moduliert.

Der Unique-Domäne folgen die hochkonservierten **SH3- und SH2-Domänen**, welche regulatorische Aufgaben besitzen. Sie sind verantwortlich für die Kontrolle der Kinaseaktivität und ebenfalls wichtig für die Lokalisierung der Kinase im Zellinneren sowie für die Orientierung des Substrats relativ zur katalytischen Domäne (Roskowski, 2004).

Die SH3-Domäne bindet Liganden mit Polyprolin-Helix-Motiven des Typs II (PPII-Helix) (Yu et al., 1994; Feng et al., 1995; und D. Cowburn, 1997).

Die SH2-Domäne interagiert mit phosphorylierten Tyrosinresten (Eck et al., 1994), die Bindungsspezifität wird durch die das Phosphotyrosin umgebenden Aminosäuren bestimmt (z.B. pYEEI für Src, Fyn, Lck, Fgr; Songyang et al., 1993).

Die katalytische Domäne (**SH1-Domäne**) besteht aus zwei gegeneinander beweglichen Teilbereichen, die "Lappen" genannt werden. Zwischen ihnen befindet sich das katalytisch aktive Zentrum der Kinase mit einem für die Aktivität wichtigen Tyrosinrest (Src: Tyr416, Hck: Tyr410), der durch intermolekulare Autophosphorylierung die aktive Konformation der katalytischen Domäne stabilisiert.

Am carboxyterminalen Ende befindet sich ein kurzes regulatorisches Segment mit einem für

die Inaktivierung der Kinaseaktivität wichtigem Tyrosinrest (Src: Tyr527, Hck: Tyr521). Die Kinaseaktivität wird durch die beiden oben genannten Tyrosinreste reguliert. Im inaktiven Zustand ist der Tyrosinrest am carboxyterminalen Ende phosphoryliert und bindet an die SH2-Domäne. Dadurch reorientiert sich der Linker zwischen SH2- und katalytischer Domäne (SH2-SH1-Linker), bildet eine PPII-Helix aus und bindet an die SH3-Domäne. Dieser SH3-gebundene Zustand ermöglicht die Interaktion einiger Linkerresiduen mit einer hydrophoben Tasche im aminoterminalen Lappen der katalytischen Domäne. Dies wiederum bewirkt durch komplexe interresiduelle Wechselwirkungen eine Repositionierung der α C-Helix im aminoterminalen Lappen, welche den Tyrosinrest im aktiven Zentrum nach außen abschirmt. Aufgrund dieser Konformationsänderungen, ausgelöst durch intramolekulare Bindungen der SH2- und SH3-Domänen, findet eine Blockierung des aktiven Zentrums statt, wodurch sowohl die Substratbindung als auch die Phosphorylierung des Tyrosinrestes im aktiven Zentrum verhindert wird (Sicheri et al., 1997; Roskowski, 2004; Abbildung 1.1 A).

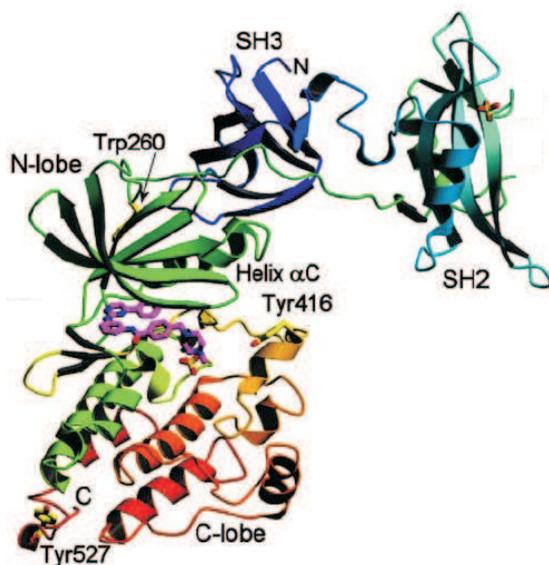


Abbildung 1.2: Kristallstruktur der Protein Tyrosin-Kinase Src im aktiven, vollständig unphosphorylierten Zustand (Cowan-Jacob et al., 2005). Die SH3-Domäne ist dunkelblau, die SH2-Domäne hellblau, der SH2-Kinase-Linker und der N-terminale Lappen der Kinasedomäne dunkelgrün, der C-terminale Lappen hellgrün bis rot, der Aktivierungloop gelb und der Carboxyterminus rot dargestellt. Der SH2-SH1-Linker bindet an die SH3-Domäne, der dephosphorylierte Carboxyterminus in eine hydrophobe Tasche im C-terminalen Lappen.

Durch intermolekulare Wechselwirkungen mit SH2- oder SH3-bindenden Liganden, die die intramolekularen Bindungen aufbrechen können, kann diese inaktive Konformation destabilisiert und somit die Kinase aktiviert werden (Brown & Cooper, 1996; Moarefi et al., 1997; Abbildung 1.2). Dabei löst sich die intermolekular wechselwirkende regulatorische Domäne von ihrer intramolekularen Bindungsstelle (SH3-Domäne: SH2-SH1-Linker oder SH2-Domäne: Carboxyterminales Phosphotyrosin). Der SH3-SH2-Linker destabilisiert und die "Klammer" aus SH2- und SH3-Domäne, welche die katalytische Domäne in inaktiver Konformation hält, öffnet sich. Die jeweils andere, nicht intermolekular interagierende, regulatorische Domäne kann dabei intramolekular gebunden bleiben. Für eine vollständige Kinaseaktivierung müssen jedoch sowohl SH2- als auch SH3-Domäne von ihrer intramolekularen Bindung gelöst und der Tyrosinrest im aktiven Zentrum der Kinase phosphoryliert werden (Young et al., 2001; Ulmer et al., 2002; Lerner & Smithgall, 2002; Lerner et al., 2005).

Die Möglichkeit, die Kinaseaktivität über unterschiedliche Aktivierungsmodi zu regulieren, könnte auch dazu dienen, entsprechend unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden zu aktivieren (Lerner et al., 2005).

Ein weiterer möglicher Kinaseregulationsmechanismus könnte eine hydrophobe Tasche im C-terminalen Lappen der katalytischen Domäne sein, die Myristat binden kann (Cowan-Jacob et al., 2005). Während in der aktiven Konformation der Src der C-Terminus in diese Tasche bindet, könnte im inaktiven Zustand, in der die Kinase meist nicht membrangebunden vorliegt, der Myristoylanker des N-Terminus der Kinase mit dieser Tasche interagieren. Tatsächlich fanden Resh (1994) Hinweise auf eine Korrelation zwischen Membranbindung und Kinaseaktivität. Weiterhin hat, wie oben erwähnt, eine Tyrosin-Phosphorylierungsstelle in der Unique-Domäne von Hck einen Einfluss auf deren Kinaseaktivität (Johnson et al., 2000).

Die Protein-Tyrosin-Kinasen vom Src-Typ sind somit weitverbreitete, vielseitige Proteine, deren komplexer Regulationsmechanismus kaum verstanden ist.

1.2 Die hämatopoetische Zell-Kinase Hck

Das Gen, welches die hämatopoetische Zell-Kinase (Hck) kodiert, wurde 1987 von Quintell et al. und Ziegler et al. im menschlichen Genom, und von Holtzmann et al. im Genom der Maus entdeckt. Die Hck ist eine zytoplasmatische Protein-Tyrosin-Kinase vom Src-Typ, die, ähnlich wie die lymphozytenspezifische Kinase (Lck), nur in bestimmten Zelllinien vorkommt. Sie wird in hämatopoetischen Zellen von B-lymphoidem und myeloidem Ursprung exprimiert und ist dort in eine Reihe von Zell-Signaltransduktionswegen involviert. Bei der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen (Hämatopoese) wird das Hck-Protein verstärkt exprimiert, und ihre Kinaseaktivität ist erhöht (Quintell et al., 1987; Taguchi et al., 2000; Lowell, 2004).

Hck tritt in zwei Isoformen auf, verursacht durch verschiedene Translationsstart-Codons im *hck*-Gen. Die eine Isoform (p60^{*hck*}, 60 kDa) besteht aus 526 Aminosäuren und besitzt gegenüber der p59^{*hck*}-Isoform (505 Aminosäuren, 59 kDa) zusätzlich 21 Reste am Aminoterminus. Während beide Isoformen myristoyliert werden können, liegt die p59^{*hck*}-Isoform auch teilweise palmitoyliert vor, wodurch diese in der Zelle fast ausschließlich membrangebunden vorliegt (Lock et al., 1991; Robbins et al., 1995; Möhn et al., 1995).

Hck spielt eine wichtige Rolle in verschiedensten Zell-Signaltransduktionswegen, die für Wachstum, Reifung, Differenzierung und Funktionen wie Bewegung, Adhäsion, Apoptose und Phagozytose verantwortlich sind.

Experimente mit "knock-out" Mäusen, in denen das *hck*-Gen deletiert wurde, zeigen nur leichte Defizite in den phagozytischen Eigenschaften von Makrophagen (Lowell et al., 1994). Grund für dieses Ergebnis ist die Redundanz der Src-Typ Protein-Tyrosin-Kinasen. So zeigen "knock-out" Experimente, in denen neben Hck auch die Kinasen Fgr bzw. Fgr und Lyn deletiert wurden, deutlichere Defekte in verschiedensten Zellfunktionen, als bei Deletion der Kinasen Fgr und Lyn alleine.

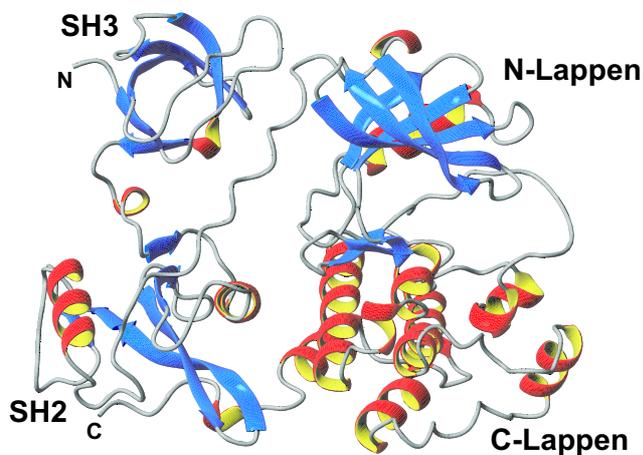


Abbildung 1.3: Kristallstruktur der inaktiven Kinase Hck. Zu sehen sind (von Amino- zum Carboxyterminus) die SH3-, SH2- und Kinasedomänen. Die SH3-Domäne bindet intramolekular an den SH2-Kinase-Linker, das phosphorylierte Tyrosin des Carboxyterminus an die SH2-Domäne (Struktur aus der Protein-Datenbank (1AD5.pdb); nach Sicheri et al., 1997).

Die hämatopoetischen $Hck^{-/-}/Fgr^{-/-}$ - bzw. $Hck^{-/-}/Fgr^{-/-}/Lyn^{-/-}$ -Zellen zeigen Defekte in Phagozytose und De-granulation, Zellbeweglichkeit, Adhäsion, in der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und in der respiratorischen Entladung, ein Prozess, bei dem NADPH-Oxidasen toxische Produkte zur Zerstörung von Mikroorganismen erzeugen (Lowell et al., 1994; Lowell et al., 1996a; Lowell & Berton, 1998; Suen et al., 1999; Mócsai et al., 1999; Fitzer-Attas et al., 2000). In Osteoklasten-Zellen, die für die Resorption von Knochen verantwortlich sind, führen "knock-out" Versuche mit Src zur Osteopetrose-Erkrankung der Mäuse; das Krankheitsbild verschlimmert sich dramatisch bei zusätzlich deletierter Hck (Lowell et al., 1996b). "Knock-in"-Mäuse, die eine stetig aktive Hck-Mutante besitzen, erkranken

an spontaner Lungenentzündung und zeigen eine erhöhte Immunreaktion von Makrophagen und neutrophilen Zellen (Ernst et al., 2002).

Dies zeigt, dass Hck in einer Vielzahl von zellulären Funktionen wichtige regulatorische Aufgaben besitzt. Die Wichtigsten dieser Signaltransduktionswege sollen nun im Folgenden betrachtet werden.

1.2.1 Die Rolle von Hck in der $Fc\gamma$ -Rezeptor-Signaltransduktion

Der $Fc\gamma$ -Rezeptor spielt eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort. Er wird vor allem von Makrophagen und Granulozyten exprimiert und bindet an den konservierten Fc-Teil von G-Immunglobulinen (IgG). Diese wiederum erkennen spezifisch Oberflächenmoleküle von Fremdkörpern. Trifft ein IgG-dekorierter Fremdkörper auf eine akzessorische Effektorzelle mit $Fc\gamma$ -Rezeptoren (vor allem Makrophagen und neutrophile Zellen), so binden diese Rezeptoren an die Fc-Domänen der IgGs. Die dadurch erzeugte Aggregation von $Fc\gamma$ -Rezeptoren führt zur Aktivierung der Zelle, wodurch in Phagozyten die Phagozytose ausgelöst wird. Sie nehmen die Fremdkörper auf, wodurch ein den Fremdkörper umschließendes Phagosom entsteht. Dieses fusioniert mit Lysosomen, welche verschiedene lysosomale Enzyme enthalten, zu Phagolysosomen. Die lysosomalen Enzyme werden dadurch im Phagolysosom freigesetzt und verdauen den Fremdkörper. Einige akzessorische Effektorzellen setzen außerdem Mediatoren frei, die z.B. Entzündungen verursachen, andere Effektorzellen zum Entzündungsherd locken oder die adaptive Immunantwort auslösen.

Durch diese $Fc\gamma$ -Rezeptor-vermittelte Immunantwort können die Effektorzellen der adaptiven Immunantwort Fremdkörper ohne eigene Antigen-Spezifität erkennen und neutralisieren und dienen somit als erste Verteidigungslinie vor allem gegen bakterielle Infektionen.

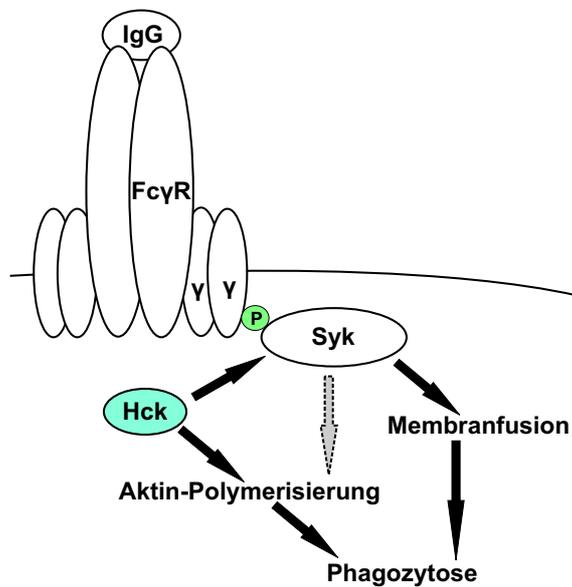


Abbildung 1.4: Modell für die Rolle von Hck in der $Fc\gamma$ -Rezeptor-vermittelten Phagozytose. Hck phosphoryliert die ITAM-Motive der γ -Ketten des Rezeptors (grüner Kreis) und aktiviert die an diese Phosphorylierungsstellen bindende Syk. Diese aktiviert weitere involvierte Signalproteine, woraus die Phagozytose des an den Rezeptor gebundenen, IgG-gecoateten Fremdkörpers folgt. Außerdem beschleunigt Hck die Aktin-Polymerisierung, die zur Bildung von phagozytischen Schalen führt. Der gestrichelte Pfeil zeigt einen möglichen direkten Einfluß der Syk auf die Aktin-Polymerisierung (nach Fitzer-Attas et al., 2000).

Die Aggregation der $Fc\gamma$ -Rezeptoren induziert die Expression von Hck und steigert deren Kinaseaktivität. Sie assoziiert mit dem Rezeptor und phosphoryliert die ITAM-Motive (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) der zytosmatischen Ligandenbindungs-Untereinheit bzw. der mit dem Rezeptor assoziierten γ -Kette und vielleicht noch weitere Zellproteine. Die phosphorylierten ITAM-Motive bilden wiederum eine Bindungsstelle für die Protein-Tyrosin-Kinase Syk (Spleen Tyrosin Kinase), die aktiviert wird und weitere Zellproteine phosphoryliert, zum Beispiel Zytoskelettsubstrate, welche schließlich eine Reorganisation des Zytoskeletts verursachen (Ghazizadeh et al., 1994; Durden et al., 1995; Kedzierska et al., 2001; Abbildung 1.4).

Neben der Weiterleitung von $Fc\gamma$ -Rezeptor Signalen scheint Hck auch eine wichtige Funktion in der Mobilisierung und Fusion von Lysosomen mit Phagosomen einzunehmen. Hck ist mit azurophilen Granula assoziiert, welche saure Phosphatase, Myeloperoxydase und andere lysosomale Enzyme enthalten (Möhn et al., 1995). Bei der Fusion dieser Granula mit Phagosomen assoziiert Hck mit der phagosomalen Membran und wird aktiviert (Möhn et al., 1995; Welch & Maridonneau-Parini, 1997; N'Diaye et al., 1998). Eine direkte Interaktion der Hck SH3-Domäne mit ELMO1, einem für die Phagozytoseregulation wichtigen Protein, konnte von Porter-Scott et al. (2002) nachgewiesen werden. Der Degranulationsprozess kann außerdem durch Tyrosin-Kinasen-Inhibitoren unterdrückt werden (Welch et al., 1996).

Die plasmamembranassoziierte Form von Hck ($p59^{hck}$) scheint für die Rezeptorsignaltransduktion verantwortlich zu sein, während lysosomassoziierte Hck ($p59^{hck}$ und $p60^{hck}$) die Fusion der Lysosomen mit Phagosomen (bei der Phagozytose) oder mit der Plasmamem-

weitere Signaltransduktionsproteine entstehen (Abbildung 1.5). Es kommt u.a. zur Aktivierung von zwei wichtigen Signaltransduktionswegen, dem Ras/MAP-Kinase-Signalweg, der zur Zellreifung und Apoptosehemmung dient und dem Jak/STAT-Signalweg, der für die Transkription weiterer Zellproteine verantwortlich ist (Ernst et al., 1999; Schaeffer et al., 2001). Hck scheint auch später in den Kaskaden in diese Signaltransduktionswege regulatorisch einzugreifen (Briggs et al., 1995; Carréno et al., 2002; Schreiner et al., 2002; Klejman et al., 2002; Shivakrupa et al., 2003; Radha et al., 2002).

1.2.3 Die Rolle von Hck in der Integrin-Signaltransduktion

Die Integrin-Signaltransduktion ist ebenfalls ein wichtiger Bestandteil der Immunabwehr. Sie ist verantwortlich für die Mobilisierung von aktivierten Phagozyten zu Infektionsherden mittels Bindung der Integrinrezeptoren an Zelladhäsionsmoleküle (z.B. ICAMs), deren Expression durch Entzündungsmediatoren wie z.B. den Tumor-Nekrose-Faktor TNF- α auf der Oberfläche von Endothelzellen induziert wird. Die Interaktion mit den Zelladhäsionsmolekülen und mit Entzündungsmediatoren wie TNF- α führt zu einer Reihe von Signaltransduktionen, die durch Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts neben Zellbewegung und -adhäsion auch immunologische Reaktionen wie Degranulation, Zytokinexpression und Produktion von Sauerstoffradikalen hervorrufen.

Integrine sind Heterodimere, bestehend aus einer α - und einer β -Kette. Hck interagiert mit der β -Kette, phosphoryliert diese und erzeugt damit eine Bindungsstelle für die Syk Protein-Tyrosin-Kinase (Lowell, 2004), die nach Aktivierung weitere Signalproteine aktivieren kann (Abbildung 1.6).

”Knock-out”-Experimente zeigen, dass Hck wichtige Aufgaben in Integrin-induzierter Degranulation, Superoxidproduktion, Zellbewegung und -adhäsion einnimmt (Lowell et al., 1996a; Lowell & Berton, 1998, Mócsai et al., 1999; Suen et al., 1999; Chiaradonna et al., 1999; Mócsai et al., 2000). Hck assoziiert nach Integrin-Stimulation außerdem auch direkt

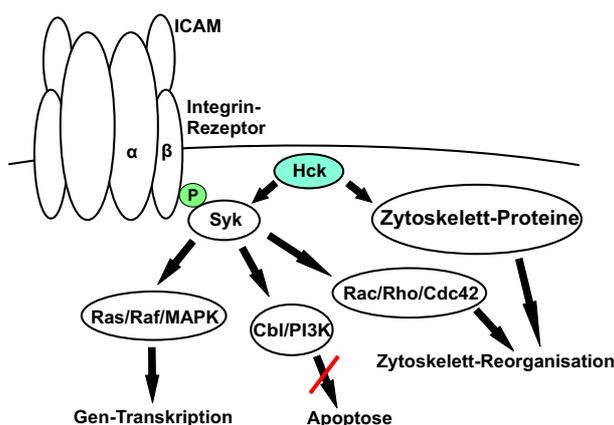


Abbildung 1.6: Modell für die Rolle von Hck in der Integrin-Rezeptor Signaltransduktion. Die Bindung von Zelladhäsionsmolekülen (z.B. ICAMs) an den Integrin-Rezeptor führt zur Aktivierung von Hck, die die β -Untereinheit des Rezeptors phosphoryliert und so Bindungsstellen für Syk bildet, welche dann aktiviert wird. Dies führt zur Aktivierung einer Reihe weiterer Signalwege. Außerdem interagiert sie direkt mit Aktin-Zytoskelett-regulierenden Proteinen.

an das Zytoskelett (Nair & Zingde, 2001) und bindet an Proteine, die für die Regulation des Aktin-Zytoskelett-Organisation verantwortlich sind (Porter-Scott et al., 2002).

1.2.4 Die Rolle von Hck bei der HIV-I Infektion

Das erworbene Immunschwäche-Syndrom (AIDS) wird durch das humane Immundefizienz-Virus (HIV) verursacht. Das HI-Virus gehört zur Gruppe der Retroviren und exprimiert die für diese Virusgruppe typischen Strukturproteine Env, Gag und Pol, welche für die Virusreplikation von entscheidender Bedeutung sind. Desweiteren besitzt das HI-Virus sechs weitere Leseraster, die die akzessorischen Proteine Nef, Rev, Tat, Vif und Vpu (im HI-Virus Typ 1) bzw. Vpx (im HI-Virus Typ 2) kodieren (Frankel & Young, 1998). Das Krankheitsbild der HIV-Infektion äußert sich in schweren opportunistischen Infektionen, neurologischen Ausfällen, dem Auftreten von malignen Tumoren und der Reduzierung von CD4⁺-Zellen (Raulin, 2002).

Hck wechselwirkt mit den akzessorischen Proteinen Nef (Saksela et al., 1995; Arold et al., 1998) und Vif (Hassaine et al., 2001).

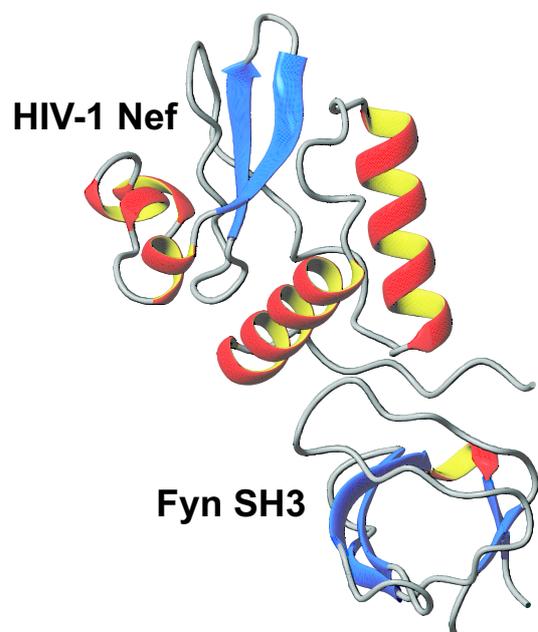


Abbildung 1.7: HIV-1 Nef im Komplex mit der SH3-Domäne von Fyn. Das Nef-Protein bindet mit einem Poly-Prolin-Motiv am Carboxyterminus an die PPII-Bindungsstelle der SH3 (nach Arold et al., 1997).

Das Nef-Protein (negative factor) ist ein hochkonserviertes Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 27 kDa, das durch einen Myristoylanker am Aminoterminus mit der Plasmamembran assoziiert sein kann. Die große Bedeutung des Proteins für die Entwicklung der AIDS-Erkrankung zeigt sich an der Beobachtung von infizierten Rhesus-Affen (Kestler et al., 1991) und langzeitüberlebenden Menschen, die eine natürliche Mutation im *nef*-Gen besitzen (Deacon et al., 1995; Kirchhoff et al., 1995). Außerdem gehört es zu den ersten Proteinen, die in infizierten Zellen exprimiert werden (Piguet & Trono, 1999), und allein die Expression von Nef in CD4⁺-Zellen von Mäusen ruft schon AIDS-ähnliche Symptome hervor (Hanna et al., 1998).

Nef induziert die Internalisierung und den Abbau der Zelloberflächenrezeptoren CD4, CCR5 und MHC-I (Garcia & Miller, 1992; Goldsmith et al., 1995; Salghetti et al., 1995; Michel et al., 2005). Der Abbau der CD4- und CCR5-Moleküle verhindert wahrscheinlich eine Superinfektion der Zelle, da CD4 und CCR5 die Hauptrezeptoren für das HIV-Hüllprotein gp120 bei Eintritt des Virus in die Zelle sind (Benson et al., 1993; Tuttle et al., 1998), und verhindert zudem die Wechselwirkung von gp120 auf der Oberfläche neu synthetisierter Viruspartikel mit CD4 beim Verlassen der Zelle. Der MHC-I-Rezeptor präsentiert Proteinfragmente aus dem Zellinneren. Sind diese Fragmente nicht körpereigen,

werden sie von Immunzellen als Antigene erkannt, und eine Immunreaktion wird ausgelöst. Der Abbau dieses Rezeptors dient also dem Schutz des Virus vor Entdeckung.

Das Nef-Protein steigert außerdem die Virusreplikation und -infektiosität und moduliert die zelleigene Signaltransduktion. (Miller et al., 1994; Marsh, 1999). So greift es über SH3-vermittelte Wege in die zelluläre Transkription (Biggs et al., 1999), in Zellentwicklung und -differenzierung (Suzu et al., 2005) sowie in den Kalziumhaushalt ein (Foti et al., 1999) und hat Einfluß auf das Überleben der Zelle (Briggs et al., 2001).

Nef steigert die Aktivität von Hck *in vitro* (Moarefi et al., 1997) und *in vivo* (Briggs et al., 1997). In Zellen mit kinasedefekter Hck wird der Abbau der MHC-I-Rezeptoren inhibiert und die Virusreplikation und -infektiosität gesenkt (Saksela et al., 1995; Tokunaga et al., 1998; Chang et al., 2001).

Hck und HIV-1 Nef (Erregerstamm NL4-3) bilden einen sehr stabilen Komplex mit einem K_D von $0,25 \mu\text{M}$ (Lee et al., 1995) bzw. $0,6 \mu\text{M}$ (Arold et al., 1998). Die Wechselwirkung ist SH3-abhängig, die Bindung erfolgt über ein Poly-Prolin-Motiv im Nef-Protein (Aminosäuren 71 bis 75). Neben der typischen Wechselwirkung mit diesen Resten bilden noch weitere Aminosäuren im Nef-Protein Kontakte zur SH3-Domäne, wobei vor allem die Reste Ala83, His116 und Tyr120 wichtig sind, die mit Ile96 im RT-Loop der Hck SH3-Domäne interagieren (Lee et al., 1995; Choi & Smithgall, 2004). Die SH3-Aminosäurereste, welche in diese zusätzlichen Kontakte involviert sind, zeigen jedoch eine starke Konservierung in den Aminosäuresequenzen der Src-Familie. Daher scheint neben der Aminosäure Ile96 von HckSH3 vor allem die hohe Flexibilität des RT-Loops, die durch das Fehlen eines Wasserstoffbrückennetzwerks zustande kommt, verantwortlich für die hohe Affinität von Nef an die Hck SH3-Domäne zu sein (Lee et al., 1995; Arold et al., 1998).

Das Vif-Protein (viral infectivity factor) ist ein zytoplasmatisches Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 23 kDa, dessen Aminosäuresequenz stark konserviert ist. Es wird im späteren Stadium des Virus-Lebenszyklus während der Virussyntese exprimiert (Yang & Gabuzda, 1999; Zhang et al., 2000; Simon et al., 1999a) und ist wichtig für die Infektiosität des Virus (Cullen, 1998) sowie für die Virusreplikation (Gabuzda et al., 1992; von Schwedler et al., 1993; Courcoul et al., 1995). Mutationsstudien zeigen einen Einfluss des Proteins auf Replikation, Proteinfaltung und zelluläre Lokalisation (Simon et al., 1999b). Es interagiert mit dem Strukturprotein Gag und der viralen RNA, daher scheint die Hauptaufgabe des Vif-Proteins die Kontrolle der reversen Transkription und der Virussyntese zu bestehen (Zhang et al., 2000; Henzler et al., 2001). Das Vif-Protein bindet ebenfalls über ein Poly-Prolin-Motiv an die Hck SH3-Domäne und senkt ihre Kinaseaktivität. In HIV-infizierten Zellen mit deletiertem *vif*-Gen scheint die Hck in einen Signalweg involviert zu sein, der die Produktion und Infektiosität der Viren (Hassaine et al., 2001) inhibiert. Sheehy et al. (2002) fanden ein Protein (CEM15 oder APOBEC3G) mit antiviralen Eigenschaften, das durch Vif am Andocken an Virionen gehindert wird (Mariani et al., 2003). CEM15 wird durch die Protein-Tyrosin-Kinasen Fyn und Hck phosphoryliert, was eine CEM15-Regulation durch die Kinasen vermuten lässt und die Senkung der Infektion in Abwesenheit von Vif erklären könnte (Douaisi et al., 2005). Das Vif-Protein scheint also auch in die Inhibierung der natürlichen intrazellulärer Immunab-

wehr involviert zu sein, indem es die Hck-Kinaseaktivität und damit die Phosphorylierung von CEM15 und deren antivirale Eigenschaft hemmt.

1.3 Die Src-Homologie 3 (SH3)-Domäne

1.3.1 Die Struktur der SH3-Domäne

Die SH3-Domäne ist eine 50-80 Aminosäure umfassende, nicht-katalytische Domäne, die Protein-Protein-Wechselwirkungen vermittelt (Koch et al., 1991) und in vielen Proteinen zu finden ist, die dynamische Prozesse wie Organisation des Zytoskeletts, Internalisierung von Membranrezeptoren und Signaltransduktion von extrazellulären Proteinen regulieren (Musacchio et al., 1992; Mayer & Baltimore, 1993; Pawson & Gish, 1992; Pawson & Schlessinger, 1993; Cohen et al., 1995).

In Protein-Tyrosin-Kinasen sind sie mit verantwortlich für die Lokalisation des Proteins und die Substraterkennung. Außerdem beeinflussen sie die Aktivität der Kinase negativ (Franz et al., 1989; Jackson & Baltimore, 1989). Strukturanalysen der Src (Xu et al., 1997) und Hck (Sicheri et al., 1997) zeigen, dass diese negative Regulation durch intramolekulare Wechselwirkungen zustande kommt (Kapitel 1.1).

Vergleiche von SH3-Domänen zeigen hohe Sequenz- und Strukturhomologien, hochkonservierte aromatische Aminosäurereste und variable Loop-Bereiche (Koyama et al., 1993; Musacchio et al., 1994; Dalgarno et al., 1997; Musacchio, 2003).

Sie besitzt eine globuläre Form mit einer hydrophoben Bindungsstelle. Die SH3-Domäne besteht aus einem β -barrel zweier β -Faltblätter mit je drei antiparallelen β -Strängen. Der zweite β -Strang (β b) wird durch einen β -bulge in zwei Einzelstränge geteilt (β b1 und β b2), so dass die beiden Faltblätter aus den Strängen β a/ β b1/ β e sowie β b2/ β c/ β d bestehen (Nomenklatur nach Kohda et al., 1994). Die fünf Stränge werden durch den RT-Loop (β a/ β b), den n-Src-Loop (β b/ β c) und den distalen Loop (β c/ β d) getrennt, β d und β e sind durch eine kurze 3_{10} -Helix oder einen helikalen Turn miteinander verbunden. Der RT (Arg/Thr)-Loop zeigt eine unstrukturierte Konformation und besitzt in den meisten SH3-Domänen saure Reste, die wichtig für die Bindung von Liganden sind. Die zwei hydrophoben Tyrosin-Reste im ALYDY-Motiv des RT-Loops sind

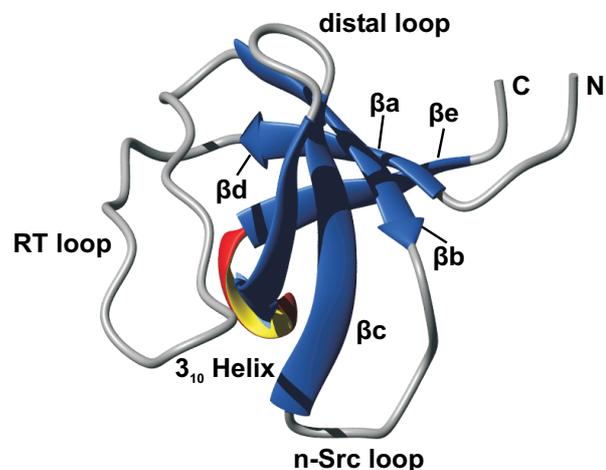


Abbildung 1.8: Lösungsstruktur der freien Hck SH3-Domäne (Struktur aus der Protein-Datenbank (5HCK.pdb); nach Horita et al., 1998).

Teil der SH3-Bindungsstelle. Der n-Src (neuronaler Src)-Loop flankiert zusammen mit dem RT-Loop die Bindungsstelle der SH3-Domänen und enthält einen hochkonservierten Tryptophanrest, der essentiell für die Ligandenbindung ist. Die 3_{10} -Helix bildet mit ihren hydrophoben Aminosäuren im PxxY-Motiv einen weiteren Teil der SH3-Bindungsstelle (Musacchio, 2003).

1.3.2 Bindungseigenschaften der SH3-Domäne

Die Bindungsstelle der SH3-Domäne wurde erstmals durch chemische Verschiebungsanalysen identifiziert (Yu et al., 1992; Booker et al., 1993). Sie besteht aus konservierten, aromatischen Aminosäureresten im RT-Loop, n-Src-Loop und in der Helix der SH3, welche eine ausgedehnte, hydrophobe Oberfläche bilden. Die Bindungsaffinität für Peptidliganden liegt im milli- bis mikromolaren Bereich und ist relativ unspezifisch (Viguera et al., 1994). Die beobachtbaren Bindungsunterschiede der verschiedenen SH3-Domänen an Peptidliganden lassen sich meist auf die weniger konservierten Reste im RT- und im n-Src-Loop zurückführen (Feng et al., 1995; Musacchio, 2003).

Die SH3-Domänen erkennen linksdrehende Poly-Prolin-Helix-Konformationen des Typs II (PPII-Helix). Entdeckt wurde diese Konformation der SH3-Liganden bei Abl-SH3-Komplexen (Cicchetti et al., 1992; Ren et al., 1993). Weitere Untersuchungen zeigten eine Konsensussequenz für SH3-Liganden, die das Motiv xPxxP aufwies (P = Prolin; x = beliebige Aminosäure). Dieses "Kernmotiv" besitzt eine PPII-Helix-Konformation (Feng et al., 1994; Lim & Richards, 1994; Musacchio et al., 1994; Yu et al., 1994).

Die PPII-Helix besitzt eine dreifache Rotationssymmetrie, so dass sich die Aminosäuren

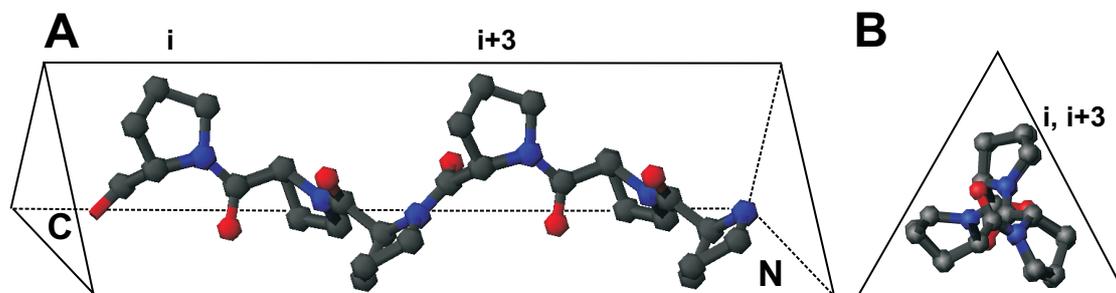


Abbildung 1.9: **A** Darstellung einer Poly-Prolin-Helix Typ II. Die dreifache Rotationssymmetrie der Helix bewirkt eine vollständige Windung nach drei Aminosäureresten. Die Aminosäurereste i und $i+3$ befinden sich immer auf der selben Seite der Helix. Dies zeigt sich bei 90° -Drehung der Helix (**B**), wo die Reste i und $i+3$ zur Deckung kommen. Kohlenstoffatome sind grau, Sauerstoffatome rot und Stickstoffatome blau dargestellt (nach Tran, 2005).

an den Positionen i und $i+3$ jeweils auf der gleichen Seite der Helix befinden (Abbildung 1.9). Die ϕ - und ψ -Winkel der Reste betragen im Durchschnitt -78° und $+146^\circ$, Ganghöhe beträgt etwa 9 \AA (Musacchio, 2003).

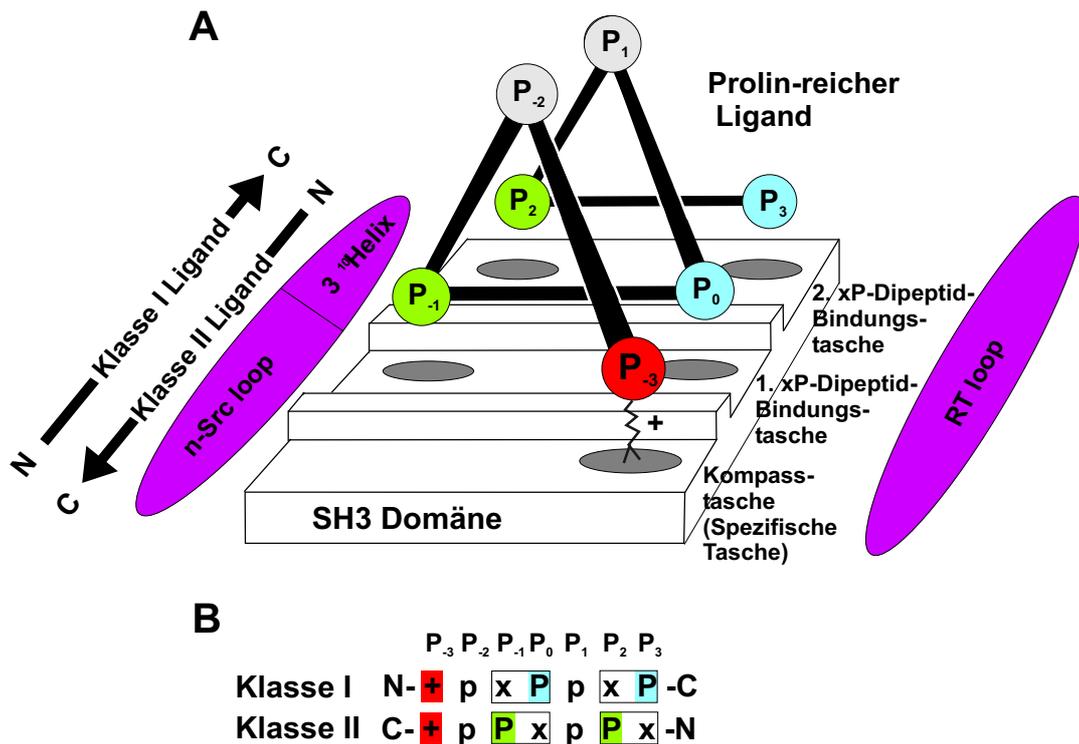


Abbildung 1.10: **A** Darstellung der PPII-Helix relativ zur Bindungsoberfläche zwischen RT-Loop und n-Src-Loop/ 3_{10} -Helix der SH3. Der basische Rest an Position P_{-3} bindet in die Komparttasche, die Aminosäuren an den Positionen P_{-1} und P_0 in die erste, die Reste an Positionen P_2 und P_3 in die zweite hydrophobe Bindungstasche der SH3-Domäne. Die Aminosäuren an den Positionen P_{-2} und P_1 dienen zur Stabilisierung der Helix und zur Bildung des optimalen Abstands der Aminosäurereste, die in die beiden hydrophoben Taschen binden. **B** Konsensussequenz der Klasse-I- und Klasse-II-Liganden mit ihrer jeweiligen Position (nach Lim & Richards, 1994). Der basische Rest ist rot markiert, die eingerahmten Reste bilden die xP-Dipeptide. Die konservierten Prolinreste sind bei den Klasse-I-Liganden blau (Positionen P_0 und P_3), bei den Klasse-II-Liganden grün (Positionen P_{-1} und P_2) dargestellt (nach Tran, 2005).

Die wichtigsten Kontakte zur SH3-Domäne bilden die beiden xP-Motive (xP-Dipeptide; Positionen P_{-1}/P_0 und P_{+2}/P_{+3} , Abbildung 1.10) des xPxxP-Motivs des Liganden, welche über hydrophobe Wechselwirkung mit konservierten aromatischen Seitenketten von SH3-Resten zur Bindung beitragen. Die erste xP-Dipeptid-Bindungstasche P_{-1}/P_0 wird vom konservierten Tryptophanrest des n-Src-Loops (W113 in Hck-SH3), dem C-terminalen Tyrosinrest im ALYDY-Motiv des RT-Loops (Y88 in Hck-SH3) und dem Prolinrest und Tyrosinrest im PxxY-Motiv der 3_{10} -Helix (P128 und Y131 in Hck-SH3) gebildet. Die Iminogruppe der Tryptophan-Seitenkette sowie die Hydroxylgruppe des Tyrosinrestes im PxxY-Motiv bilden jeweils eine Wasserstoffbrückenbindung zu Carbonylgruppen im Liganden aus. Die zweite hydrophobe xP-Dipeptid-Bindungstasche P_{+2}/P_{+3} besteht aus dem N-terminalen Tyrosinrest des ALYDY-Motivs des RT-Loops und des Tyrosinrestes des 3_{10} -Helix-Motivs PxxY, welches die beiden Bindungstaschen voneinander trennt. Die beiden xP-Dipeptide des Liganden werden durch eine sogenannte "scaffolding"-

Aminosäure ("Gerüstrest", meist Prolin) voneinander getrennt, welches von der SH3-Oberfläche wegzeigt. Durch die dreifache Symmetrie der PPII-Helix befinden sich daher beide Dipeptide in gleicher Position relativ zur SH3-Domäne und ihr Abstand zueinander stimmt ideal mit der Separation der beiden hydrophoben SH3-Bindungstaschen überein (Musacchio, 2003).

Aufgrund der Pseudosymmetrie von PPII-Helices können Liganden in zwei entgegengesetzten Orientierungen an die SH3-Domänen binden und werden daher in zwei Klassen unterteilt.

Klasse-I-Liganden besitzen die Konsensus-Sequenz +pXPpP (P = konserviertes Prolin; p = meist Prolin; x = aliphatische Aminosäure; + = basische Aminosäure, meist Arginin). Klasse-II-Liganden zeigen die Konsensus-Sequenz xPpXPp+ (Feng et al., 1994; Lim & Richards, 1994; Musacchio et al., 1994; Yu et al., 1994; Agrawal & Kisha, 2002). Die Bindungsorientierung wird durch den basischen Rest (Ankerrest) in der Konsensus-Sequenz bestimmt, der eine Salzbrücke mit der sauren Seitenkette einer konservierten Aminosäure im RT-Loop der SH3-Domäne bildet (Kompassrest, D95 in Hck-SH3), was die Präferenz der SH3-Domänen für basische Aminosäuren an der Position P₋₃ erklärt.

SH3-Liganden der Klasse I binden demnach mit ihrem Aminoterminus, Liganden der Klasse II mit ihrem Carboxyterminus an den RT-Loop.

Eine Ausnahme bildet die Abl-SH3, die statt eines sauren Restes eine ungeladene Aminosäure an dieser Position besitzt und daher Liganden mit aromatischen Seitenketten an Position P₋₃ bevorzugt.

Die für die Bindungsorientierung verantwortliche, negativ geladene Aminosäure in den SH3-Domänen befindet sich in einer weiteren Bindungstasche für SH3-Liganden, die sogenannte Kompassstasche zwischen RT- und n-Src-Loop, deren weniger stark konservierte Reste für die SH3-Bindungsspezifität und Affinitätserhöhung an bestimmte Liganden verantwortlich zu sein scheint (Musacchio, 2003). Die Kompassstasche wird durch den konservierten Tryptophanrest (W113 in Hck-SH3) von der ersten xP-Dipeptid-Bindungstasche getrennt, zugleich endet die PPII-Helixkonformation des Peptids an dieser Position (Williams et al., 1998).

Fernandez-Ballester et al. (2004) untersuchten die selektive Bindungsspezifität von SH3-Domänen an Klasse-I- und Klasse-II-Liganden. So sind einige SH3-Domänen in der Lage, Liganden beider Klassen zu binden, andere binden ausschliesslich Liganden der Klasse II. Ausschlaggebend dafür ist die Art der Aminosäureseitenkette an der SH3-Sequenzposition 126 (für die Hck). Aliphatische Seitenketten an dieser Position blockieren die Seitenkette von W113, welche sich zur Bindung an Klasse-I-Liganden um 15° neigen muss (SH3-I-Orientierung). Die W113-Seitenkette ist daher bei der Bindung von Klasse-II-Liganden gegenüber der Klasse-I-Bindung um 15° zur konservierten Aminosäure P128 hin geneigt (SH3-II Orientierung). Aromatische Seitenketten an dieser Position haben keine Auswirkung auf die Beweglichkeit der W113-Seitenkette. SH3-Domänen mit aliphatischen Seitenketten an Position 126 können somit nur Liganden der Klasse

II binden. Da die Hck SH3-Domäne an dieser Stelle eine Aminosäure mit aromatischer Seitenkette besitzt (Y126), kann sie Liganden beider Klassen binden.

Ausnahmen bilden Liganden mit der Konsensus-Sequenz LPxXP (X: Leucin bevorzugt). Sie binden in Typ-I-Orientierung, die Konformation der PPII-Helix dieser Liganden zeigt jedoch höhere Ähnlichkeit zu der von Klasse-II-Liganden, wobei die Leucin-Reste in die gleiche SH3-Tasche binden wie die Proline der Klasse-II-Liganden. Obwohl die Bindung in Typ-I-Orientierung erfolgt, zeigt die W113-Seitenkette hier eine SH3-II-Konformation. Fernandez-Ballester et al. (2004) führten für diese Liganden eine Klasse I' ein.

1.4 NMR-Spektroskopie

Die Bestimmung von atomar aufgelösten Strukturen biologischer Makromoleküle ist ein wichtiger Prozess im Verständnis ihrer Funktionsmechanismen. Aufgrund der 3D-Struktur von Molekülen lassen sich häufig bekannte Funktionen erklären und neu identifizierten Molekülen potentielle Funktionen zuordnen.

Zur Aufklärung von Raumstrukturen existieren vor allen zwei Methoden:

Die Röntgenkristallographie nutzt die Beugung von Röntgenstrahlen, um die Struktur von kristallisierten Molekülen zu bestimmen. Das Verfahren wurde 1912 erstmalig von Max Laue an Kupfersulfatkristallen durchgeführt.

Das Phänomen der kernmagnetischen Resonanz wurde 1946 von Bloch et al. und Purcell et al. entdeckt. Seither findet man die NMR-Spektroskopie in vielen Anwendungsbereichen der Physik, Chemie, Biologie, Materialforschung, Pharmazie und Medizin (Kernresonanz-tomographie).

Ihre Anwendung reicht von Qualitätssicherung über chemische Strukturaufklärung und Bestimmung von Festkörpereigenschaften bis hin zur atomaren Raumstrukturaufklärung von Biopolymeren.

In dieser Arbeit wird die NMR-Spektroskopie zur Raumstrukturaufklärung eines Komplexes biologischer Moleküle unter semiphysiologischen Lösungsbedingungen verwendet (Williamson et al., 1985; Wüthrich, 1986).

Während die Röntgenkristallographie keine Größenbegrenzung der zu untersuchenden Moleküle besitzt, ist die NMR-Spektroskopie für größere Makromoleküle und supra-molekulare Komplexe ungeeignet. Der Vorteil liegt jedoch neben der Verwendung von semiphysiologischen Lösungsbedingungen und dem Umgehen der Kristallisation in der Möglichkeit, neben der Raumstrukturaufösung auch dynamische Eigenschaften der Moleküle auf verschiedenen Zeitskalen zu charakterisieren (PalmerIII, 1997; Kay, 1998; Gardner & Kay, 1998), die Raumstruktur von nur partiell strukturierten Molekülen zu bestimmen (Wagner, 1997), Proteinfaltungsprozesse zu untersuchen (Dyson & Wright, 1998) und Ligandeninteraktionen zu identifizieren (Shuker et al., 1996).

Am Anfang jeder Raumstrukturbestimmung steht die möglichst vollständige, eindeutige sequenzspezifische Zuordnung jeder Resonanz zu den einzelnen Atompositionen im Molekül. Der nächste Schritt ist die Bestimmung von struktureinschränkenden Para-

metern z.B. aus Kern-Overhauser-Effekt-Experimenten (NOE-Spektroskopie), skalaren Dreibindungs-Kopplungskonstanten (Torsionswinkel-Einschränkungen) oder dipolaren Kopplungskonstanten. Die Berechnung von Strukturmodellen wird dann mittels Distanzgeometrie und/oder Moleküldynamik-Simulationen durchgeführt.

Die erste vollständige sequenzspezifische Zuordnung (Wagner & Wüthrich, 1982; Trypsin-Inhibitor) wurde erst mit der Entwicklung von 2D-NMR-Techniken möglich (Aue et al., 1976), mit deren Hilfe die Signalüberlagerungen in 1D-Spektren mittels verschiedener Korrelationen zwischen einzelnen Kernspins aufgelöst werden konnte. Die Entwicklung von uniformer Isotopenanreicherung mit ^{13}C und ^{15}N durch bakterielle Überexpression der zu untersuchenden Biomoleküle (Macintosh & Dahlquist, 1990; Lemaster, 1994) sowie höheren Magnetfeldern der NMR-Spektrometer, gerätetechnischen Verbesserungen (z.B. gepulste Magnetfeldgradienten (Kay, 1995) oder geformte Radiofrequenzpulse zur selektiven Anregung von verschiedenen Spektralbereichen (Freeman, 1998)) ermöglichte die Entwicklung von 3D/4D-($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$)-Tripelresonanz-Experimenten (Montelione & Wagner, 1990; Kay et al., 1990; Kay, 1995; Bax, 1994). Durch eine weitere Erhöhung der spektralen Dispersion (Fesik & Zuiderweg, 1988; Marion et al., 1989a) und durch konformationsunabhängige Spinkorrelationen von sequentiell benachbarten Aminosäuren wurde eine einfachere und eindeutigere Resonanzzuordnung auch von größeren Molekülen möglich. Die Ausarbeitung eines Formalismus (Produktoperatoren) zur Beschreibung von NMR-Experimenten und deren Auswirkung auf die verschiedenen Spinsysteme ermöglichte eine einfachere und zielgerichtete Entwicklungsmöglichkeit für neue NMR-Experimente (Sørensen et al., 1983).

Durch die Entwicklung weiterer Techniken zur Bestimmung von struktureinschränkenden Parametern (z.B. dipolare Kopplungskonstanten (Tjandra & Bax, 1997) und kreuzkorrelierte Relaxation (Dötsch & Wagner, 1998; Case, 1998)), partielle oder Per-Deuterierung der Moleküle (Lemaster, 1994; Gardner & Kay, 1998), selektive Isotopenmarkierung (Hajduk et al., 2000) und TROSY-basierte NMR-Techniken (Pervushin et al., 1997; Pervushin et al., 1998; Wüthrich, 1998) sind nun auch Strukturbestimmungen von Molekülen und Molekülkomplexen jenseits von 30 kDa möglich. Kelly et al. (2001) lösten die Struktur eines 50 kDa Moleküls, Salzmann et al. (2000) führten Resonanzzuordnungen und Sekundärstrukturanalyse eines 110 kDa Proteins durch, Fiaux et al. (2002) erreichten aufgelöste NMR-Spektren eines 870 kDa-Proteins. Neben der Verschiebung der Molekülgrößengrenze zu höheren Molekulargewichten hin, liefern diese Weiterentwicklungen auch neue und bessere Anwendungsmöglichkeiten in der Untersuchung von Dynamik- (Ishima & Torchia, 2000; Brüschweiler, 2003), Bindungs- (Meyer & Peters, 2003; Dehner & Kessler, 2005) und Faltungsprozessen (Zeeb & Balbach, 2004).

1.5 Vorarbeiten

Die Vorarbeiten zur dieser Arbeit wurden von Frau Dr. Thi Tuyen Tran durchgeführt (Tran, 2005). Das Peptid PD1 wurde als Peptid-Bindungspartner für die SH3-Domäne der Lck durch Screening einer Ph.D.-12-Phagenbibliothek isoliert.

Um die Dissoziationskonstante (K_D) zu bestimmen und die Selektivität des Peptids für die Lck SH3-Domäne zu untersuchen, wurde eine Fluoreszenz-Titration des PD1-Peptids mit verschiedenen SH3-Domänen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass dieses Peptid die höchste Affinität zur Hck SH3-Domäne besitzt ($K_D = 0,23 \pm 0,03 \mu\text{M}$; Abbildung 1.11 A). CD-spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass bei HckSH3:PD1-Komplexbildung nur geringe Konformationsänderungen stattfinden und dass das Peptid auch im freien Zustand eine PPII-Helix Konformation besitzt (Abbildung 1.11 B).

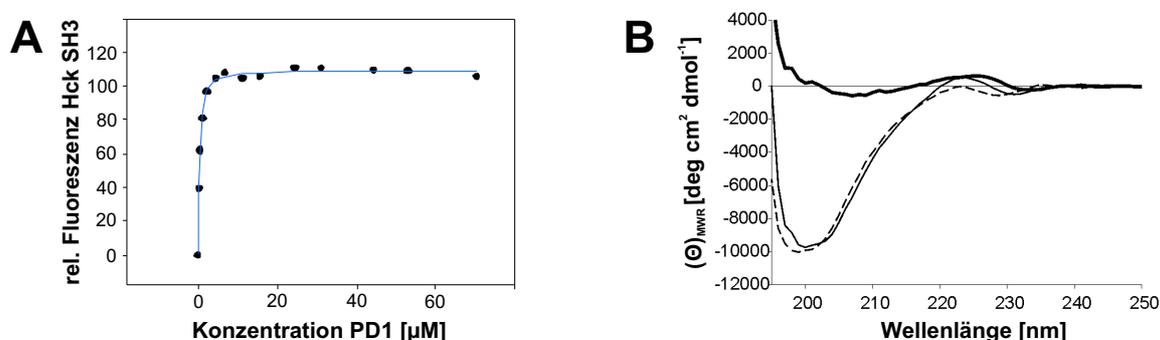


Abbildung 1.11: **A** Fluoreszenztitration von PD1 zur Hck SH3-Domäne. Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitätswerte nach Hintergrundfluoreszenz-Korrektur (schwarze Punkte) und der Fit der nichtlinearen Regressionsrechnung an die Datenpunkte (Linie), unter Annahme einer einfachen biomolekularen Reaktion. **B** Fern-UV-CD-Analyse des HckSH3:PD1-Komplexes. Die durchgezogene Linie zeigt das Spektrum des Komplexes, die gestrichelte Linie die Summe der CD-Spektren von freier HckSH3 und des freien Peptids, die dicke Linie die Differenz der Absorptionen aus den CD-Spektren des Komplexes und der freien Zustände. Da die spektralen Änderungen nur minimal sind, finden bei Komplexbildung nur minimale Konformationsänderungen statt und das Peptid besitzt daher vermutlich auch im freien Zustand schon eine PPII-Helix-Konformation (aus Tran, 2005).

Um die Bindungsstelle des Peptids an die Hck SH3-Domäne zu kartieren, wurde eine NMR-Titration des Peptids zur Hck SH3-Domäne durchgeführt. Die Titration zeigt einen langsamen Austausch der beiden Moleküle in freiem und in gebundenem Zustand (relativ zur NMR-Zeitskala), d.h. die Intensitäten der von der Bindung betroffenen Amidresonanzen werden geringer und tauchen bei anderen chemischen Verschiebungen wieder auf, was den niedrigen, aus der Fluoreszenztitration bestimmten, K_D -Wert bestätigt (Abbildung 1.12).

Da die Bindungsaffinität des PD1-Peptids zur Hck SH3-Domäne sehr hoch ist, wurde ein Konkurrenzexperiment durchgeführt, in dem untersucht wurde, ob das Peptid das HIV-1 Nef-Protein aus einem HckSH3:Nef-Komplex verdrängen kann. Dies wurde mittels NMR-Titration des Peptids zum HckSH3:Nef-Komplex untersucht.

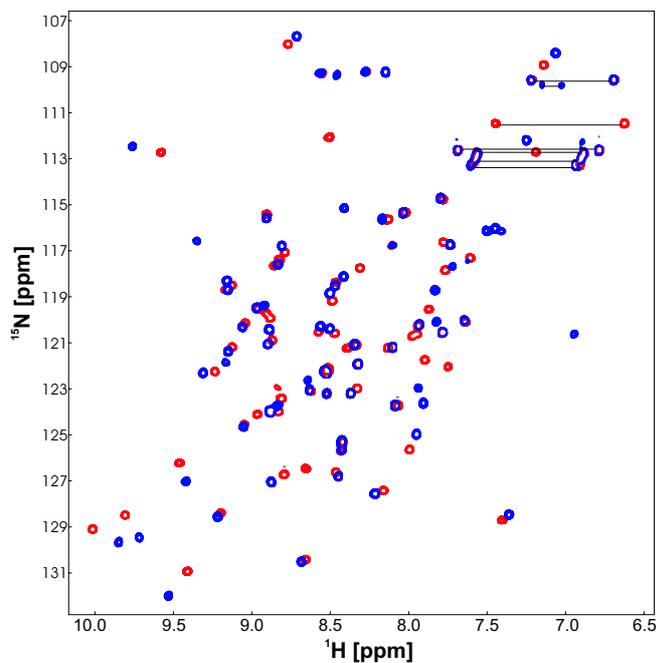


Abbildung 1.12: Übereinandergelagerte (^{15}N - ^1H)-HSQC-Spektren der Hck SH3-Domäne in Abwesenheit (rot) und Anwesenheit einer äquimolaren Konzentration des Peptids PD1 (blau; nach Tran, 2005).

Die Amidresonanzen im (^{15}N - ^1H)-HSQC-Spektrum, die vom HckSH3:Nef-Komplex herrühren, verschwinden, und die zum HckSH3:PD1-Komplex gehörigen Resonanzen tauchen auf (Abbildung 1.13 A). Dies deutet darauf hin, dass das Peptid in der Lage ist, das Nef-Protein von der Hck SH3-Domäne zu verdrängen. Es bindet in Anwesenheit wie auch in Abwesenheit von HIV-1 Nef in gleicher Konformation an die SH3-Domäne (Abbildung 1.13 B).

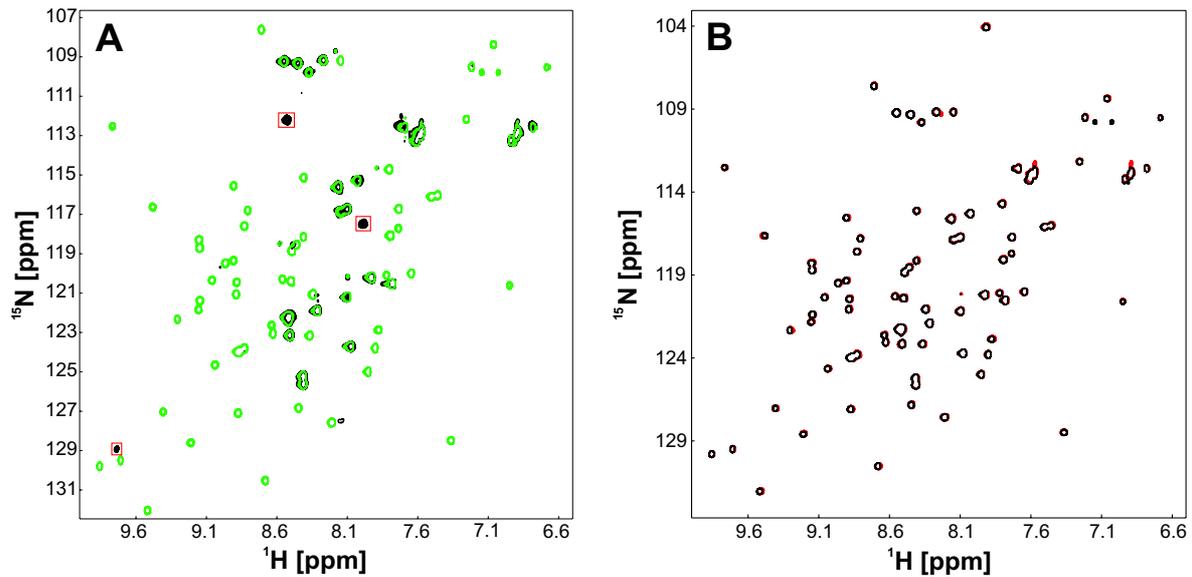


Abbildung 1.13: Verdrängung von HIV-1 Nef vom HIV-1 Nef:HckSH3-Komplex durch PD1. **A** Über-einandergelegte (¹⁵N-¹H)-HSQC-Spektren von HckSH3 (350 μM) im Komplex mit HIV-1 Nef (416 μM) vor (schwarz) und nach (grün) Titration des Peptids PD1 (1091 μM). Resonanzen, die nur zum HIV-1 Nef:HckSH3-Komplex gehören, sind rot eingerahmt. **B** Übereinandergelegte (¹⁵N-¹H)-HSQC-Spektren von HckSH3 nach Verdrängung von HIV-1 Nef durch PD1 (schwarz, entspricht grüner Darstellung in A) und des HckSH3:PD1-Komplexes (rot, entspricht blauer Darstellung in Abbildung 1.12). Die Übereinstimmung der beiden Spektren weist darauf hin, dass PD1 HIV-1 Nef vom Nef:HckSH3-Komplex verdrängen kann und danach in gleicher Weise an HckSH3 bindet wie im Falle der PD1-Titration zu HckSH3 (nach Tran, 2005).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die hämatopoetische Zell-Kinase Hck ist eine zytoplasmatische Protein-Tyrosin-Kinase vom Src-Typ, die in hämatopoetischen B-lymphoiden und myeloiden Zellen exprimiert wird. Sie besitzt regulatorische Aufgaben in verschiedensten Zell-Signaltransduktionswegen, die Wachstum, Reifung und Differenzierung der Zellen sowie deren Funktionen wie Bewegung, Adhäsion, Apoptose und Phagozytose beeinflussen.

Sie ist zudem in verschiedene Immunkrankheiten wie Leukämie involviert (Hu et al., 2004; Klejman et al., 2002). Das HI-Virus besitzt Effektormoleküle (Nef und Vif) die mit Hck interagieren und so Pathologie und Persistenz steigern (Briggs et al., 1997; Tokunaga et al., 1998; Chang et al., 2001; Hassaine et al., 2001).

Die SH3-Domäne von Hck ist eine nicht-katalytische Domäne, die Protein-Protein-Wechselwirkungen vermittelt. Sie reguliert die Kinaseaktivität von Hck und ist mitverantwortlich für dessen Lokalisation und Substraterkennung. Die SH3-Domäne hat eine globuläre Form mit einer hydrophoben Bindungsstelle. Sie besteht aus einem β-barrel zweier β-Faltblätter mit je drei antiparallelen β-Strängen, die durch drei Loopregionen und eine kurze 3₁₀-Helix voneinander getrennt werden. Sie bindet prolinreiche Liganden, die

eine PPII-Helix-Konformation ausbilden und erkennt die Konsensussequenzen +pXPpXP (Klasse I) und xPpXPp+ (Klasse II; Kapitel 1.3.2).

Ziel dieser Arbeit ist die NMR-spektroskopische Raumstrukturbestimmung der Hck SH3-Domäne im Komplex mit einem artifiziellen, hochaffinen Peptidliganden (PD1) unter Lösungsbedingungen. Da bisher nur Strukturbestimmungen von freier und intramolekular gebundener HckSH3 durchgeführt wurden, ist dies die erste Komplexstruktur der Hck SH3-Domäne.

Mit Hilfe der Raumstruktur sollen die Bindungseigenschaften von HckSH3 untersucht werden. Da die Funktion von Proteinen durch deren Interaktion mit anderen Proteinen bestimmt wird, ist ein grundlegendes Verständnis dieser Wechselwirkungen von großem Interesse. Die Raumstrukturaufklärung ist bei der Charakterisierung eben dieser Interaktionen auf molekularer Ebene sehr hilfreich.

Die Wechselwirkung der Hck SH3-Domäne mit dem HIV-1 Nef-Protein, die zum Abbau von MHC-I-Rezeptoren und erhöhter Virusreplikation und -infektiosität führt, zeigt, wie essentiell das Verständnis solcher Protein-Protein-Interaktionen ist. Durch die Aufklärung der bindungsbestimmenden Parameter könnten z.B. therapeutisch relevante Moleküle entwickelt werden, die solche Wechselwirkungen spezifisch verhindern können.

Von besonderem Interesse im hier untersuchten Komplex ist, dass der Peptidligand PD1 eine für SH3-Domänen des Src-Typs unübliche Aminosäuresequenz besitzt. Statt des basischen Ankerrestes an Position P₋₃ befindet sich hier ein hydrophober Tyrosinrest (Tyr4). Interessanterweise besitzt das PD1-Peptid mit einem K_D -Wert von $0,23\mu\text{M}$ für die HckSH3-Bindung mit die höchste bisher bekannte Affinität eines Peptidliganden an eine SH3-Domäne. Die Wechselwirkung von HckSH3 mit dem PD1-Peptid ist zudem noch interessant, da das Peptid in der Lage zu sein scheint, an die SH3-Domäne gebundenes HIV-1 Nef zu verdrängen.

Um weitere Informationen über die Bindungseigenschaften der SH3-Domäne zu erhalten, soll die Raumstruktur von HckSH3 im Komplex mit dem PD1-Peptid mit den Strukturen der freien und der intramolekular gebundenen Hck SH3-Domänen verglichen und auf Unterschiede, die eine biologische Relevanz besitzen könnten, untersucht werden.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

Bakterienstamm: BL21

Genotyp: F^- , *ompT*, *hsdS_B*, (*r_B⁻*, *m_B⁻*), *dcm*, *gal*

Referenz: (Grodberg & Dunn, 1988)

Plasmid: pGEX-6P2-HckSH3

Resistenz: Ampicillin

Eigenschaft: Expressionsvektor mit integriertem *hck₆₀₋₁₄₀*-Gen

Quelle: Tuyen Tran (Tran, 2005)

In dieser Arbeit wurde die Aminosäuresequenz-Nummerierung der humanen p60^{*hck*} verwendet (Swiss-Prot Eintragsnummer P08631).

2.1.2 Peptide

Das Peptide PD1 und PD1-Y(-4)R wurden von der Firma Jerini BioTools GmbH (Berlin), die Peptide PD1-Y(-3)A und PD1-K(-4)A von der Firma PANATecs GmbH (Tübingen) mit einem Reinheitsgrad > 95% synthetisiert und sind aminoterminal acetyliert und carboxyterminal amidiert.

Tabelle 2.1: Verwendete synthetische Peptide

Name	Aminosäuresequenz (N→C)
PD1	Ac-HSKYLPPLPSL-NH ₂
PD1-Y(-4)R	Ac-HSKRPLPPLPSL-NH ₂
PD1-Y(-3)A	Ac-HSKAPLPPLPSL-NH ₂
PD1-K(-4)A	Ac-HSAYLPPLPSL-NH ₂

2.1.3 Enzyme und Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Chemikalien sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2: Verwendete Enzyme und Chemikalien

Name	Firma
Acrylamid 4K Lösung (30%; Mix 29:1)	Appllichem, Darmstadt
Ammoniumchlorid [¹⁵ N]	Euriso-top, Saint-Aubin Cedex, Frankreich
Complete-Protease-Inhibitor-Tabletten	Roth, Karlsruhe
DNase A	Appllichem, Darmstadt
Glukose [¹³ C]	Euriso-top, Saint-Aubin Cedex, Frankreich
Glutathion, reduziert	Sigma, München
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Biosciences, Freiburg
Isopropyl- β -D-Thiogalactosid (IPTG)	Boehringer, Mannheim
Lysozym	AppliChem, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
PreScission-Protease	Amersham Biosciences, Freiburg
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt

Hier nicht aufgeführte Standardchemikalien wurden von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma (München) bezogen.

2.1.4 Sonstige Materialien

Tabelle 2.3: Sonstige verwendete Materialien

Name	Firma
Spectra/Por-Dialyseschlauch (MWCO: 3500 Da)	Roth, Karlsruhe
Minisart Sterilfilter (0,22 μ m)	Sartorius, Göttingen
Ultrafiltrationskonzentratoren (MWCO: 3000 Da)	Amicon, Beverly, USA

Die restlichen verwendeten Verbrauchsmaterialien stammten von den Firmen VWR International (Darmstadt), Eppendorf (Wesseling-Berzdorf) und Sartorius (Göttingen).

2.1.5 Datenbanken

Für die Protein-/DNA-Sequenz-Datenbankrecherchen wurde die SwissProt/TrEMBL-Datenbank verwendet (<http://www.expasy.org/sprot/sprot-top.html>). Die DNA- und Proteinsequenz der humanen Hck besitzt die Eintragsnummer P08631.

Zur Analyse der Proteinsequenz (Extinktionskoeffizient, Molekularmasse, theoretischer isoelektrischer Punkt) wurde das ProtParam-Tool des ExPASy Proteomics Server genutzt (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>).

Für die Strukturvergleiche zwischen der Hck SH3-Domäne mit bereits bekannten Raumstrukturen wurde die RCSB Protein Datenbank (PDB) benutzt (<http://www.rcsb.org/pdb/index.html>). Die verwendeten Strukturen sind in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Die Untersuchung von Interaktionsvorhersagen für SH3-Liganden wurde mit dem SH3-SPOT Algorithmus (<http://cbm.bio.uniroma2.it/ispot/>) durchgeführt.

Tabelle 2.4: Verwendete Vergleichsstrukturen

PDB-Eintrag	Name	Referenz
4HCK	Lösungsstruktur der freien Hck SH3-Domäne	Horita et al., 1998
1AD5	Kristallstruktur der inaktiven Hck	Sicheri et al., 1997
1QCF	Kristallstruktur der inaktiven Hck	Schindler et al., 1999
1BU1	Kristallstruktur der freien Hck SH3-Domäne	Arold et al., 1998
1FYN	Kristallstruktur des FynSH3:3BP2-Komplexes	Musacchio et al., 1994
1QWF	Lösungsstruktur des c-SrcSH3:VSL12-Komplexes	Feng et al., 1995
1RLP	Lösungsstruktur des c-SrcSH3:RLP2-Komplexes	Feng et al., 1994
1ABO	Kristallstruktur des AblSH3:3BP1-Komplexes	Musacchio et al., 1994
1BBZ	Kristallstruktur des AblSH3:p41-Komplexes	Pisabarro et al., 1998
1PRM	Lösungsstruktur des c-SrcSH3:PLR1-Komplexes	Feng et al., 1994
1FMK	Kristallstruktur der inaktiven c-Src	Xu et al., 1997

Die Raumstruktur des Hck-SH3:PD1-Komplexes ist in der Proteindatenbank (PDB) unter dem PDB-ID-Kode 2A4Y (<http://www.rcsb.org/pdb/index.html>), die Zuordnung des Komplexes in der BioMagResBank (BMRB) unter der Eintragsnummer 6581 (<http://www.bmrwisc.edu/index.html>) hinterlegt.

2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Laemmli)

Die Analyse von Proteinen wurde durch Auftrennung mittels einer diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt (Laemmli, 1970). Das Detergenz Natriumdodecylsulfat lagert sich an die Proteine an, so dass anionische Mizellen entstehen, die die Proteinladungen abschirmen. Durch das Anlegen einer Spannung erfolgt somit im Gel eine Proteinauftrennung nach Ladung pro Masse.

Zur Massenabschätzung der in den aufgetrennten Banden befindlichen Proteine wurde der "Protein Molecular Weight Marker" (MBI Fermentas) verwendet.

Für die SDS-PAGE wurden folgende Lösungen und Puffer verwendet:

5% Sammelgel	15% Trenngel
16,8% (v/v) Acrylamid (30%)	50% (v/v) Acrylamid (30%)
125 mM Tris-HCl, pH 6,8	375 mM Tris-HCl, pH 8.8
0,1% (w/v) SDS	0,1% (w/v) SDS
0,1% (v/v) APS (10%)	0,1% (v/v) APS (10%)
0.1% (v/v) TEMED	0.04% (v/v) TEMED
SDS-Laufpuffer	4x-Probenpuffer
385 mM Glycin	200 mM Tris, pH 6.8
50 mM Tris-HCl	40%(v/v) Glycerin
0.1% (w/v) SDS	8% (w/v) SDS
pH 8,3	8% (v/v) β -Mercaptoethanol
	3 g/l Bromphenolblau

Die hier verwendeten Gele hatten eine Größe von 10 cm \times 10,5 cm \times 0.75 cm. Bis zu 20 μ g Protein wurden im Verhältnis 4:1 mit dem Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Für Proteinuntersuchungen in Bakterienzellen wurde das Pellet von 0,5 ml Bakteriensuspension mit OD₆₀₀=1,0 in 50 μ l 1x Probenpuffer aufgenommen. Die Elektrophorese erfolgte bei 40 mA/Gel für 45 min in einer vertikalen Plattenelektrophoresekammer (Mighty Small II, Hoefer/Amersham Biosciences, Freiburg). Die Färbung der SDS-Gele erfolgte mit Coomassie-Färbelösung, in der das Gel kurz aufgeköcht wurde. Zur Entfärbung wurde das Gel anschließend in H₂O erhitzt. Danach wurden die Gele mit dem Gerät "Gel Doc 2000" (Bio-Rad, München) dokumentiert.

Verwendete Lösung:

Coomassie-Färbelösung
25% (v/v) Isopropanol
10% (v/v) Essigsäure
0,5 g/l Coomassie Brilliant Blue R-250 in H ₂ O

2.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt (Gleichung 2.1,

$$c = \frac{E}{\epsilon \cdot d} \quad (2.1)$$

wobei c die Konzentration des absorbierenden Materials ist, ϵ der Extinktionskoeffizient und d die Weglänge des Lichts durch das absorbierende Material.

Die Extinktion E wird durch die Extinktion der Seitenketten von aromatischen Aminosäuren bei 280 nm mittels UV/VIS-Spektrometer bestimmt (Lambda 25, PerkinElmer, Skelton, MA, USA), der Extinktionskoeffizient ϵ wird aus der Zusammensetzung der aromatischen Aminosäuren ermittelt (Gill & von Hippel, 1989) die Weglänge d entspricht der Schichtdicke der Küvette.

Das Protein wurde zur Messung in einen denaturierenden Puffer aufgenommen.

Verwendete Puffer:

Extinktionsbestimmungspuffer
6 M Guanidin-Hydrochlorid
20 mM NaPO ₄
pH 6,8

2.4 Reinigung des rekombinanten Proteins HckSH3

2.4.1 Expression von rekombinantem HckSH3

Die Zellanzucht erfolgte in mit Schikanen versehenen Erlenmeyerkolben bei 37°C in einem Schüttler bei 200 rpm (Unitron, Infors-HT, Einsbach).

Eine Vorkultur von 50 ml LB-Flüssigmedium (Luria & Burrous) oder zur Isotopenmarkierung von 50 ml M9-Flüssigmedium (Sambrook et al., 1989) wurde mit 100 μ M des Antibiotikums Ampicillin versetzt, mit einer Kolonie von einer LB-Platte oder mit einer Glycerinkultur inokuliert und über Nacht inkubiert. Danach wurde die Vorkultur zentrifugiert (2 min, 4000 g, RT; 5804R, Eppendorf, Hamburg), das Pellet in frischem Medium resuspendiert und damit die Expressionskultur auf eine OD₆₀₀ von etwa 0,1 angeimpft und wiederum unter schütteln inkubiert. Bei Erreichen einer Bakteriendichte von OD₆₀₀ 0,6 - 0,8 wurde die Proteinexpression durch Induktion mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) gestartet und 5 h unter Schütteln bei 37°C weiter inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation (15 min, 10000 g, 4°C; Avanti J-20 XP, Beckmann Coulter, Fullerton, USA) pelletiert und bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

Die Kontrolle der Überexpression des Proteins erfolgte durch Probennahme vor Induktion und zu verschiedenen Zeiten während der Expression und Analyse dieser mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.2).

Verwendete Medien:

LB-Medium	M9-Minimalmedium
10 g/l Trypton	9,1 g/l NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O
5 g/l Hefeextrakt	4 g/l Glukose (2 g/l [¹³ C]-Glukose)
10 g/l NaCl	3 g/l KH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O
	0,5 g/l NH ₄ Cl
	0,5 g/l NaCl
	2 mM MgSO ₄
	100 μM CaCl ₂
	10 μM Fe(III)citrat
	0,2% (v/v) TS2
	5 mg/l Thiaminhydrochlorid
	Vitamincocktail
TS2	Vitamin-Cocktail
900 mg/l Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1 mg/l d-Biotin
300 mg/l H ₃ BO ₃	1 mg/l Cholinchlorid
200 mg/l CoCl ₂ · 6H ₂ O	1 mg/l Folsäure
58,8 mg/l ZnSO ₄ · H ₂ O	1 mg/l Natrium-D-panthothenat
30 mg/l MnCl ₂ · 4H ₂ O	1 mg/l Nicotinamid
20 mg/l NiCl ₂ · 6H ₂ O	1 mg/l Pyridoxalhydrochlorid
20 mg/l Na ₂ SeO ₃	1 mg/l Riboflavin
10 mg/l CuCl ₂ · 2H ₂ O	

2.4.2 Zellaufschluss

Die Zellpellets wurden zum Aufschluss in 40 ml GST-Lysispuffer pro Gramm Nasszellgewicht aufgenommen und auf Eis resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension 3x 30 s mittels einer Ultraschallspitze auf Eis sonifiziert (Branson Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, USA), danach 2 h unter rühren auf Eis inkubiert und wiederum 3x 30 s sonifiziert. Durch Zentrifugation (45 min, 50000 g, 4°C; Beckmann-Zentrifuge) wurden nicht aufgeschlossene Zellen und Zellwandbestandteile vom zellfreien Rohextrakt abgetrennt und dieser für die weitere Reinigung verwendet.

Die Kontrolle des Zellaufschlusses erfolgte durch Probennahme vor und nach Zellaufschluss und Analyse dieser mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.2).

Verwendete Puffer:

10x PBS	GST-Lysispuffer
1,4 M NaCl	1x PBS
100 mM Na ₂ HPO ₄	5 mM DTT
27 mM KCl	0.5% (w/v) Triton X-100
18 mM KH ₂ PO ₄	20 μg/ml DNase A
pH 7,3	20 μg/ml Lysozym
	1 Complete-Protease-Inhibitor-Tablette

2.4.3 Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose

HckSH3 wurde als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST) exprimiert. Daher konnte das Protein mittels Glutathion-Sepharose 4B (GSH-Sepharose; Amersham Biosciences, Freiburg) von Verunreinigungen im zellfreien Rohextrakt abgetrennt werden. Mit HckSH3 fusionierte GST bindet an den Liganden Glutathion, der kovalent an die Sepharose gekoppelt ist. Die anschließende Elution des GST-Fusionsproteins erfolgt durch reduziertes Glutathion.

Der zellfreie Rohextrakt wurde auf eine Chromatographiesäule (Amersham Biosciences, Freiburg) mit 1 ml GSH-Sepharose pro Gramm Nasszellgewicht aufgetragen, welche zuvor mit 5 Säulenvolumen GST-Bindungspuffer äquilibriert wurde. Nach dem Auftrag wurde die Säule mit 20 Säulenvolumen eines 4°C kalten Bindungspuffers gewaschen und das Fusionsprotein anschließend in 5 Schritten von je einem Säulenvolumen GST-Elutionspuffer eluiert.

Die Kontrolle der Reinigung erfolgte durch Probennahmen von Überstand, Durchfluss, Waschdurchfluss, den Elutionen und des Säulenmaterials nach Elution mit Analyse dieser durch eine SDS-PAGE (Kapitel 2.2).

Verwendete Puffer:

GST-Bindungspuffer	GST-Elutionspuffer
1x PBS	50 mM Tris-HCl, pH 8.0
5 mM DTT	10 mM reduziertes Glutathion
0.1% (w/v) Triton X-100	

2.4.4 Abspaltung des GST-Affinitäts-tags mittels PreScission-Protease

Das GST-HckSH3-Fusionsprotein enthält zwischen dem GST-tag und der Hck SH3-Domäne eine Erkennungssequenz für die PreScission-Protease (LEVLFQ/GP; Amersham Biosciences, Freiburg), so dass der aminoterminal GST-Affinitäts-tag von HckSH3 abgespalten werden kann.

Hierzu wurden die Elutionsfraktionen, die das Fusionprotein enthielten, vereinigt, in einen Dialyseschlauch mit einer Molekulargewichtausschlussgrenze (MWCO) von 3500 Da überführt (Spectra/Por-Dialyseschlauch, Roth, Karlsruhe) und dreimal gegen jeweils 1 l PreScission-Spaltspuffer für je mindestens 3 h dialysiert.

Anschließend wurde das Volumen mittels Ultrafiltrations-Konzentratoren mit einer MWCO von 3000 Da bis auf etwa 5 ml aufkonzentriert (Amicon, Beverly, USA).

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV/VIS-Spektrometer (Kapitel 2.3) wurden 5 U PreScission-Protease pro mg Protein zugegeben und für 2 h bei 4°C inkubiert. Die Kontrolle der Proteolyse erfolgte durch Probennahmen vor der Zugabe und zu verschiedenen Zeiten während der Spaltung mit Analyse dieser durch eine SDS-PAGE (Kapitel 2.2).

Zur Trennung des HckSH3-Proteins von der Protease und vom abgespaltenen GST-*tag* diente eine Größenausschlusschromatographie.

Verwendete Puffer:

PreScission-Spaltpuffer
50 mM Tris-HCl, pH 7.0
150 mM NaCl
1 mM DTT
1 mM EDTA

2.4.5 Größenausschluß-Chromatographie

Die Größenausschlusschromatographie trennt gelöste Moleküle durch ihre unterschiedliche Permeabilität durch eine poröse Gelmatrix mit definierter Porengröße, die sie aufgrund ihres Molekulargewichtes und ihrer Form haben. Somit können Moleküle abhängig von ihrer Größe unterschiedlich tief in die Gelmatrix eindringen, legen dadurch einen entsprechend unterschiedlich langen Weg durch die Säule zurück und werden somit zu unterschiedlichen Zeiten eluiert, wobei sie umso früher eluiert werden, je größer sie sind. Um das HckSH3-Protein vom abgespaltenen GST-Affinitäts-*tag* sowie von der PreScission-Protease zu trennen, wurde eine Größenausschlusschromatographie mittels einer "HiLoad 26/60 Superdex 75 pg"-Säule durchgeführt (Amersham Biosciences, Freiburg).

Dazu wurde die Säule zunächst mit 1,5 Säulenvolumen NMR-Puffer äquilibriert und die Probe direkt nach der Proteolyse auf die Säule injiziert. Die Größenausschlusschromatographie erfolgte mit einem Fluss von 1,5 ml/min bei einem Gesamtvolumen von 500 ml NMR-Puffer. Die Elution wurde in Fraktionen von 4,5 ml Volumen gesammelt. Mittels eines UV-Messgerätes wurde die Extinktion bei 280 nm gemessen und über einen Schreiber aufgezeichnet.

Die Fraktionen, die eine Extinktion bei 280 nm aufwiesen, wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Fraktionen, die das HckSH3-Protein in ausreichender Reinheit enthielten (> 95%) wurden vereinigt, mittels Ultrafiltrations-Konzentratoren (MWCO=3000 Da) bis zu 3 mM aufkonzentriert und bis zum weiteren Gebrauch lyophilisiert.

Verwendete Puffer:

NMR-Puffer
20 mM KPO ₄
20 mM NaCl
pH 6.7

2.5 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine Methode zur Untersuchung zahlreicher struktureller und dynamischer Eigenschaften von Biomolekülen. Bei der Fluoreszenzspektroskopie wird ein System mit fluoreszenten Eigenschaften durch Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge in einen elektronisch angeregten Zustand versetzt. Durch spontane Emission von Licht, welches detektiert wird, fällt das System in seinen Grundzustand zurück.

Die hier verwendete Methodik der Fluoreszenz-Titration dient zur Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D -Wert) einer Substrat-Liganden-Wechselwirkung. Dabei wird ein mit einem fluoreszierenden Dye (Fluorophor) markiertes Substrat vorgelegt und der Ligand in mehreren Schritten hinzugeben. Durch die Bindung des Liganden an das Substrat und die damit verbundenen Konformationsänderungen (Änderung der chemischen Umgebung) verändern sich auch die fluoreszenten Eigenschaften des Fluorophors. Die Messung dieser Fluoreszenzänderung dient zur Berechnung des K_D -Wertes der Bindung (Kapitel 2.5.1).

Die Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und vor allem Tryptophan besitzen intrinsische fluoreszierende Eigenschaften, so dass diese Reste bei Proteinen ebenfalls für die Fluoreszenz-Titration verwendet werden können. Da im Fall von HckSH3 zwei Tryptophanreste im Bereich der bekannten Peptid-Bindungsstelle liegen (W113 und W114), wurden diese zur Messung der Fluoreszenzänderung bei Zugabe der Peptidliganden verwendet. Die Anregungswellenlänge des Tryptophan-Indolrings liegt bei etwa 280 nm, die Fluoreszenzemission bei 300 bis 350 nm (Lottspeich & Zorbas, 1998).

Die Messungen wurden an einem PerkinElmer LS55 Luminescence Photometer (PerkinElmer, Boston, USA) durchgeführt, die Anregungswellenlänge wurde auf 290 nm eingestellt und der Detektor auf die Emissionswellenlänge von 345 nm justiert, die Spaltbreite betrug je 6 nm für beide Wellenlängen. Es wurden 0,5 μ M HckSH3 in 1,6 ml PBS-Puffer mit 1 mM DTT in einer 2 ml Quarzküvette (Hella, Müllheim) bei 21,5°C (Thermo Haake 10) vorgelegt. Die in H₂O gelösten Peptide wurden in verschiedenen Konzentrationen unter rühren hinzu titriert und die Fluoreszenzintensität nach einer Minute Wartezeit für 30 Sekunden aufgenommen (300 Datenpunkte). Sobald keine signifikanten Änderungen der Tryptophan-Fluoreszenz mehr erkennbar waren, wurde die Titration beendet. Die Titrationsreihen wurden durch Mehrfachbestimmungen verifiziert, die Hintergrundfluoreszenz durch eine Kontrollmessung bestimmt, bei der statt der Peptide H₂O zu HckSH3 gegeben wurde. Bei Peptiden, die ein Tyrosinrest in ihrer Aminosäuresequenz besitzen, musste bei der Kontrollmessung Tyrosinamid in gleicher molarer Konzentration zu HckSH3 titriert werden, da sich die Fluoreszenzanregungs- und -emissionswellenlängen von Tyrosin (Anregungswellenlänge 274 nm, Emissionswellenlänge etwa 300 nm) und Tryptophan überschneiden.

2.5.1 Dissoziationskonstanten-Bestimmung mittels Fluoreszenzspektroskopie

Die Bindungsaffinität zweier Proteine lässt sich durch die Dissoziationskonstante (K_D -Wert) charakterisieren. Sie ist definiert als der Quotient aus Assoziationsrate und Dissoziationsrate des Komplexes oder der Konzentrationen der dissoziierten Moleküle und der Konzentration der assoziierten Moleküle in einer Lösung (Gleichung 2.2).

$$K_D = \frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{[S] \cdot [L]}{[SL]} \quad (2.2)$$

K_D = Dissoziationskonstante [M]

k_{on} = Assoziationsrate des Komplexes [s^{-1}]

k_{off} = Dissoziationsrate des Komplexes [s^{-1}]

[S] = Konzentration des freien Substrats [M]

[L] = Konzentration des freien Liganden [M]

[SL] = Konzentration des Komplexes aus Substrat und Ligand [M]

Zur Bestimmung des K_D -Wertes der HckSH3:PD1-Bindung aus den Fluoreszenz-Titrationsexperimenten wurden die 300 Datenpunkte pro Titrationsschritt gemittelt und die Werte der Kontrollmessung abgezogen. Anschliessend wurde der K_D -Wert durch nichtlineare Regression unter Annahme einer einfachen biomolekularen Reaktion (nach Gleichung 2.3) mit Hilfe des Programms SigmaPlot (Version 8.0) aus den Daten abgeschätzt.

$$F = F_{min} + \left(\frac{[S_{ges}] + [L_{ges}] + K_D}{2} - \sqrt{\frac{([S_{ges}] + [L_{ges}] + K_D)^2}{4} - [S_{ges}] \cdot [L_{ges}]} \right) \cdot \frac{(F_{max} - F_{min})}{S_{ges}} \quad (2.3)$$

K_D = Dissoziationskonstante [M]

F = Fluoreszenzintensität des Substrats bei der entsprechenden Ligandenkonzentration

F_{min} = Fluoreszenzintensität des Substrats bei Titrationsstart

F_{max} = Fluoreszenzintensität des Substrats bei gesättigter Ligandenkonzentration

[S_{ges}] = Gesamtkonzentration des Substrats [M]

[L_{ges}] = Gesamtkonzentration des Liganden [M]

2.6 Kernresonanzspektroskopie

Die NMR-Experimente wurden an Varian *UNITY INOVA*-Spektrometern durchgeführt mit Protonenresonanzen von 600 MHz bzw. 800 MHz. Es wurden Varian 5 mm Z-PFG- $^1\text{H}\{^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}\}$ - und XYZ-PFG- $^1\text{H}\{^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}\}$ -Probenköpfe verwendet. Die Experimente wurden bei 25°C durchgeführt. Zur Prozessierung der NMR-Spektren wurden die Programme VNMRJ (Version 1.1d; Varian, Inc.) oder NMRPipe (Version 2.3; Delaglio et al., 1995) verwendet, das Programm CARA (Version 1.3.1; Keller, 2004) wurde für die Visualisierung und Analyse der NMR-Spektren genutzt.

2.6.1 Probenvorbereitung

Die NMR-Probenröhrchen (BMS-005V; Shigemi, Tokio) wurden mit sterilem Wasser ausgespült und in Vakuum getrocknet. Das [U - ^{13}C , U - ^{15}N]-HckSH3-Protein befand sich nach der Größenausschlusschromatographie bereits in NMR-Puffer, wurde auf 1,3 mM konzentriert und mit 7% (v/v) D_2O und 0,02% Natriumazid versetzt. Das lyophilisierte, nicht-isotopenangereicherte Peptid PD1 wurde ebenfalls in NMR-Puffer aufgenommen und im äquimolaren Verhältnis zur HckSH3-Probe hinzugegeben, welche für die Strukturbestimmung des HckSH3:PD1-Komplexes verwendet wurde.

2.6.2 NMR-Experimente

Die Quadraturdetektion in den indirekten Spektraldimensionen wurde mittels der States-TPPI-Methode erreicht (Marion et al., 1989b). Für die Breitband- $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Entkopplung wurden in der Regel GARP-Sequenzen verwendet (Shaka & Keeler, 1987). Als Mischsequenz während der TOCSY-Spinlockperioden wurde das DIPSI-3-Schema verwendet (Shaka et al., 1988), die ^1H -Breitbandentkopplung wurde durch die WALTZ-16-Sequenz erreicht (Shaka et al., 1983).

Die ^1H -chemische Verschiebungen wurden auf externes DSS referenziert ($\delta_{\text{DSS}}=0,0$ ppm). Die ^{13}C - und ^{15}N -chemische Verschiebungen wurden mittels der Frequenzverhältnisse $\nu(^1\text{H})/\nu(^{13}\text{C})=0,251449530$ und $\nu(^1\text{H})/\nu(^{15}\text{N})=0,101329118$ indirekt auf die ^1H -Methylfrequenz von DSS referenziert (Wishart et al., 1995).

Die Parameter aller verwendeten NMR-Experimente sind in Tabelle 2.5 dargestellt.

Tabelle 2.5: Akquisitions- und Prozessierungsparameter der verwendeten NMR-Experimente. sw1 bis sw3: aufgenommene spektrale Weite in der jeweiligen Dimension, t1 bis t3: aufgenommene komplexe Punkte in der jeweiligen Dimension, nt: Anzahl der Wiederholung der Experimente, d1: Delayzeit zwischen zwei Experimenten, mix: Mischzeit in TOCSY- oder NOESY-Experimenten, $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$: Trägerfrequenz für den jeweiligen Kern, ω_1 bis ω_3 : Anzahl der realen Punkte nach Prozessierung (Fourier-Transformation, Zero-Filling und Einschränkung der spektralen Weite) in der jeweiligen Dimension.

Experiment	sw1 [ppm]	t1 [Pkt]	sw2 [ppm]	t2 [Pkt]	sw3 [ppm]	t3 [Pkt]	nt	d1 [s]	mix [ms]	^{15}N [ppm]	^{13}C [ppm]	ω_1 [Pkt]	ω_2 [Pkt]	ω_3 [Pkt]
2D (^{15}N - ^1H)-HSQC (HckSH3)	20,0	2040	26,4	200	-	-	4	1,25	-	119,2	-	799	4096	-
2D (^{15}N - ^1H)-HSQC	20,0	2048	27,6	400	-	-	2	1,25	-	119,5	-	799	4096	-
2D (^{15}N - ^1H)-HSQC (HckSH3; D_2O)	14,0	1434	28,8	160	-	-	4	1,20	-	119,2	-	2344	4096	-
2D (^{15}N - ^1H)-HSQC (D_2O)	14,0	1434	28,8	160	-	-	4	1,20	-	119,2	-	2344	4096	-
2D (^{13}C - ^1H)-HSQC (aliphatisch)	16,3	1534	67,1	700	-	-	16	1,40	-	-	41,9	757	2048	-
2D (^{13}C - ^1H)-HSQC (aromatisch)	16,3	1534	27,3	146	-	-	32	1,40	-	-	126,5	1008	4096	-
2D (HB)CB(CGCD)HD (aromatisch)	16,3	1534	19,9	66	-	-	128	1,50	-	-	36,6	2268	4096	-
2D (HB)CB(CGCDCE)HE (aromatisch)	16,3	1534	19,9	66	-	-	256	1,50	-	-	36,6	2268	4096	-
3D HNHA	20,0	1536	11,3	220	27,5	76	8	1,00	-	119,5	-	359	512	256
3D HNCO	20,0	2048	11,5	80	27,5	76	4	1,25	-	119,5	176,1	359	512	256
3D HNCACB (HckSH3)	20,0	1536	57,7	200	26,4	52	16	1,40	-	119,2	46,8	359	512	128
3D HNCACB	20,0	1536	58,0	240	27,5	82	8	1,00	-	119,5	44,8	359	512	256
3D HN(CO)CA (HckSH3)	20,0	2040	27,2	110	26,4	60	8	1,20	-	119,2	54,6	359	512	128
3D H(CCO)NH	20,0	1536	9,7	200	27,5	80	8	1,50	12,1	119,5	-	359	512	512
3D (H)C(CO)NH	20,0	1536	66,3	256	27,5	76	8	1,50	12,1	119,5	40,2	359	512	256
3D HCCH-COSY	20,0	1536	9,5	180	63,0	230	8	1,35	-	-	41,7	615	322	512
3D HCCH-TOCSY	20,0	2040	9,5	190	63,0	220	4	1,30	15,6	-	41,7	615	322	512
3D (^1H - ^1H - ^{15}N)-NOESY-HSQC	16,3	2048	10,8	340	27,6	84	8	1,52	120	119,7	-	442	1024	128
3D (^1H - ^{13}C - ^1H)-HSQC-NOESY (aliphat.)	16,3	1534	6,1	140	37,2	140	16	1,13	100	-	29,2	1260	1024	256
3D (^1H - ^{13}C - ^1H)-HSQC-NOESY (aromat.)	16,3	1534	2,3	80	22,3	180	16	1,50	150	-	124,9	1260	512	256
2D ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$)-gefiltertes COSY	16,7	1400	10,8	400	-	-	128	1,50	-	-	-	8192	2048	-
2D ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$)-gefiltertes TOCSY	16,7	2002	10,8	400	-	-	128	1,50	100	-	-	5401	2048	-
2D ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$)-gefiltertes NOESY	16,7	3072	10,8	400	-	-	96	2,00	120	-	-	8192	2048	-
3D ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$)-gefilt./edit. NOESY-HSQC	15,0	1536	10,6	200	39,4/ 97,8	100	16	1,30	150	119,7	67,3	2048	512	128

2.6.2.1 Experimente zur Resonanzzuordnung

Für die Proben des HekSH3:PD1-Komplexes und die von freier HekSH3 wurden zunächst eindimensionale Protonenspektren aufgenommen, die Unterdrückung des Wassersignals erfolgte durch die WATERGATE-Technik (Piotto et al., 1992).

Als Ausgangsspektren für die Zuordnung von freier [U - ^{13}C , U - ^{15}N]-HekSH3 wurde ein heteronukleares 2D Einbindungs-Korrelationsexperiment (HSQC) für die (1H , ^{15}N)-Korrelationen (Bodenhausen & Ruben, 1980; Grzesiek & Bax, 1993) aufgenommen. Für den Komplex von [U - ^{13}C , U - ^{15}N]-HekSH3 und PD1 zusätzlich ein 2D-HSQC für (1H , ^{13}C)-Korrelationen (Kay et al., 1992). Die (1H , ^{13}C)-Korrelationen wurden in getrennten Spektren für die aliphatischen und aromatischen Kohlenstoff-Verschiebungsbereiche aufgenommen.

Die sequenzspezifische Resonanzzuordnung wurde mit Hilfe folgender 3D Tripelresonanzspektren vorgenommen:

Für die Probe von freier HekSH3 wurden ein 3D HNCACB- (Wittekind & Mueller, 1993) und ein 3D HNCOCA-Spektrum (Yamazaki et al., 1994) aufgenommen, da hier nur die Amidprotonen zugeordnet werden sollten. Die Bindung des Peptids PD1 an die Hek SH3-Domäne zeigt einen langsamen Austausch relativ zur NMR-Zeitskala. Die hohe Bindungsaffinität von PD1 zu HekSH3 resultiert in einer langsamen Austauschrate zwischen freiem und gebundenem Zustand von HekSH3 relativ zu den Änderungen der chemischen Verschiebungen zwischen den beobachteten Resonanzfrequenzen der N- und H^N -Kerne des HekSH3-Proteins im freien und gebundenen Zustand. Dadurch verschwinden die (1H , ^{15}N)-Korrelationssignale von freier HekSH3 im (^{15}N - 1H)-HSQC-Spektrum bei Zugabe des Peptids und die (1H , ^{15}N)-Korrelationssignale von PD1-gebundener HekSH3 tauchen bei anderen chemischen Verschiebungen auf. Somit muß die Zuordnung der Amidgruppen-Resonanzen von HekSH3 im freien und gebundenen Zustand getrennt erfolgen, um die Bindungsstelle anhand des (^{15}N - 1H)-HSQC zu kartieren.

Im Fall des HekSH3:PD1-Komplexes wurden für die Zuordnung der Proteintrückgrat-Atome ein HNCO- (Ikura et al., 1990), ein HNCACB- und ein HNHA-Spektrum (Vuister & Bax, 1993) verwendet. Die Aminosäure-Seitenketten wurden mittels HCCH-COSY- (Bax et al., 1990), HCCH-TOCSY- (Mischzeit 15,6 ms; Bax et al., 1990), (H)C(CO)NH-TOCSY- (Mischzeit 12,1 ms; Grzesiek et al., 1993) und H(CCO)NH-TOCSY-Experimenten (Mischzeit 12,1 ms; Grzesiek et al., 1993) zugeordnet. Für die Zuordnung der aromatischen Seitenketten diente zusätzlich ein 2D-(HB)CB(CGCD)HD- (Yamazaki et al., 1993) und ein 2D-(HB)CB(CGCDCE)HE-Spektrum (Yamazaki et al., 1993). Außerdem wurde ein aromaten selektives (1H - ^{13}C - 1H)-HSQC-NOESY-Spektrum zur Hilfe genommen. Für die Zuordnung der Seitenketten-Amidgruppen diente ein (1H - 1H - ^{15}N)-NOESY-HSQC-Spektrum (Kapitel 2.6.2.2).

Für die Zuordnung der Protonenresonanzen von PD1 wurden 2D isotopengefilterte Experimente aufgenommen:

Ein (^{13}C / ^{15}N)-gefiltertes COSY-, ein (^{13}C / ^{15}N)-gefiltertes TOCSY- (Mischzeit 100 ms)

und ein ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$)-gefiltertes NOESY-Spektrum (Mischzeit 120 ms; Ikura & Bax, 1992). In diesen Filterexperimenten werden die Signale der an ^{13}C und ^{15}N gebundenen Protonen von isotopenmarkierter HckSH3 unterdrückt, so dass nur die Protonenresonanzen des nicht-isotopenmarkierten Peptids gemessen werden.

2.6.2.2 NOE-Spektroskopie

Zur Bestimmung der NOE-Interaktionen zwischen ^1H -Spins, aus denen die Distanzeinschränkungen für die spätere Strukturberechnung gewonnen werden, wurden folgende 3D NOE-Spektren des HckSH3:PD1-Komplexes aufgenommen:

Ein (^1H - ^1H - ^{15}N)-NOESY-HSQC- (Mischzeit 120 ms; Zuiderweg & Fesik, 1989), ein aliphatischelektives (^1H - ^{13}C - ^1H)-HSQC-NOESY- (Mischzeit 100 ms) und ein aromatischelektives (^1H - ^{13}C - ^1H)-HSQC-NOESY-Spektrum (Mischzeit 150 ms; Norwood et al., 1990).

Für die NOE-Interaktionen zwischen den ^1H -Spins des ungelabelten Peptids wurde zusätzlich ein ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$)-gefiltertes NOE-Spektrum aufgenommen (Kapitel 2.6.2.1).

Zur Bestimmung der intermolekularen ^1H -NOE-Interaktionen wurde ein 3D ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$)-gefiltertes, ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$)-editiertes NOESY-HSQC-Spektrum verwendet (Mischzeit 150 ms; Zwahlen et al., 1997). Dieses Experiment besitzt eine Pulssequenz-Periode, in der die Magnetisierung der Protonen, die kovalent an ein ^{13}C - oder ^{15}N -Atom gebunden sind, unterdrückt werden und eine Periode, in der nur diese Protonenmagnetisierungen selektiert werden. Zwischen diesen beiden Perioden findet der Magnetisierungstransfer zwischen räumlich nahestehenden Protonen durch den Kern-Overhauser-Effekt statt.

2.6.3 NOE-Zuordnung und Strukturberechnung

Um eine NOE-basierte Strukturbestimmung durchführen zu können, müssen die NOE-Korrelationen in den NOE-Spektren identifiziert und zugeordnet werden. Dieser Prozess ist sehr langwierig, kann aber mit automatisierten, iterativen Zuordnungsstrategien beschleunigt werden.

2.6.3.1 Interproton-Distanzeinschränkungen

Die iterative Identifizierung von NOE-Resonanzen, deren Zuordnung und Kalibrierung erfolgte mittels des Programms RADAR, ein Software-Paket zur automatischen NOE-Spektren Analyse. RADAR verknüpft die Programme ATNOS (Herrmann et al., 2002a) und CANDID (Herrmann et al., 2002b), die auf Raumstrukturberechnungen mittels Torsionswinkeldynamik durch das Programm DYANA (Güntert et al., 1997) basieren.

In diesem iterativen Prozess, bestehend aus sieben Zyklen, werden mit dem Programm ATNOS die Basislinien und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der NOE-Spektren analysiert und die potentiellen NOE-Kreuzsignale basierend auf Übereinstimmung mit den chemischen Verschiebungen der zugeordneten Protonen identifiziert. Für die Zuordnung der NOE-Kreuzkorrelationen verwendet das Programm CANDID ebenfalls die chemischen Verschiebungen in den vorgegebenen Zuordnungstabellen, zusätzlich die Präsenz

von symmetrischen Kreuzkorrelationen, Konsistenz von Zuordnungs-Netzwerken und Kompatibilität mit der kovalenten Polypeptid-Struktur. Nach der Zuordnung erfolgt die Kalibrierung der ^1H - ^1H -NOE-Korrelationen mittels einer Peak-Integrationsroutine zu distanzeinschränkenden Strukturparametern, die einen maximalen räumlichen Abstand zwischen den NOE-korrelierten Protonen beschreiben (obere Distanzeinschränkung; Güntert et al., 1991). Artefakte und unklare NOE-Korrelationen werden entfernt und die verbleibenden struktureinschränkenden Parameter zur Strukturberechnung durch den Torsionswinkeldynamik-Algorithmus DYANA verwendet. Die daraus resultierenden Strukturscharen dienen ab dem zweiten Zyklus den Programmen ATNOS und CANDID als zusätzliche Einschränkung zur Identifizierung und Zuordnung weiterer ^1H - ^1H -NOE-Korrelationen.

Mit diesem Verfahren wurden die Distanzeinschränkungen aus dem 3D (^1H - ^{15}N)-NOESY-HSQC-Spektrum, den aliphaten- und aromatischelektiven 3D (^1H - ^{13}C)-HSQC-NOESY-Spektren sowie dem 2D ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$)-gefiltertes NOE-Spektrum erhalten. Für die chemische Verschiebung in den Protonendimensionen wurde eine Toleranz von 0,025 ppm, für chemische Verschiebungen in der Heterokerndimension eine Toleranz von 0,4 ppm zugesprochen. Die intermolekularen Interproton-Distanzeinschränkungen aus dem 3D ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$)-gefilterten, ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$)-editierten NOESY-HSQC-Spektrum wurden manuell zugeordnet. Dazu wurden die NOEs nach ihrer Intensität in drei Klassen unterteilt und die oberen Distanzeinschränkungen dementsprechend für die Strukturberechnung zugeordnet (Ohlenschläger et al., 1998):

NOE-Stärke	Obere Distanzeinschränkung	
	Methin- & Methylengruppen-Protonen	Methylgruppen-Protonen
stark	2,7Å	2,9Å
mittel	3,8Å	4,0Å
schwach	5,5Å	5,7Å

Dies war erforderlich, da in diesem NOESY-HSQC-Spektrum die für die Intensitätsreferenzierung benötigten NOE-Korrelationen (NOEs, deren korrespondierende Abstände aufgrund der intraresidualen Topologie von Aminosäureresten (z.B. H^{β_2} - H^{β_3} -Abstände, H^α - H^β -Abstände, H^{γ_2} - H^{γ_3} -Abstände) festgelegt sind) nicht vorhanden waren. Die Intensitätsreferenzierung der intermolekularen NOE-Korrelationen erfolgte über die intermolekularen NOE-Kreuzsignale, die auch in den nicht-gefilterten heteronuklearen 3D (^1H - ^1H)-NOE-Spektren identifiziert werden konnten. In diesen Spektren sind auch die für die Intensitätsreferenzierung benötigten NOE-Korrelationen vorhanden.

Bei NOE-Korrelationen, die von Methylgruppen ausgehen, wurden um jeweils 0,2 Å größere Werte für die oberen Distanzeinschränkungen verwendet (Clare et al., 1987).

Diese intermolekularen oberen Distanzeinschränkungen wurden von dem Programm DYANA ebenfalls zur Strukturberechnung benutzt.

2.6.3.2 Strukturberechnung

Bei der Berechnung der dreidimensionalen Struktur des HckSH3:PD1-Komplexes mittels DYANA wurde eine Schar von 100 Strukturen in Zufalls-Anfangskonformationen in einer Molekulardynamik im Torsionswinkelraum mit 20000 Schritten berechnet. Die Aminosäuretypen Arginin und Lysin wurden dabei in einer positiv geladenen, Asparagin- und Glutaminsäure in negativ geladener und Histidin in einer elektroneutralen Topologie berechnet. Für Methyl- und Methylengruppen sowie für rotationssymmetrische Protonenpositionen (z.B. H^δ- und H^ε-Positionen in Tyrosin- und Phenylalaninresten) wurden Pseudoatome definiert und eine entsprechende Korrektur der betreffenden Abstandseinschränkungen durchgeführt (Wüthrich et al., 1983). Als experimentelle Struktureinschränkungen dienten die oberen Abstandseinschränkungen aus CANDID und die manuell zugeordneten, intermolekularen oberen Abstandseinschränkungen (Kapitel 2.6.3). Da im Programm DYANA nur sequentiell verbundene Topologien berechnet werden können, wurde das carboxyterminale Ende der HckSH3-Aminosäuresequenz über eine aus 32 Pseudoatomen bestehende Kette mit dem aminoterminalen Ende der PD1-Sequenz verbunden. Diese Pseudoatome besitzen frei rotierbare dihedrale Winkel, keine sterische Repulsion und eine Bindungslänge von je 5 Å. Durch die Länge und die fehlende Repulsion der Kette wird gewährleistet, dass durch diese Verknüpfung keine Einschränkung in der relativen Orientierung des Peptids zum Protein erfolgt.

Die aus den Strukturberechnungen resultierenden Strukturen wurden mit dem Programm MOLMOL (Koradi et al., 1996) visualisiert und analysiert. Die Bewertung der Strukturen erfolgte mittels PROCHECK-NMR (Laskowski et al., 1996). Die Strukturabbildungen wurden mit den Programmen MOLMOL erzeugt und mittels POV-Ray (Vision Raytracer Pty. Ltd., Australia) bearbeitet.

Um die Unterscheidung von Peptid- und HckSH3-Aminosäuren zu vereinfachen, werden die Peptidreste im Dreibuchstaben-Aminosäure-Kode, die von HckSH3 im Einbuchstaben-Aminosäure-Kode abgekürzt.

2.6.4 Kartierung der Bindungsstelle aus Analyse der Differenz der chemischen Verschiebungen bei Peptidbindung

Die Bindung eines Liganden an ein Protein verursacht insbesondere für die Aminosäurereste in der Bindungsregion eine Veränderung in der chemischen Umgebung ihrer Atome. Dies führt wiederum zu einer Änderung der chemischen Verschiebung der Resonanzen dieser Atome in den NMR-Spektren. Somit kann durch Analyse dieser Änderungen das Bindungsepitop des Liganden an das Protein bestimmt werden.

Um die Bindungsstelle von PD1 an HckSH3 zu kartieren, wurden die Änderungen der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen- und Amidstickstoffresonanzen des Proteinrückgrats in den (¹⁵N-¹H)-HSQC-Spektren von HckSH3 vom freien zum PD1-gebundenem Zustand (PD1 im äquimolaren Verhältnis zu HckSH3) analysiert.

Die Differenzen wurden aus den chemischen Verschiebungen der Amidprotonen- und

Amidstickstoffresonanzen im freien und gebundenen Zustand getrennt ermittelt, intern auf die maximal auftretende chemische Verschiebungsänderung normiert (Gleichungen 2.4 und 2.5) und anschliessend mit Gleichung 2.6 (nach Schweimer et al., 2002) zusammengefasst.

$$\Delta\delta_n(H^N) = \frac{\Delta\delta(H^N)}{\Delta\delta_{max}(H^N)} \quad (2.4)$$

$$\Delta\delta_n(N) = \frac{\Delta\delta(N)}{\Delta\delta_{max}(N)} \quad (2.5)$$

$$\Delta\delta_{HN-N} = \sqrt{(\Delta\delta_n(H^N))^2 + (0,1 \cdot \Delta\delta_n(N))^2} \quad (2.6)$$

$\Delta\delta_n(H^N)$ = normierte Differenz der chemischen Verschiebungen für H^N

$\Delta\delta_n(N)$ = normierte Differenz der chemischen Verschiebungen für N

$\Delta\delta(H^N)$ = Differenz der chemischen Verschiebungen für H^N [ppm]

$\Delta\delta(N)$ = Differenz der chemischen Verschiebungen für N [ppm]

$\Delta\delta_{max}(H^N)$ = Beobachtete maximale chemische Verschiebung für H^N [ppm]

$\Delta\delta_{max}(N)$ = Beobachtete maximale chemische Verschiebung für N [ppm]

$\Delta\delta_{HN-N}$ = Differenz der chemischen Verschiebungen für H^N und N [ppm]

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Expression und Reinigung des rekombinanten Proteins HckSH3 aus *E. coli*

Der für das Fusionsprotein GST-HckSH3 kodierende Expressionsvektor war zu Beginn der Arbeit bereits vorhanden (Tran, 2005). Er enthält ein Gen für Glutathion-S-Transferase (GST) gefolgt von einem Sequenzabschnitt, der für die PreScission-Protease-Schnittstelle kodiert. In 3'-Richtung nach diesem Sequenzabschnitt wurde das für die Hck SH3-Domäne kodierende DNA-Fragment in den Vektor kloniert. Der Vektor erlaubt die Überexpression von löslichem und nativ gefaltetem HckSH3 als Fusionsprotein mit GST in *E. coli* Zellen. Der GST-*tag* ermöglicht generell eine Aufreinigung des Fusionspartners nach Zellyse mittels Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose. Nach Aufreinigung des Proteins ermöglicht die Protease-Schnittstelle die GST-Abspaltung von HckSH3 mittels PreScission Protease.

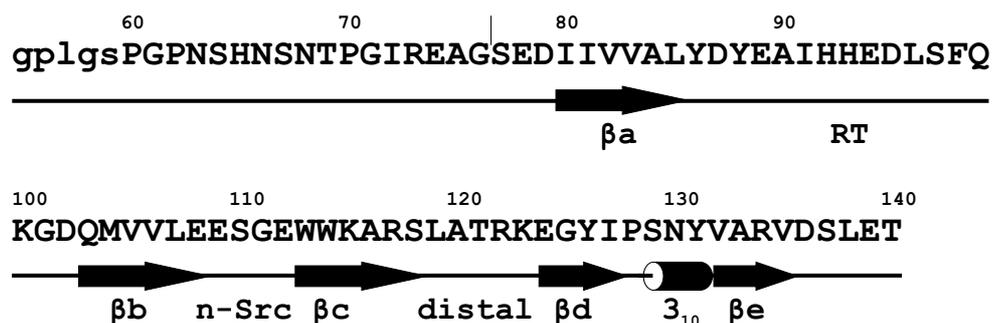


Abbildung 3.1: Aminosäuresequenz der Hck SH3-Domäne im Einbuchstaben-Aminosäure-Kode. Kleine Buchstaben kennzeichnen die Aminosäuren, die nach der Proteolyse des Fusionsproteins mittels PreScission Protease am Aminoterminus von HckSH3 verbleiben und nicht zur Wildtyp-Sequenz des Proteins gehören. Die Sekundärstrukturelemente sind schematisch dargestellt (nach Horita et al., 1998).

Das verwendete HckSH3-Protein beinhaltet die Aminosäuren P60 bis T140 der Hck-Sequenz. Die Reste P60 bis G76 gehören strukturell zur Hck Unique-Domäne. Diese 17

Aminosäuren dienten als Linker zwischen GST und der Hck SH3-Domäne zur Gewährleistung einer ausreichend hohen Spalteffizienz der PreScission Protease.

Aminoterminal verbleiben nach Proteolyse des Fusionsproteins außerdem fünf weitere Reste (GPLGS), die nicht zur Wildtyp-Sequenz von HckSH3 gehören (Abbildung 3.1).

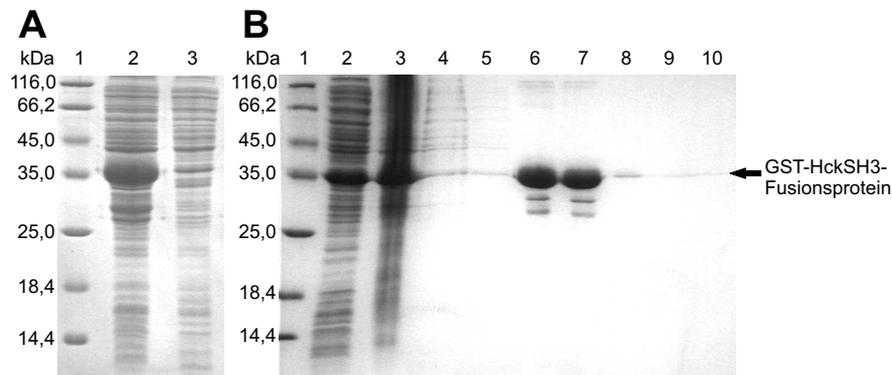


Abbildung 3.2: 15% SDS-PAGE der Expression (A) und Reinigung des GST-HckSH3-Fusionsproteins (B). A Spur 1: Protein Marker, Spur 2: Zellsuspension nach 5 h Expression, Spur 3: Zellsuspension vor Induktion. B Spur 1: Protein Marker, Spur 2: Rohextrakt nach Zellaufschluss und Zentrifugation, Spur 3: Zellpellet, Spur 4: Durchfluss des Säulenauftrags, Spur 5: Waschen, Spuren 6-9: Elutionen, Spur 10: Säulenmaterial.

Für die Raumstrukturaufklärung wurde ^{13}C - und ^{15}N -isotopenmarkiertes HckSH3-Protein benötigt, daher wurde die Expression in mit ^{13}C -Glukose und ^{15}N -Ammoniumchlorid versetztem M9-Minimalmedium durchgeführt. Für die Fluoreszenztitrationsexperimente wurde das rekombinante HckSH3-Protein in LB-Medium exprimiert. Mit der Vektor-DNA wurde der Expressionsstamm *E. coli* BL21 transformiert. Diese Transformanden wurden in Medium angeimpft, nach Erreichen einer optische Dichte (OD_{600}) von 0,6 bis 0,8 mit 1 mM IPTG induziert und nach 5 h Expressionszeit abzentrifugiert (Kapitel 2.4.1). Pro Liter Medium wurden Bakterienpellets mit 2 bis 3 g Nasszellgewicht gewonnen und bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Zur Reinigung des Proteins wurden die Zellpellets in GST-Lysepuffer resuspendiert, mittels Ultraschall aufgeschossen und der zellfreie Rohextrakt anschließend durch Zentrifugation von Zellresten und unlöslichen Bestandteilen getrennt (Kapitel 2.4.2).

Das GST-HckSH3-Fusionsprotein wurde mittels Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose gereinigt (Kapitel 2.4.3). Die Ausbeute nach Elution des Fusionsproteins von der Säule betrug etwa 50 mg/l. Expression und Affinitätschromatographie wurden mittels SDS-PAGE kontrolliert (Abbildung 3.2).

Im Anschluß wurde GST mittels PreScission-Protease vom HckSH3-Protein abgespalten (Kapitel 2.4.4) und die Spaltprodukte durch Größenausschlusschromatographie getrennt (Kapitel 2.4.5).

Die Größenausschlusschromatographie diente außerdem dem Umpuffern des Proteins. Spaltung und Größenausschlusschromatographie wurden mittels SDS-PAGE kontrolliert (Abbildung 3.3).

Nach der Größenausschlusschromatographie lag die HckSH3-Probe im Puffer für die NMR-Experimente vor, die Ausbeute betrug etwa 12 mg/l in einer Reinheit > 95%. Es wurden zwei Proben mit einer Endkonzentration von etwa 1,3 mM HckSH3 hergestellt, wobei eine der Proben in einem äquimolaren Verhältnis mit dem Peptid PD1 versetzt wurde.

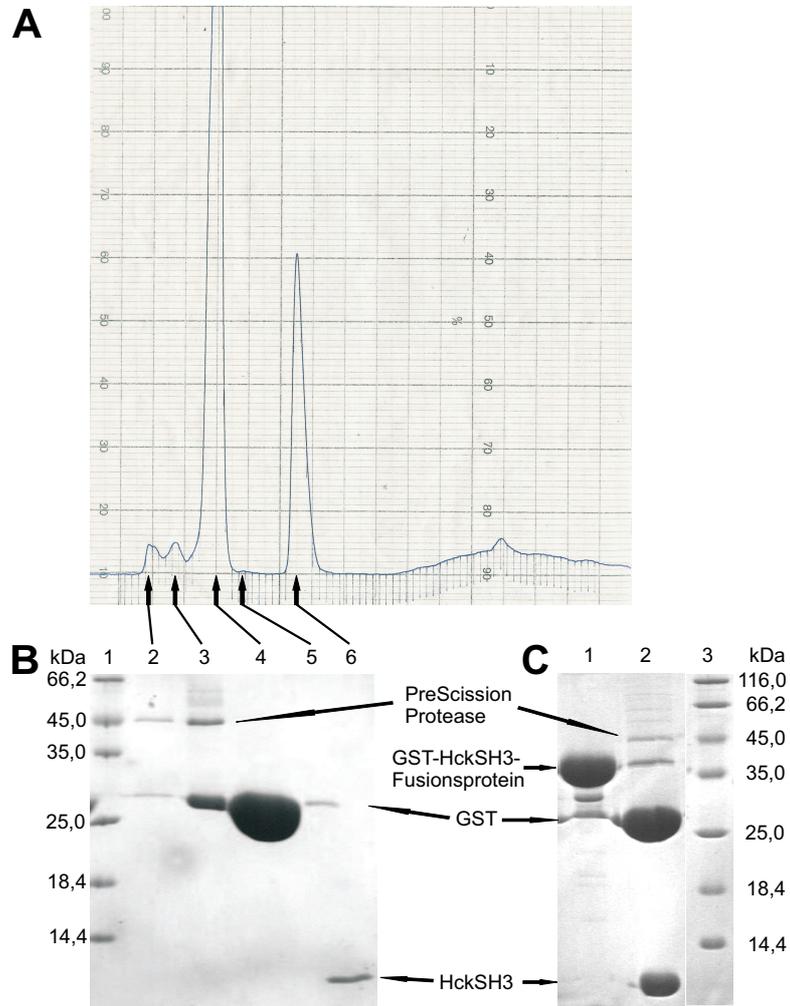


Abbildung 3.3: **A** Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie des Proteolyseansatzes des GST-HckSH3-Fusionsproteins. **B** 15% SDS-PAGE von Fraktionen der Größenausschlusschromatographie. Spur 1: Protein Marker, Spuren 2-6: Elutionsfraktionen der Größenausschlusschromatographie-Reinigung des Proteolyseansatzes aus (A). **C** 15% SDS-PAGE der Spaltung des Fusionsproteins. Spur 1: GST-HckSH3-Fusionsprotein vor Zugabe der PreScission Protease, Spur 2: Fusionsprotein nach 2 h Proteolyse, Spur 3: Protein Marker.

3.2 Fluoreszenztitrations-Experimente mit PD1-Mutanten

Da die PD1-Aminosäurereste Lys3 und Tyr4 an den Positionen P₋₄ und P₋₃ ungewöhnlich für Liganden von Src-Typ SH3-Domänen sind, sollte ihr Einfluss auf die Bindungsaffinität des Peptids zu HckSH3 untersucht werden.

Dazu wurde die Bindungsaffinität zweier Peptide (PD1-K(-4)A und PD1-Y(-3)A) zu HckSH3 mittels Fluoreszenz-Titration ermittelt. Beim Peptid PD1-K(-4)A wurde die Aminosäure Lys3 durch einen Alaninrest (HSAYPLPPLPSL), beim Peptid PD1-Y(-3)A der Rest Tyr4 durch einen Alaninrest (HSKAPLPPLPSL) substituiert.

Gemessen wurde die Änderung der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz bei Zugabe des jeweiligen Peptids (Kapitel 2.5). Aus der resultierenden Titrationskurve wurde die Dissoziationskonstante des Komplexes bestimmt (Kapitel 2.5.1). Zusätzlich zu den beiden Peptiden wurden auch die K_D -Werte der Peptide PD1 und PD1-Y(-3)R (HSKRPLPPLPSL) zu HckSH3, die bereits von Tran (2005) bestimmt wurden, erneut ermittelt, um die Affinitäten der vier Peptide innerhalb einer Messreihe miteinander vergleichen zu können.

Die Änderungen der Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von den Peptidkonzentrationen ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Die ermittelten K_D -Werte der HckSH3:Peptid-Komplexe aus der nichtlinearen Regressionrechnung nach Gleichung 2.3 sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Peptid	K_D -Wert [μM]
PD1	$0,33 \pm 0,02$
PD1-Y(-3)R	$0,66 \pm 0,02$
PD1-K(-4)A	$3,11 \pm 0,18$
PD1-Y(-3)A	$15,89 \pm 0,27$

Tabelle 3.1: Dissoziationskonstanten der Interaktionen von HckSH3 mit den Peptiden PD1, PD1-Y(-4)R, PD1-K(-4)A und PD1-Y(-3)A aus den Fluoreszenz-Titrationsexperimenten. Die Berechnung erfolgte mittels nichtlinearer Regression der Fluoreszenzdaten (Gleichung 2.3).

Die ermittelten K_D -Werte für den HckSH3:PD1- und den HckSH3:PD1-Y(-4)R-Komplex sind etwas höher als die Werte von Tran (2005; $K_D(\text{PD1}) = 0,23 \pm 0,03\mu\text{M}$, $K_D(\text{PD1-Y(-3)R}) = 0,47 \pm 0,02\mu\text{M}$). Die Dissoziationskonstante für das PD1-Peptid liegt aber auch hier um etwa einen Faktor zwei unter der für das PD1-Y(-3)R-Peptid, was die höhere Affinität von PD1 zu HckSH3 bestätigt. Die Affinitäten der mutierten PD1-Peptide zu HckSH3 sind deutlich geringer als für PD1 (9fach für PD1-K(-4)A und 48fach für PD1-Y(-3)A).

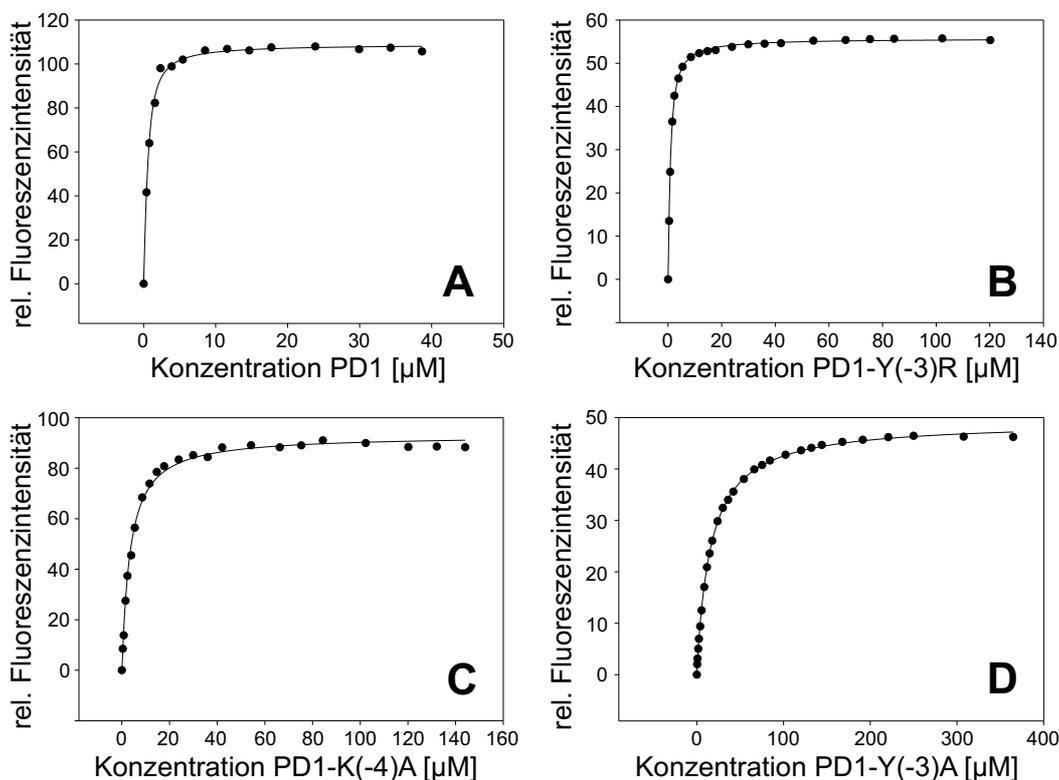


Abbildung 3.4: Fluoreszenz-Titration der Peptide PD1 (A), PD1-Y(-3)R (B), PD1-K(-4)A (C) und PD1-Y(-3)A (D) zu HckSH3. Dargestellt sind die prozentualen Fluoreszenzintensitätswerte nach Abzug des Hintergrundes (schwarze Punkte) sowie der Fit der nichtlinearen Regressionsrechnung unter Annahme einer einfachen, biomolekularen Reaktion an die Datenpunkte (durchgezogene Linie).

3.3 Sequenzspezifische Resonanzzuordnung

Die (^{15}N - ^1H)-Einbindungskorrelations-(HSQC)-Spektren von HckSH3 im freien und gebundenen Zustand (Abbildungen 3.5 A und B) zeigen sowohl für Protonen als auch für den Heterokern ^{15}N eine ausreichende Dispersion zur Zuordnung der Resonanzen mittels zwei- und dreidimensionaler NMR-Spektroskopie. Das (^{13}C - ^1H)-HSQC-Spektrum des HckSH3:PD1-Komplexes (Abbildung 3.5 C) zeigt ebenfalls eine ausreichende Dispersion in beiden Dimensionen. Die große Dispersion ist außerdem ein Indiz dafür, dass das HckSH3-Protein im gefalteten Zustand vorliegt, also eine Tertiärstruktur aufweist. Die Spektren zeigen im freien und gebundenen Zustand von HckSH3 einheitliche Signalhalbwertsbreiten, was darauf hindeutet, dass keine Austauschprozesse zwischen verschiedenen Konformationszuständen des Proteins erfolgt, das Protein also sowohl frei als auch gebunden eine homogene, wohldefinierte Struktur besitzt.

Die Proben waren über Monate stabil und zeigten keine Veränderungen (Signalverschiebungen aufgrund Proteolyse) in regelmäßig aufgenommenen HSQC-Kontrollspektren. Kleinere Proteinmengen präzipitierten zwar im Laufe der Zeit, was jedoch keinen negativen Einfluss auf die NMR-Experimente hatte.

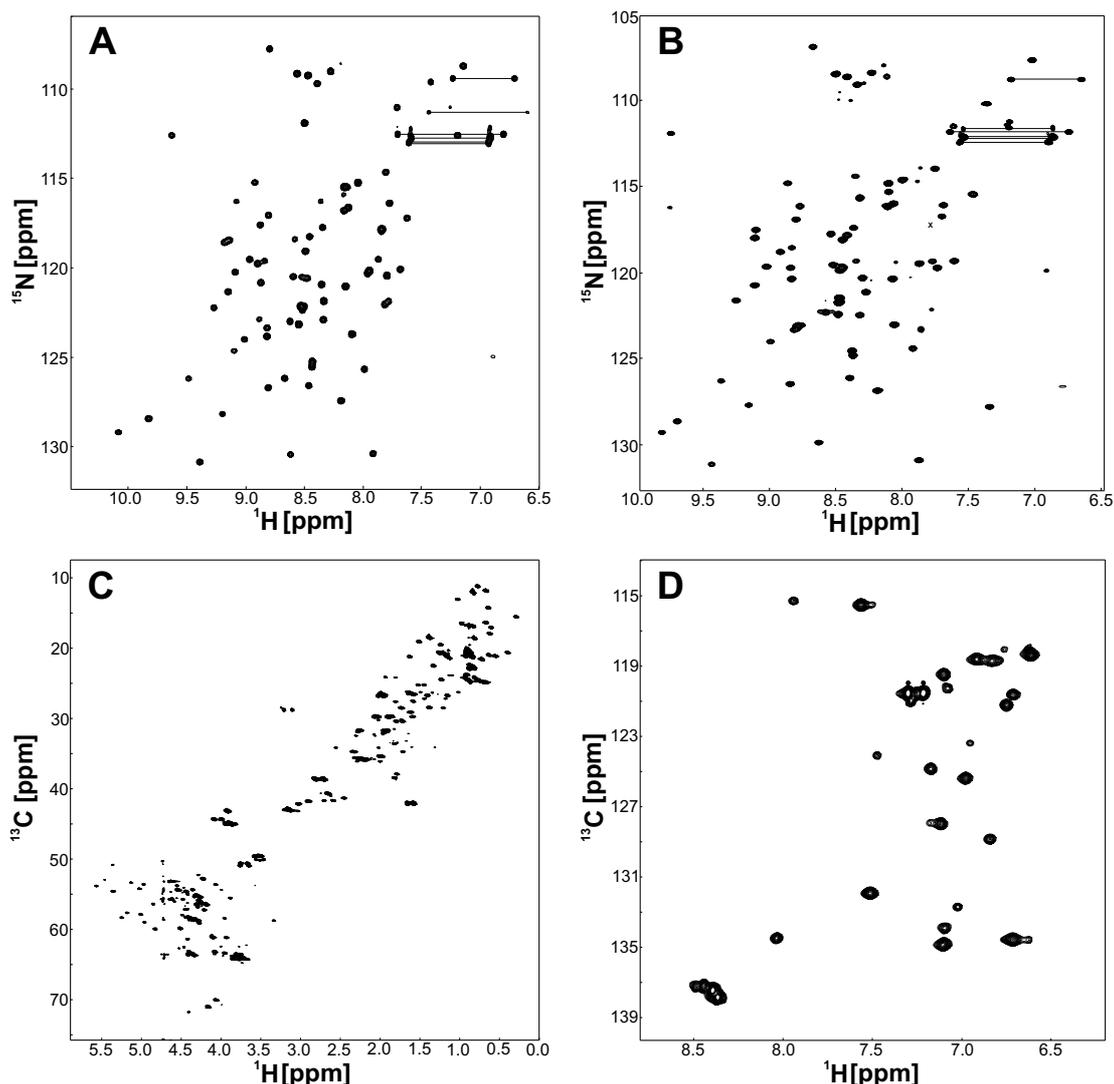


Abbildung 3.5: Heteronukleare Einbindungskorrelationen von freier HckSH3 und des HckSH3:PD1-Komplexes. **A** (^{15}N - ^1H)-HSQC-Spektrum von freier HckSH3, **B** des HckSH3:PD1-Komplexes. Zusammengehörige Resonanzpaare der Asparaginy- und Glutaminyl-Seitenketten-Amidgruppen sind durch Linien verbunden. **C** (^{13}C - ^1H)-ct-HSQC-Spektrum der aliphatischen, **D** der aromatischen Region des HckSH3:PD1-Komplexes.

Ausgehend von der Aminosäuresequenz von HckSH3 (Abbildung 3.1) sind 80 (^{15}N - ^1H)-Korrelationssignale im (^{15}N - ^1H)-HSQC-Spektrum zu erwarten (ohne Prolinreste, die kein Amidproton besitzen und ohne die aminoterminalen Aminosäure, von der aufgrund des schnellen Austauschs mit dem Lösungsmittel kein Signal detektiert wurde). Weiterhin sind sechsmal je zwei Resonanzen für die Seitenketten-Amidgruppen der vier Asparagin- und der zwei Glutaminreste und vier Resonanzen der Seitenketten-Amidgruppen der Argininreste zu erwarten.

Aus einer Anzahl von 95 Korrelationen im (^{15}N - ^1H)-HSQC-Spektrum von HckSH3 im Komplex mit dem Peptid PD1 und 91 Korrelationen im Spektrum von freier HckSH3

ergibt sich daraus das Fehlen eines Rückgrat-Amidgruppensignals für den HckSH3:PD1-Komplex und fünf fehlende Signale für freie HckSH3.

Im (^{13}C - ^1H)-HSQC-Spektrum zeigen die Resonanzsignale einiger Methylgruppen Hochfeldverschiebungen auf, was auf eine hydrophobe Wechselwirkungen oder aromatische Ringstromeffekte hinweist, denen diese Kerne ausgesetzt sind.

3.3.1 Zuordnung der Proteinrückgrat-Resonanzen der freien HckSH3-Domäne

Zur Auswertung der $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Austauschraten-Experimente (Kapitel 3.8) und der Kartierung der HckSH3:PD1-Bindungsstelle (Kapitel 3.6) wurde die sequenzspezifische Zuordnung der Proteinrückgrat-Amidgruppen (H^N und N) von freier HckSH3 benötigt, da die Interaktion des PD1-Peptids und HckSH3 im langsamen Austausch relativ zur NMR-Zeitskala stattfindet, wodurch aus der Resonanzzuordnung der ^{15}N - ^1H -Korrelationen des HckSH3:PD1-Komplexes nicht auf die ^{15}N - ^1H -Korrelationen von freier HckSH3 geschlossen werden kann (Kapitel 2.6.2.1).

Die Zuordnung der Proteinrückgrat-Amidgruppen sowie der meisten C^α - und Seitenketten- C^β -Resonanzen erfolgte für freie HckSH3 durch das 3D Tripelresonanz-Spektrum HNCACB (Wittekind & Mueller, 1993). In diesem Experiment werden die Amidresonanzen H^N und N mit den C^α - und C^β -Resonanzen derselben Aminosäure ($\text{H}_i^N/\text{N}_i \leftrightarrow \text{C}_i^\alpha/\text{C}_i^\beta$) und gleichzeitig mit den C^α - und C^β -Resonanzen der vorhergehenden Aminosäure ($\text{H}_i^N/\text{N}_i \leftrightarrow \text{C}_{i-1}^\alpha/\text{C}_{i-1}^\beta$) korreliert, wobei letztere Korrelation zu schwächeren Signalintensitäten führt. Die Unterscheidung der C^α - und C^β -Resonanzen war aufgrund des 180° -Phasenunterschieds der Signale möglich. Die inter- und gleichzeitig intraresiduelle Korrelation der Amidresonanzen erlaubt somit eine einfache sequenzielle Zuordnung.

Zur Identifizierung der Aminosäurearten dienen einige Eigenheiten bestimmter Aminosäuretypen. Glycinresten fehlt die Korrelation zum C^β -Atom, Alaninreste zeigen eine extreme Hochfeldverschiebung der C^β -Resonanzen, da es sich hierbei um Methylgruppen handelt. Die C^β -Resonanzen von Serin- und Threoninresten liegen aufgrund der Bindung zu einem Sauerstoffatom extrem tieffeldverschoben vor. Auf diese Weise konnten nahezu alle Resonanzen sequenzspezifisch zugeordnet werden. Die sequenzielle Zuordnung wird allerdings bei Prolinresten aufgrund ihres fehlenden Amidprotons unterbrochen, ebenso bei den Aminosäuren, deren Amidgruppen-Resonanzen im (^{15}N - ^1H)-HSQC-Spektrum nicht detektiert wurden (Kapitel 3.3).

Die Zuordnung der Amidgruppen wurde mittels eines 3D HN(CO)CA-Spektrums (Yamazaki et al., 1994) kontrolliert und weiter vervollständigt. Dieses Experiment korreliert die Amidresonanzen H^N und N mit der C^α -Resonanz der vorhergehenden Aminosäure ($\text{H}_i^N/\text{N}_i \leftrightarrow \text{C}_{i-1}^\alpha$).

3.3.2 Zuordnung der Proteinrückgrat-Resonanzen des HckSH3:PD1-Komplexes

Für den HckSH3:PD1-Komplex erfolgte die sequenzspezifische Zuordnung der Proteinrückgrat-Amidgruppen (H^N und N) sowie der meisten C^α - und Seitenketten- C^β -Resonanzen der Hck SH3-Domäne ebenfalls mittels eines 3D HNCACB-Experimentes. In Abbildung 3.6 ist exemplarisch ein Ausschnitt aus dem 3D HNCACB-Spektrum gezeigt, der die sequenzielle Verknüpfung der chemischen Verschiebungen der Amidgruppen-Resonanzen verdeutlicht. Zusätzlich zu den in Kapitel 3.3.1 genannten Eigenheiten bestimmter Aminosäuretypen diente zudem das 3D Tripelresonanz-Experiment (H)CC(CO)NH-TOCSY (Grzesiek et al., 1993) zur Identifizierung der Aminosäurearten. In diesem Experiment werden die Amidgruppen (H^N und N) mit allen aliphatischen Seitenketten-Kohlenstoffatomen der vorhergehenden Aminosäure korreliert, wodurch der Aminosäuretyp aus Anzahl und chemischer Verschiebung der ^{13}C -Seitenkettenresonanzen bestimmt werden kann.

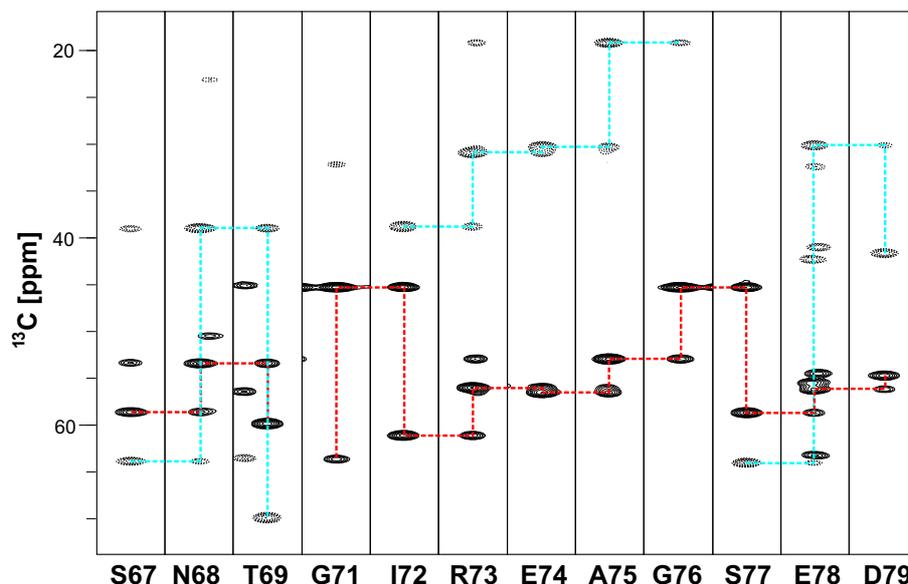


Abbildung 3.6: Sequenzspezifische Resonanzzuordnung des Proteinrückgrats des HckSH3:PD1-Komplexes mittels 3D HNCACB-Spektrum für das HckSH3-Sequenzsegment S67 bis D79. $^{13}C(F1)$ - $^1H(F3)$ -Streifen sind bei entsprechenden H^N - und N -chemischen Verschiebungen in den Dimensionen F2 und F3 entnommen und sequenziell angeordnet. Die Konnektivitäten durch die C^α - und C^β -chemischen Verschiebungen sind durch Linien gekennzeichnet (C^α : rot, C^β : blau). Zu erkennen ist der Sequenzabbruch durch P70, die typische Tieffeldverschiebung der C^β -Resonanzen von S67, T69 und S77, die hochfeldverschobene C^β -Resonanz von A75 sowie die Unterbrechung der C^β -Konnektivitäten bei G71 und G76.

Die sequenzspezifische Zuordnung der Carbonylkohlenstoffresonanzen erfolgte in ähnlicher Weise mit Hilfe des 3D HNC(O)-Experimentes (Ikura et al., 1990), das die Amidgruppen (H^N und N) mit den ^{13}C -Carbonylkohlenstoffen der vorangehenden Aminosäure korreliert. Die chemischen Verschiebungen der H^α -Resonanzen konnten mittels eines 3D HNHA- (Vuister & Bax, 1993) und eines 3D H(CCO)NH-TOCSY-Spektrums (Grzesiek et al.,

1993) zugeordnet werden. Ersteres Experiment korreliert die Amidgruppenresonanzen mit der H^α -Resonanz, das zweite Experiment mit allen aliphatischen Seitenketten-Protonenresonanzen der Vorgänger-Aminosäure. Fehlende H^α -Resonanzen konnten bei Kenntnis der chemischen Verschiebung des C^α -Atoms der entsprechenden Aminosäure aus dem 3D HNCACB- oder dem 3D (H)CC(CO)NH-TOCSY-Experiment im 2D (^{13}C - ^1H)-HSQC-Spektrum verifiziert werden.

3.3.3 Zuordnung der Seitenketten-Resonanzen des HckSH3:PD1-Komplexes

Die sequenzspezifische Zuordnung der aliphatischen Seitenkettenresonanzen der Hck SH3-Domäne erfolgte mittels eines 3D HCCH-COSY- (Bax et al., 1990) und des 3D (H)CC(CO)NH-TOCSY-Experimentes. Der Vorteil des 3D HCCH-COSY-Experimentes liegt darin, dass die Zuordnung der Resonanzen nicht über die labilen Amidprotonen erfolgt, sondern über die ^{13}C -gebundenen Protonen. In diesem Experiment werden diese aliphatischen Seitenketten-Protonen miteinander korreliert, wenn sie über zwei bis drei Bindungen voneinander getrennt sind. So konnten in diesen Spektren auch die Seitenkettenresonanzen von Aminosäureresten zugeordnet werden, die in den (H^N/N)-editierten Tripelresonanzexperimenten nicht detektierbar waren. Da die sequenziellen Positionsinformation in diesen Spektren fehlen, wurden 3D NOE-Spektren zur sequenzspezifischen Zuordnung dieser Resonanzen zu Hilfe genommen. Ausgehend von den bekannten chemischen Verschiebungen der H^α - und C^α -Atome der Aminosäuren können die H^β -Resonanzen aus dem 3D HCCH-COSY-Spektrum, die C^β -Resonanzen aus dem 3D (H)CC(CO)NH-TOCSY-Spektrum entnommen und im aliphatischen (^{13}C - ^1H)-HSQC-Spektrum zugeordnet werden. Auf diese Weise erhält man Schritt für Schritt alle chemischen Verschiebungen von CH-Gruppen-Resonanzen der aliphatischen Seitenkette jeder Aminosäure. Die Zuordnung wurde mittels eines 3D HCCH-TOCSY- (Bax et al., 1990) und des 3D H(CCO)NH-TOCSY-Experimentes verifiziert und vervollständigt. Die ϵ -Methylgruppe von M104 wurde im HCCH-TOCSY-Spektrum aufgrund ihrer fehlenden Kreuzsignale identifiziert und mit Hilfe eines aliphatischen 3D (^1H - ^{13}C - ^1H)-HSQC-NOESY-Spektrums (Norwood et al., 1990) über ihre intraresiduellen NOE-Korrelationen zugeordnet.

Die sequenzielle Zuordnung der aromatischen Seitenketten erfolgte mittels eines aromatischen (^{13}C - ^1H)-HSQC-Spektrums (Abbildung 3.5 D) und den 2D (HB)CB(CGCD)HD- sowie 2D (HB)CB(CGCDCE)HE-Experimenten (Yamazaki et al., 1993). In letzteren beiden Spektren werden die C^β -Resonanzen der Aminosäurereste mit ihren H^δ - bzw. H^ϵ -Resonanzen korreliert. Da die C^β -Resonanzen bereits bekannt sind und das aromatische (^{13}C - ^1H)-HSQC-Spektrum mit maximal 37 zu erwartenden Resonanzen (10 aromatische Reste) sehr übersichtlich ist, lassen sich in den meisten Fällen mit Kenntnis der H^δ - und H^ϵ -Resonanzen die C^δ - und C^ϵ -Resonanzen im (^{13}C - ^1H)-HSQC-Spektrum zuordnen. Zur Kontrolle und Vervollständigung dieser Zuordnung wurden z.B. die intraresiduellen (H^β - H^δ -), (H^δ - H^ϵ -) sowie (H^ϵ - H^ζ -)NOE-Korrelationen im aromatischen und aliphatischen 3D (^1H - ^{13}C - ^1H)-HSQC-NOESY-Spektrum verwendet.

Die Zuordnung der NH₂- und NH-Seitenketten-Resonanzen erfolgte schließlich NOE-basiert über ein 3D (¹H-¹H-¹⁵N)-NOESY-HSQC-Spektrum (Zuiderweg & Fesik, 1989) sowie die aromatischen und aliphatischen 3D (¹H-¹³C-¹H)-HSQC-NOESY-Spektren.

3.3.4 Zuordnung der Protonen-Resonanzen des PD1-Peptids

Die sequenzspezifische Zuordnung des Peptids wurde mittels 2D isotopengefilterten Experimenten durchgeführt. Verwendet wurden ein 2D (¹³C/¹⁵N)-gefiltertes COSY-, ein 2D (¹³C/¹⁵N)-gefiltertes TOCSY- und ein 2D (¹³C/¹⁵N)-gefiltertes NOE-Spektrum (Ikura & Bax, 1992). In diesen werden nur solche Protonenresonanzen miteinander korreliert, die nicht an ein ¹³C- oder ¹⁵N-Atom kovalent gebunden sind, wodurch alle Protonenresonanzen des ¹³C- und ¹⁵N-markierten HckSH3-Proteins "ausgeblendet" und nur die Protonenresonanzen des nicht-isotopenmarkierten PD1-Peptids detektiert werden. Aufgrund der fehlenden Isotopenmarkierung von PD1 konnten die Heterokerne nicht detektiert werden und nur die chemischen Verschiebungen der Peptid-Protonen zugeordnet werden.

Die intraresiduelle Zuordnung der Protonenresonanzen erfolgte über das (¹³C/¹⁵N)-gefilterte COSY-Spektrum und wurde mittels des (¹³C/¹⁵N)-gefilterten TOCSY-Spektrums verifiziert und vervollständigt. Die Aminosäureart konnte über die Anzahl und typischen chemischen Verschiebungen der ¹H-Seitenkettenresonanzen der verschiedenen Aminosäurereste im (¹³C/¹⁵N)-gefilterten TOCSY-Spektrum bestimmt werden. Die sequenzielle Zuordnung erfolgte durch das (¹³C/¹⁵N)-gefilterte NOE-Spektrum mit Hilfe der NOE-Korrelationen zwischen der Peptidrückgrat-Amidproton-Resonanz einer Aminosäure und der H^α-Atom-Resonanz der vorangehenden Aminosäure (Abbildung 3.7).

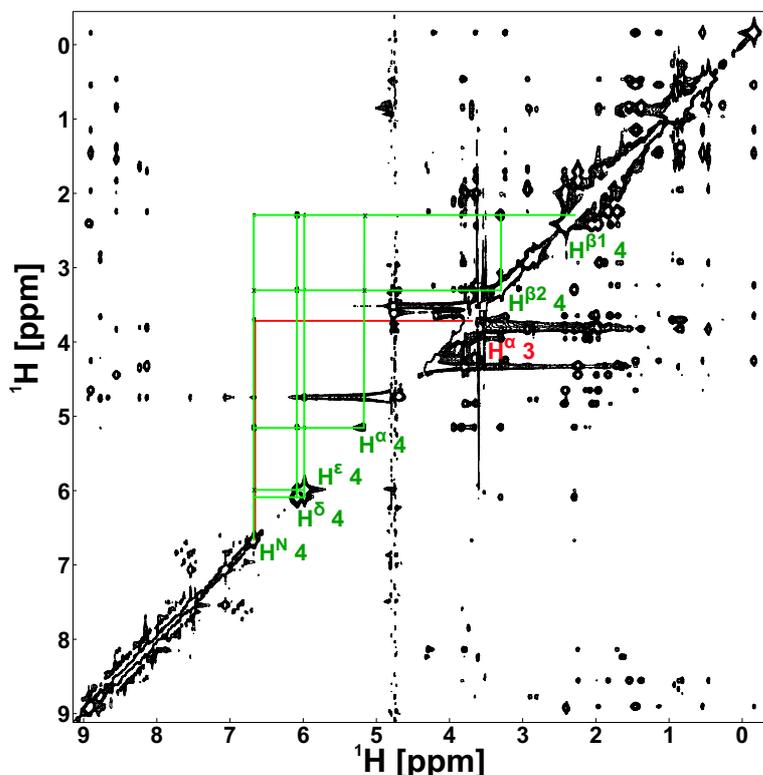


Abbildung 3.7: Zuordnung der Protonenresonanzen des PD1-Peptids im HckSH3:PD1-Komplex. Dargestellt ist das (¹³C/¹⁵N)-gefilterte NOE-Spektrum, welches die intramolekularen NOE-Korrelationen des PD1-Peptids zeigt. Exemplarisch sind die intraresiduellen Protonen-Korrelationen der Aminosäure Tyr4 in grün, die sequentielle Korrelation zwischen dem Amidproton von Tyr4 und dem H^α-Atom von Lys3 in rot angezeigt.

3.3.5 Vollständigkeit der Resonanzzuordnung

Für die freie Hck SH3-Domäne dienten das 3D HNCACB- und 3D HN(CO)CA-Spektrum lediglich der sequenzspezifischen Zuordnung der Proteinrückgrat-Amidgruppen-Resonanzen (H^N und N), da diese Zuordnung für die Auswertung der H_2O/D_2O -Austauschraten-Experimente (Kapitel 3.8) und die Kartierung der HckSH3:PD1-Bindungsstelle (Kapitel 3.6) benötigt wurde. Im (^{15}N - 1H)-HSQC-Spektrum von freier HckSH3 konnten so 91 von 96 (H^N -N)-Resonanzen zugeordnet werden (95%, abzüglich der fünf Prolinreste und der aminoterminalen Aminosäure). Nicht detektierbar waren die Resonanzen der Aminosäuren H65 und N66 im Aminoterminus des Proteins sowie E89, H92 und H93 im RT-Loop von HckSH3. Das Fehlen dieser Resonanzen deutet auf einen schnellen Austausch mit dem umgebenden Lösungsmittel hin, zudem besitzt der Aminoterminus keine Sekundär- und Tertiärstruktur (Kapitel 3.5), und auch der RT-Loop besitzt eine hohe Flexibilität (Horita et al., 1998).

Im Fall des HckSH3:PD1-Komplexes wurden 95 von 96 möglichen (H^N -N)-Resonanzen zugeordnet (99%). Fehlend war hier die (H^N -N)-Korrelation der Aminosäure H93. Die Zuordnung der H^α - und C^α -Resonanzen war vollständig (100%). Ferner wurden 79 von 86 Proteinrückgrat-Carbonylkohlenstoffkernen zugeordnet (92%). Fünf der sieben fehlenden Resonanzen sind auf das fehlende Proteinrückgrat-Amidproton des sequentiell folgenden Prolinrestes zurückzuführen. Da das 3D HNCO-Experiment die Carbonylkohlenstoff-Resonanzen an Position i mit der der Proteinrückgrat-Amidgruppe der folgenden Aminosäure (Position $i+1$) korreliert, können diese Carbonylkohlenstoffkerne nicht detektiert werden. Gleiches gilt für den carboxyterminalen Threoninrest (T140). Weiterhin fehlt die Zuordnung der Carbonylkohlenstoff-Resonanz von H93, da die (H^N -N)-Korrelation dieser Aminosäure im (^{15}N - 1H)-HSQC-Spektrum nicht identifiziert werden konnte.

Die Zuordnung der HckSH3-Seitenketten-Resonanzen wurde zu 94% für die Protonen und 93% für die Heterokerne (^{13}C und ^{15}N) vervollständigt. Die C^γ -Resonanzen der Asparaginsäure-Seitenketten, der aromatischen Seitenketten der Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophanreste, die C^δ -Resonanzen der Glutaminsäure-Seitenketten, die $C^{\delta 2}$ - und $C^{\epsilon 2}$ -Resonanzen der Tryptophan-Seitenketten sowie die C^ζ -Resonanzen von Tyrosin- und Arginin-Seitenketten können in den verwendeten Experimenten nicht zugeordnet werden, da sie nicht direkt an ein Proton gebunden sind. Die lösungsmittelzugänglichen Seitenketten-Carboxylgruppen von Glutaminsäure- und Asparaginsäureresten sind bei dem verwendeten pH-Wert deprotoniert und konnten somit ebenfalls nicht detektiert werden, die Hydroxylprotonen von Serin- (H^γ), Threonin- ($H^{\gamma 1}$) und Tyrosinresten (H^η) konnten nicht zugeordnet werden, sind aber in den Standard-NMR-Experimenten auch nicht unbedingt detektierbar. Die Stickstoffkerne der drei Histidinreste H65, H92 und H93 und eventuell damit verbundene Protonen konnten ebenfalls nicht detektiert werden. Ebenso fehlen die Resonanzzuordnungen der Guanidinogruppen der vier Argininreste R73, R117, R122 und R134, die der Seitenketten-Aminogruppen der drei Lysinreste K100, K115 und K123 sowie die des $C^{\delta 2}$ -Atoms von H65.

Die Protonenresonanzen des Peptids konnten nahezu vollständig zugeordnet werden (95%). Fehlend sind hier die $H^{\delta 1}$ - und $H^{\epsilon 1}$ -Resonanzen der Aminosäure His1 sowie die der Seitenketten-Aminogruppen-Protonen von Lys3. Die Hydroxylprotonen der Aminosäuren Ser2 (H^{γ}) und Tyr4 (H^{η}) konnten auch hier nicht detektiert werden.

3.4 Bestimmung der struktureinschränkenden Parameter aus NOE-Korrelationen

Die Zuordnung der intermolekularen 1H - 1H -NOE-Korrelationen zwischen dem HckSH3-Protein und dem Peptid PD1 wurde manuell unter Zuhilfenahme eines 3D ($^{13}C/^{15}N$)-gefilterten, ($^{13}C/^{15}N$)-editierten NOESY-HSQC-Spektrums, welches nur die NOE-Korrelationen der an ^{13}C - oder ^{15}N -Heterokernen kovalent gebundenen Protonen von HckSH3 zu denen des nicht-isotopenmarkierten PD1-Peptids enthält, durchgeführt. Abbildung 3.8 zeigt einige Beispiele von intermolekularen NOE-Korrelationen. Die zugeordneten NOE-Korrelationen wurden entsprechend ihrer Intensität in drei Distanz-Klassen eingeteilt (Kapitel 2.6.3).

Mit der "distance modify"-Routine von DYANA (Güntert et al., 1997) wurden redundante und bedeutungslose Distanzeinschränkungen entfernt und eine Pseudoatomkorrektur für Methyl-, Methylen- und aromatische Gruppen durchgeführt. Resultierend ergaben sich 354 intermolekulare Distanzeinschränkungen.

Die Zuordnung der intramolekularen 1H - 1H -NOE-Korrelationen von HckSH3 und des Peptids PD1 zu den spezifischen 1H -Positionspaaren wurde automatisiert mit dem Programm RADAR durchgeführt. RADAR verknüpft die Programme ATNOS (Herrmann et al., 2002a) und CANDID (Herrmann et al., 2002b), die auf Raumstrukturberechnungen mittels Torsionswinkeldynamik durch das Programm DYANA (Güntert et al., 1997) basieren.

ATNOS ist ein Algorithmus, der das automatisierte "peak picking" und die Identifizierung von NOE-Signalen aus den erstellten Peaklisten in homonuklearen 2D und heteronuklearen 3D (1H - 1H)-NOE-Spektren erlaubt. Mittels der Aminosäuresequenz von HckSH3, der Liste mit den chemischen Verschiebungen der einzelnen, zugeordneten Kerne und den NOE-Spektren werden nach lokaler Basislinienkorrektur und Analyse des lokalen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses der verschiedenen Spektren unter Berücksichtigung der zugeordneten chemischen Verschiebungen mögliche NOE-Korrelationen identifiziert. In mehreren Zyklen werden diese mit dem Programm CANDID den spezifischen 1H -Positionspaaren zugeordnet, mittels einer Peak-Integrationsroutine zu struktureinschränkenden Distanzparametern kalibriert und die Raumstruktur mit DYANA berechnet. Bei den vom Programm verwendeten Spektren handelt es sich um das aromatische und aliphatische 3D (1H - ^{13}C - 1H)-HSQC-NOESY-Spektrum, das 3D (1H - 1H - ^{15}N)-NOESY-HSQC-Spektrum und das 2D ($^{13}C/^{15}N$)-gefilterte NOE-Spektrum. Die manuell erstellte

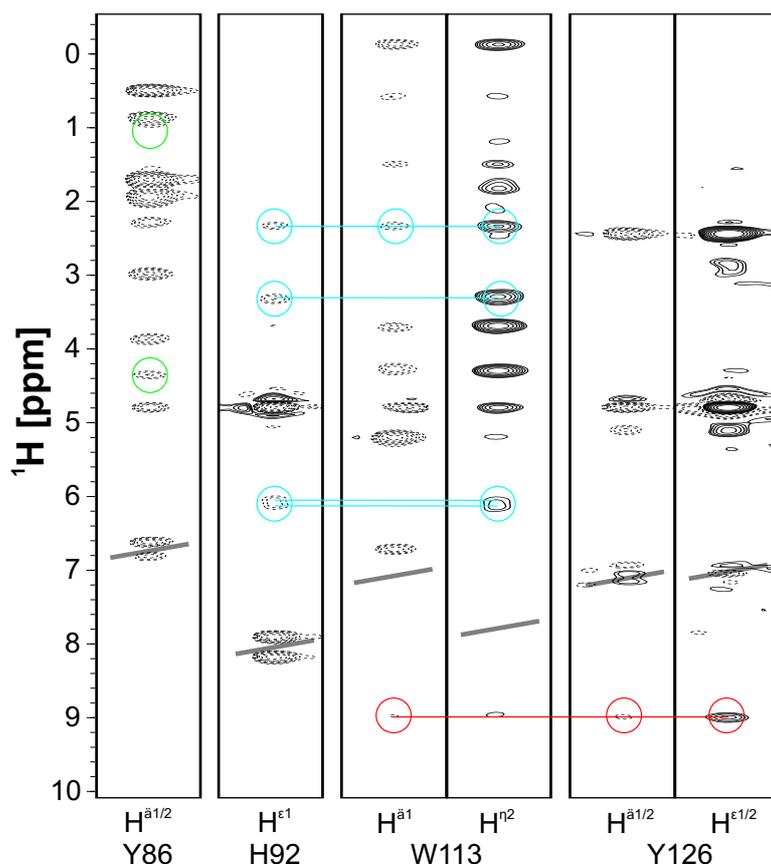


Abbildung 3.8: Beispiele für intermolekulare NOE-Korrelationen. Dargestellt sind die $^1\text{H}(\text{F}1)\text{-}^1\text{H}(\text{F}3)$ -Streifen aus dem 3D ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$)-F1-gefilterten, ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$)-F3-editierten NOESY-HSQC-Spektrum für die $\text{H}^{\delta 1/2}$ -Position von Y86, die $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Position von H92, die $\text{H}^{\delta 1}$ - und die $\text{H}^{\eta 1}$ -Position von W113 sowie die $\text{H}^{\delta 1/2}$ - und die $\text{H}^{\epsilon 1/2}$ -Position von Y126. Hervorgehoben sind die Korrelationen zu Leu12 (grüne Kreise; geringere chemische Verschiebung: $\text{H}^{\delta 2}$, höhere chemische Verschiebung: H^{α}), zu Tyr4 (blaue Kreise; von geringen zu hohen chemischen Verschiebungen: $\text{H}^{\beta 3}$, $\text{H}^{\beta 2}$, $\text{H}^{\epsilon 1/2}$, $\text{H}^{\delta 1/2}$) und zu His1 (rote Kreise; H^{N}). Die Lage der Diagonalen des Spektrums ist in grau angedeutet.

Liste der 354 intermolekularen Abstandseinschränkungen wurde ebenfalls für die Strukturberechnung verwendet.

Nach der Berechnung der Raumstruktur des Komplexes wurden die von RADAR bestimmten Distanzeinschränkungen manuell untersucht und fehlerhafte NOE-Korrelationen deletiert. Die modifizierten Listen der zur Strukturberechnung verwendeten Distanzeinschränkungen wurden anschließend in eine erneute Strukturberechnung mittels DYANA eingegeben.

Neben den 354 manuell bestimmten intermolekularen Distanzeinschränkungen wurden von dem Programm RADAR 2146 intramolekulare, NOE-abgeleitete struktureinschränkende Parameter für die Strukturberechnung identifiziert und verwendet, wovon 115 intramolekulare Distanzeinschränkungen vom Peptid PD1 herrühren.

3.4.1 Analyse der NOE-abgeleiteten Distanzeinschränkungen

In Abbildung 3.9 A ist die Anzahl der zur Strukturberechnung verwendeten intramolekularen Distanzeinschränkungen in Abhängigkeit ihrer sequentiellen Reichweite für HckSH3 dargestellt. Abbildung 3.9 C zeigt diese Distanzeinschränkungen pro Aminosäurerest gegen die zugehörige Sequenzposition für HckSH3.

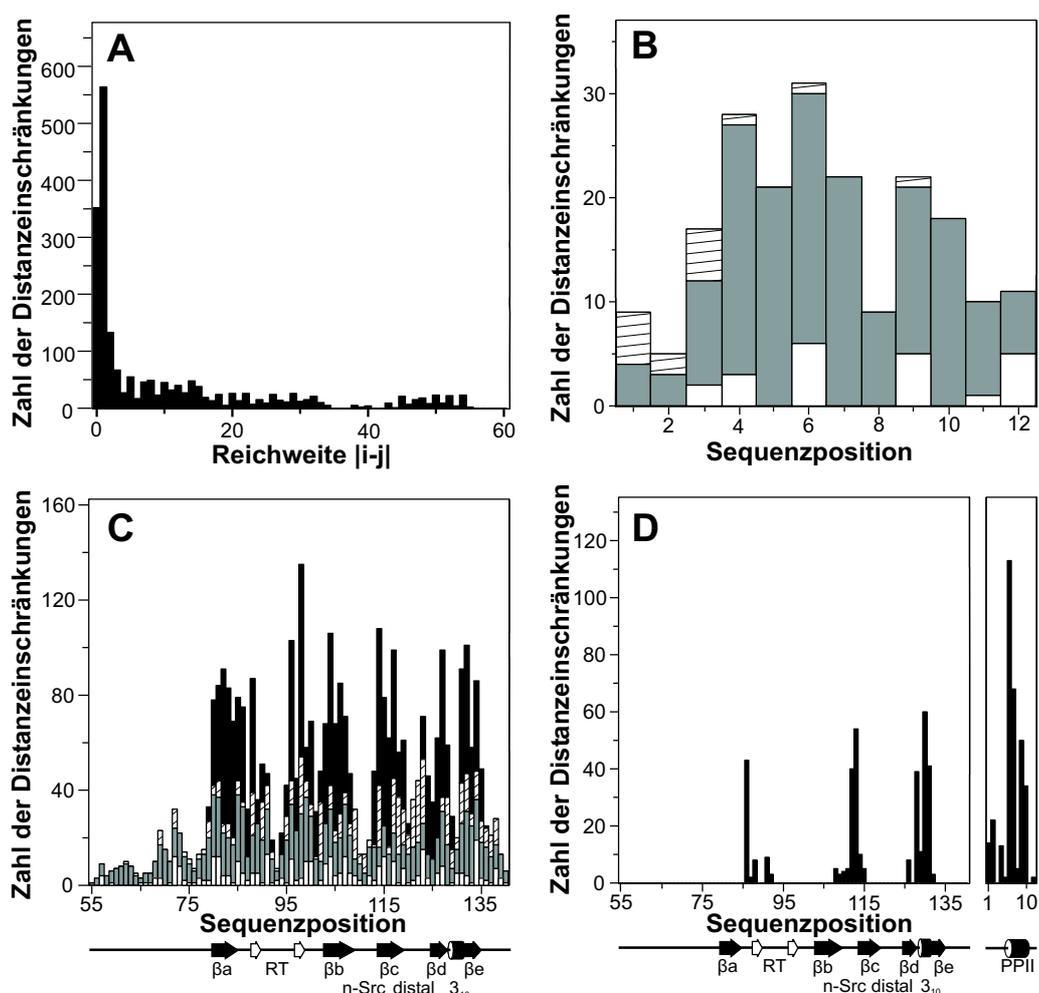


Abbildung 3.9: Anzahl der zur Strukturberechnung verwendeten Distanzeinschränkungen pro Aminosäurerest gegen die zugehörige Sequenzposition. **A** Anzahl der verwendeten intramolekularen Distanzeinschränkungen in Abhängigkeit ihrer sequentiellen Reichweite ($|i - j|$) für HckSH3. Intramolekulare Distanzeinschränkungen für die Aminosäuren des PD1-Peptids (**B**) und von HckSH3 (**C**). Weiß: intraresiduelle ($|i - j| = 0$), grau: sequenzielle ($|i - j| = 1$) Distanzeinschränkungen, gestreift: Distanzeinschränkungen mittlerer ($2 \leq |i - j| \leq 5$) und schwarz: großer ($|i - j| > 5$) sequentieller Reichweite. **D** Intermolekulare Distanzeinschränkungen für die Aminosäurereste aus HckSH3 (links) und PD1 (rechts). Die Sekundärstrukturelemente sind unten eingezeichnet, β -Faltblattstränge sind durch schwarze Pfeile, die 3_{10} -Helix durch Zylinderform, die kurzen β -Faltblattstränge im RT-Loop (siehe Kapitel 3.5) durch weiße Pfeile dargestellt.

Der Amino- und Carboxyterminus (Aminosäuren G55 bis D79 und S137 bis T140) sowie der zentrale Bereich des RT-Loops (Aminosäuren H92 bis E40), die Bereiche des n-Src- (Aminosäuren E109 bis E112) und des distalen Loops (Aminosäuren A120 bis R122) zeichnen sich durch eine geringe Anzahl von Distanzeinschränkungen aus. Der n-Src-Loop-Bereich sowie Amino- und Carboxyterminus weisen zudem keine Distanzeinschränkungen mit hoher sequenzieller Reichweite ($|i - j| > 5$), der Aminoterminus zudem auch nur eine geringe Zahl von Distanzeinschränkungen mittlerer Reichweite ($2 \leq |i - j| \leq 5$) auf. Dies weist auf eine hohe Flexibilität der entsprechenden Sequenzregionen hin. Die Bereiche, in denen β -Faltblatt-Strukturen zu erwarten sind, zeigen hingegen eine besonders hohe Anzahl langreichweitiger Distanzeinschränkungen (Aminosäuren I80 bis A84, D102 bis E108, W114 bis S118, K123 bis I127 und V132 bis R134), wie auch einige Reste im amino- und carboxyterminalen Teil des RT-Loops (Aminosäuren L85 bis Y88, L96 bis K100). Das Peptid zeigt nur sehr wenige intramolekulare Distanzeinschränkungen von mittlerer und keine Einschränkungen von langer Reichweite auf (Abbildung 3.9 B), was für ein kurzes Peptid mit elongierter Konformation zu erwarten ist. Die Berechnung der dreidimensionalen Struktur des Peptids wird daher im Wesentlichen durch die intermolekularen Distanzeinschränkungen bestimmt.

Abbildung 3.9 D zeigt die Anzahl der zur Strukturberechnung verwendeten intermolekularen Distanzeinschränkungen pro Aminosäurerest gegen die zugehörige Sequenzposition für die Aminosäurereste von HckSH3 und des Peptids PD1.

Hier zeigt sich eine geringe Distanz einiger Aminosäurereste im RT-Loop (Aminosäuren I81 bis V83, Y86 und E35), im n-Src-Loop (Aminosäuren E108 bis K115) und im Bereich der 3_{10} -Helix (Aminosäuren Y126, P128 bis V132) von HckSH3 zu Peptidresten.

Im PD1-Peptid zeigen vor allem die Aminosäurereste des xP-Dipeptid-Motivs (Leu6/Pro7 und Leu9/Pro10) intermolekulare Distanzeinschränkungen zu HckSH3, aber auch die Ser2-, Tyr4- und His1-Rückgratotope im aminoterminalen Teil des Peptids.

3.5 Raumstrukturberechnung und -analyse

Die 2500 Abstandseinschränkungen wurden für die Berechnung der Raumstruktur des HckSH3:PD1-Komplexes mittels des Programms DYANA verwendet. Durch Torsionswinkeldynamik-Simulation wurden, ausgehend von Zufallskonformationen des Moleküls, eine Schar von 100 Strukturen berechnet, wobei die Erfüllung der NOE-abgeleiteten Einschränkungen dazu als Zielfunktion dient. Die Strukturberechnung im Torsionswinkelraum besitzt den Vorteil, dass Topologie und Bindungslängen während der Simulation konstant gehalten werden können. Die Berechnung der Torsionswinkel erfolgt ausgehend vom Aminoterminus durch die gesamte Polypeptidkette. Dadurch ist die Berechnung eines Komplexes aus zwei Molekülen nur möglich, wenn diese durch einen "imaginären" Linker miteinander zu einer einzigen Aminosäurekette verknüpft werden. Im Falle des HckSH3:PD1-Komplexes wurde daher zwischen HckSH3-Carboxyterminus und PD1-Aminoterminus eine Kette aus 32 Pseudoatomen mit je 5 Å Bindungslänge, freien dihedralen Winkeln und ohne repulsive Eigenschaften eingefügt.

Die Strukturberechnung resultierte in einer konvergierenden Schar der 100 Konforme-

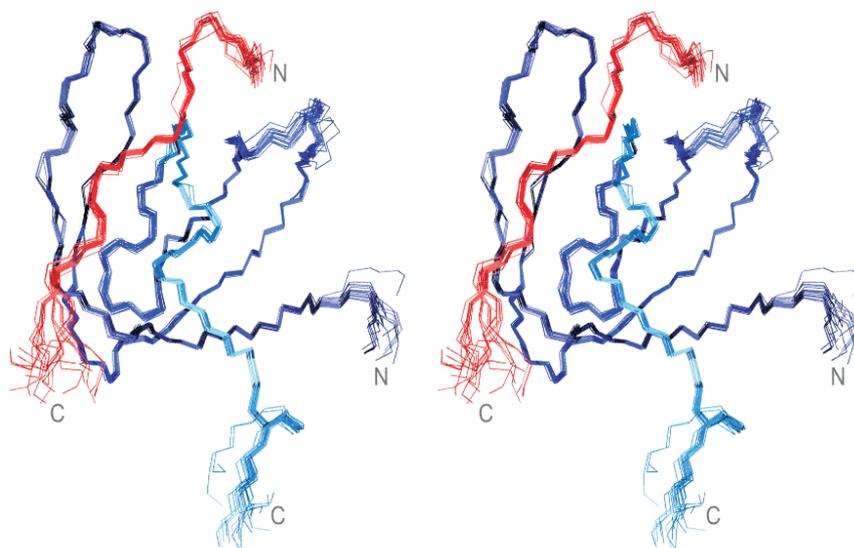


Abbildung 3.10: Stereodarstellung der Proteinrückgrate einer Schar von 20 aus 100 DYANA-berechneten Raumstrukturen des HckSH3:PD1-Komplexes. Die Peptid-Rückgrate sind rot, die von HckSH3 blau dargestellt. Zur besseren Visualisierung des dreidimensionalen Charakters der Strukturschar sind die Proteinrückgrate von HckSH3 in verschiedenen Blau-Abstufungen eingefärbt.

re. Die Güte der Berechnung lässt sich aus den DYANA-Zielfunktionen schließen, in der die Erfüllung der experimentellen Einschränkungen sowie die von van-der-Waals-Abständen eingeht. Die Konformerenschar, die zur Charakterisierung der Raumstruktur des HckSH3:PD1-Komplexes verwendet wurde, ist in Abbildung 3.10 dargestellt, die Strukturstatistiken sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

Tabelle 3.2: Verwendete experimentelle Distanzeinschränkungen und Statistik der Strukturberechnung für eine Schar von 20 Konformeren des HckSH3:PD1-Komplexes.

experimentelle Einschränkungen			
Gesamtzahl der zugeordneten NOEs		2500	
intermolekular		354	
	HckSH3		PD1
Intraresiduell ($ i - j = 0$)	352		22
Sequenziell ($ i - j = 1$)	564		85
mittlere Reichweite ($2 \leq i - j \leq 5$)	282		8
große Reichweite ($ i - j > 5$)	833		0
DYANA-Strukturstatistiken			
DYANA-Zielfunktion (Å^2)		0,48 ± 0,04	
Verletzung der oberen Abstandseinschränkungen (Anzahl > 0.1Å)		0,6	
Maximale Verletzung der oberen Abstandseinschränkungen (Å)		0,13	
r.m.s.d.-Werte			
relativ zur mittleren Struktur			
	HckSH3-Reste	HckSH3-Sekundärstrukturen	PD1-Reste
	79-136	2-10	
Rückgratschweratome (Å)	0,32 ± 0,08	0,24 ± 0,07	0,47 ± 0,20
Alle Schweratome (Å)	0,93 ± 0,16	0,58 ± 0,09	0,93 ± 0,26
ϕ-/ψ-Torsionswinkel			
im Ramachandran-Plot			
Bevorzugte Regionen (%)		62,0	
Erlaubte Regionen (%)		33,7	
Weitgehend erlaubte Regionen (%)		1,5	

Die Analyse des HckSH3:PD1-Komplexes wurde mit den Programmen PROCHECK-NMR (Laskowski et al., 1996) und MOLMOL (Koradi et al., 1996) durchgeführt.

Die Konvergenz der Konformerenschar lässt sich durch r.m.s.d (root mean square deviation)-Werte untersuchen, die auf der Berechnung von Koordinatendifferenzen der Atompositionen zwischen den verschiedenen Konformeren beruhen (Abbildung 3.11). Erkennbar ist eine deutlich verminderte Koordinatenpräzision im amino- und carboxyterminalen Bereich (Aminosäuren G55 bis E78 und S137 bis T140), für die auch nur wenige obere Distanzeinschränkungen vorlagen (siehe Abbildung 3.9 C). Insbesondere für die aminoterminalen Reste P60 bis G76 war dies zu erwarten, da diese Aminosäuren strukturell zur flexiblen Hck Unique-Domäne gehören (Kapitel 3.1). Auch die Loopregionen von HckSH3 zeigen höhere r.m.s.-Abweichungen, während die Bereiche der β -Faltblattstränge sehr gut definiert sind. Da die Zuordnung der Aminosäureatome in den Bereichen erhöhter r.m.s.-Abweichungen nahezu vollständig ist, lässt sich die verminderte Koordinatenpräzision durch das Fehlen von stabilisierender Sekundär- und Tertiärstruktur in diesen Regionen erklären.

Für das Peptid sind die Aminosäurereste im Bereich des Kernmotivs xPxxP gut definiert (Tyr4 bis Pro10) sowie die Koordinaten der Atome des Aminosäurerückgrats der aminoterminalen Reste. Vor allem die carboxyterminalen Aminosäuren Ser11 und Leu12 zeigen hohe r.m.s.-Abweichungen. Der Grund für die wohldefinierten Koordinaten der Reste des Kern-

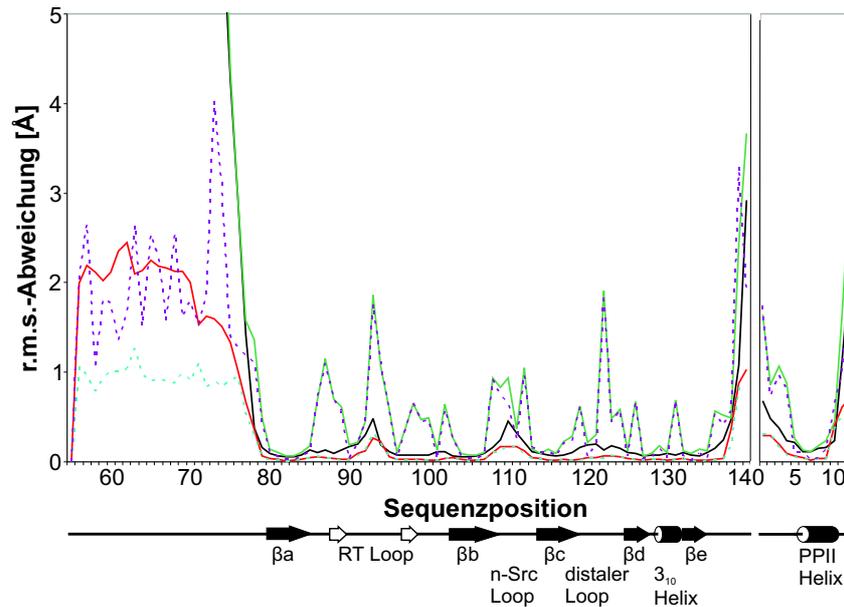


Abbildung 3.11: Koordinatenpräzision der berechneten Raumstrukturschar des HckSH3:PD1-Komplexes. Dargestellt sind die über die Strukturschar gemittelten, paarweisen r.m.s.-Abweichungen der Atomkoordinaten relativ zur mittleren Struktur pro Sequenzposition; links für die Reste von HckSH3, rechts für die Peptidreste. Schwarz: Globale Abweichungen aller Schweratompositionen des Proteinrückgrats; Grün: Globale Abweichung aller Schweratompositionen; Rot: lokale Abweichung der Rückgratschweratompositionen in Aminosäure-Dreiergruppen; Magenta, gestrichelt: lokale Abweichung der Rückgratschweratompositionen des mittleren Restes in Aminosäure-Dreiergruppen; Violett, gestrichelt: lokale Abweichung aller Schweratompositionen des mittleren Restes in Aminosäure-Dreiergruppen. Die globalen Abweichungen im aminoterminalen Bereich des HckSH3-Proteins wachsen bis auf etwa 50 Å am Aminoterminal an. Die Sekundärstrukturbereiche sind unten eingezeichnet.

motivs und der hohen Abweichungswerte der beiden carboxyterminalen Reste ist vor allem das Vorhandensein bzw. Fehlen von intermolekularen Distanzeinschränkungen. Diese sind durch die geringe Zahl von mittleren und das Fehlen von großen Distanzeinschränkungen für die Peptidreste maßgeblich für die Raumstrukturberechnung des Peptids.

Eine weitere Analyse der berechneten Strukturen lässt sich mit Hilfe des Ramachandran-Plot durchführen (Ramachandran et al., 1963). In diesem werden die ϕ - und ψ -Torsionswinkel der einzelnen Aminosäuren gegeneinander aufgetragen. Bereiche, die typischerweise in Proteinstrukturen auftreten, werden als "erlaubt" angesehen, Reste in definierten Sekundärstrukturelementen befinden sich in bevorzugten Regionen des Plots. Der prozentuale Anteil von Aminosäuren, deren ϕ - / ψ -Torsionswinkelkoordinaten in diesen erlaubten Regionen auftreten, gibt somit ein Maß für die Güte der berechneten Strukturparameter.

Der Anteil der sich in erlaubten Regionen des Ramachandranplots befindlichen Aminosäurepositionen der hier berechneten Raumstrukturschar liegt über 97% (Abbildung 3.12). Aminosäurepositionen mit abweichenden ϕ - / ψ -Torsionswinkelkoordinaten befinden sich in den Strukturbereichen geringerer Koordinatenpräzision, vor allem im aminoterminalen Bereich des Proteins (Reste P60 bis G76, sequenziell zur Unique-Domäne gehörend (Kapitel 3.1)).

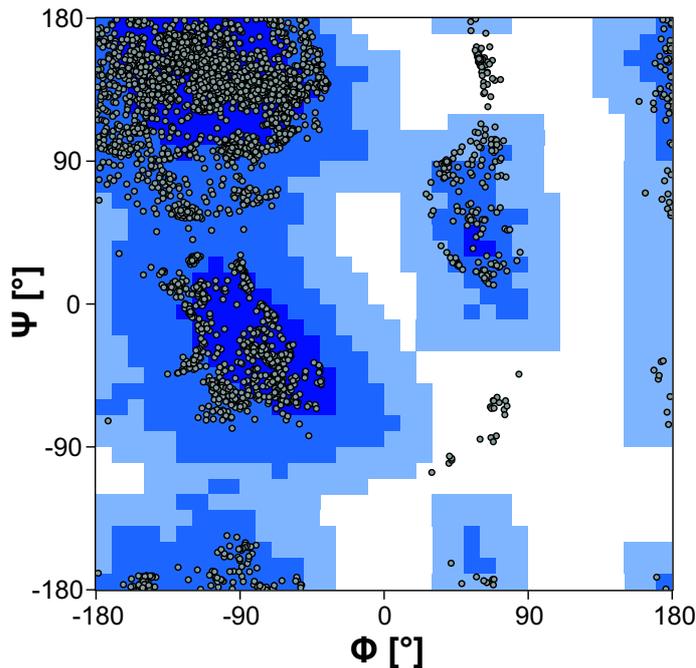


Abbildung 3.12: Ramachandran-Plot des HckSH3:PD1-Komplexes. Dargestellt sind die ϕ - und ψ -Torsionswinkelkoordinaten für alle Aminosäuren der 20 berechneten Konformere des Komplexes. Dunkelblau: Bevorzugte Regionen (Oben links: β -Faltblatt-Konformation; Mitte links: rechteggige α -Helix; Mitte rechts: linksgängige α -Helix und 3_{10} -Helix); Hellblau: Erlaubte Regionen; Magenta: Weitgehend erlaubte Regionen. Glycine können aufgrund ihrer fehlenden Seitenkette jede beliebige ϕ / ψ -Torsionswinkelkorrelation im Ramachandran-Plot einnehmen.

Die Ribbon-Darstellung des HckSH3:PD1-Komplexes (Abbildung 3.13) zeigt die typische Faltung einer SH3-Domäne für das HckSH3-Protein. Ein β -barrel bestehend aus zwei β -Faltbättern mit je drei antiparallelen β -Strängen. Der zweite β -Strang (β b) wird durch einen β -bulge bei L107 in zwei Einzelstränge geteilt (β b1 und β b2), welcher durch die starken NOE-Korrelationen der Amidprotonen der Aminosäuren L107 und E108 im 3D (^1H - ^1H - ^{15}N)-NOESY-HSQC-Spektrum verifiziert werden kann. Die Stränge β a (I80 bis A84) und β b (Q103 bis E108) werden durch den RT-Loop (L85 bis D102), β b und β c (W114 bis S119) durch den n-Src-Loop (E109 bis W113), β c und β d (E124 bis I127) durch den distalen Loop (L119 bis K123), β d und β e (V132 bis R134) durch eine kurze 3_{10} -Helix (S129 bis Y131) voneinander getrennt. Die beiden Faltblätter bestehen aus den Strängen β a/ β b1/ β e und β b2/ β c/ β d.

Zusätzlich existiert ein kurzes antiparalleles β -Faltblatt im RT-Loop (Y88/E89 und S97/F98), welches in 16 der 20 Konformeren die typischen Geometrieigenschaften für β -Faltblattstrukturen zeigt und in den bisher existierenden Strukturen der freien und intramolekular gebundenen Hck SH3-Domänen nicht vorhanden ist (Kapitel 3.9). Definiert wird es unter anderem durch die Wasserstoffbrückenbindungen der Amid- und Carbonylgruppen der Aminosäuren Y88 und F98.

Die insgesamt globuläre Form von HckSH3 ist im Bereich der hydrophoben Peptidbindungsstelle etwas abgeflacht (Dimensionen von etwa $22 \times 21 \times 14 \text{ \AA}$), der Kern des Proteins besteht ausschließlich aus Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten.

Das Peptid bildet zwischen den Resten des xPxxP-Motives Leu6 bis Pro10 eine Typ II Poly-Prolin-Helix mit typischen ϕ - und ψ -Torsionswinkeln (-78° und $+146^\circ$; Cowan & McGavin, 1955) aus. Aminoterminal dieser Helix knickt das Peptidrückgrat zur HckSH3-Oberfläche hin ab und lagert sich in einer "S"-förmigen Schleife in eine hydrophobe Mulde zwischen RT- und n-Src-Loop an.

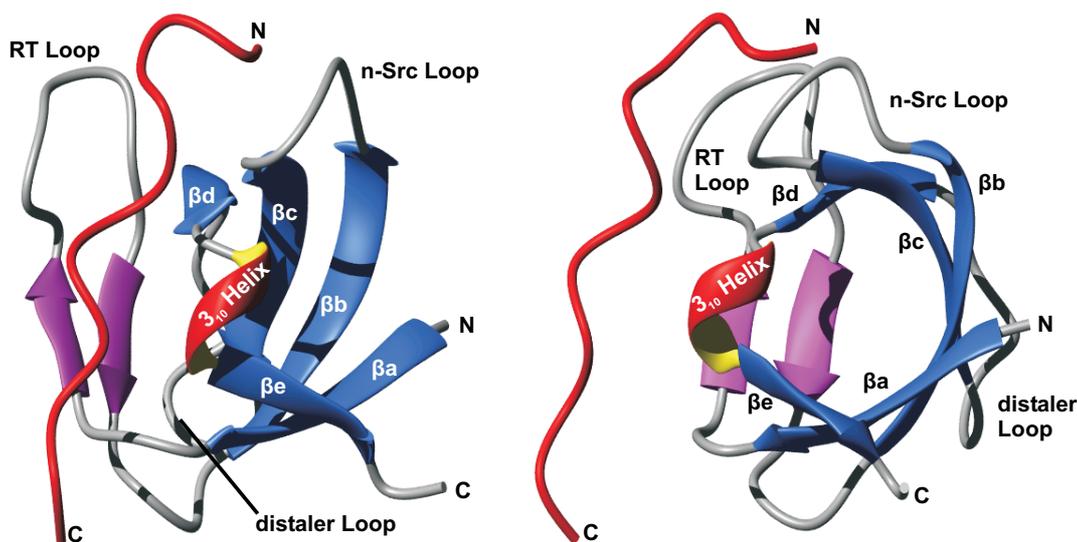


Abbildung 3.13: Ribbondarstellung einer repräsentativen Konformere der Raumstrukturberechnung des HckSH3:PD1-Komplexes (HckSH3-Reste 79-135, PD1-Reste 1-12). β -Faltblätter werden durch Bänder mit Pfeilen dargestellt, α -Helices durch gewundene Bänder. Amino- und Carboxyterminus sowie Sekundärstrukturen und Loops sind eingezeichnet, das Peptid ist rot dargestellt. Die neue β -Faltblatt-Struktur im RT-Loop ist violett dargestellt. Die rechte Abbildung entspricht der linken nach einer 45° -Drehung um die vertikale Achse; die β -barrel-Struktur der SH3-Domäne ist hier erkennbar.

3.6 Kartierung der HckSH3:PD1-Bindungsstelle

Mittels der NMR-Titrationsexperimente des HckSH3:PD1-Komplexes und der Zuordnung der Proteinrückgrat-Atome von freier und PD1-gebundener HckSH3 (Kapitel 3.3.1 und 3.3.2) konnte die PD1-Bindungsstelle von HckSH3 kartiert werden. Die durch die Bindung hervorgerufene Änderung der chemischen Umgebung der Aminosäuren im Bereich der Bindungsstelle verursacht eine Änderung der chemischen Verschiebungen dieser Atome in den NMR-Spektren. Die $(^{15}\text{N}-^1\text{H})$ -HSQC-Spektren von freier und PD1-gebundener HckSH3 sind in Abbildung 3.14, die Änderungen der chemischen Verschiebungen der H^{N} - und N-Resonanzen des HckSH3-Proteinrückgrats in Abbildung 3.15 A-C dargestellt. Die Berechnung erfolgte wie in Kapitel 2.6.4 beschrieben. Die Aminosäuren mit Änderungen größer als 0,2 ppm (Abbildung 3.15 C) sind in der Oberflächendarstellung des HckSH3:PD1-Komplexes in Abbildung 3.15 D eingefärbt.

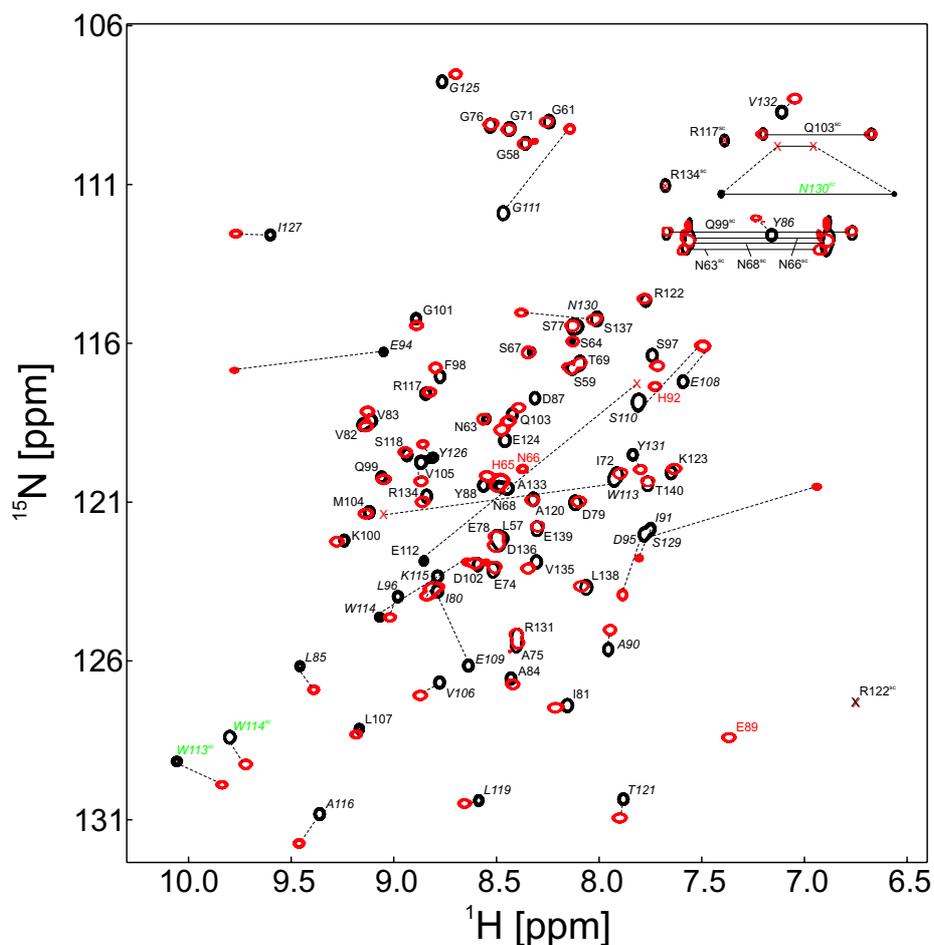


Abbildung 3.14: Überlagerung der (^{15}N - ^1H)-HSQC-Spektren von freier (schwarz) und PD1-gebundener HckSH3 (rot, PD1 und HckSH3 in äquimolarem Verhältnis). Die höchsten Änderungen in den chemischen Verschiebungen der Amidresonanzen sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die Zuordnung der Resonanzen von freier HckSH3 ist in schwarz angegeben (Einbuchstaben-Aminosäure-Kode). Resonanzen, die nur im PD1-gebundenen Zustand von HckSH3 detektierbar sind in rot, Seitenkettenresonanzen, deren chemische Verschiebung sich bei PD1-Bindung verändern, in grün zugeordnet. Asparagin- und Glutamin-Amidseitenketten-Resonanzen sind mit durchgezogenen Linien verbunden.

Die Änderungen treten vor allem in den Bereichen des RT-Loops (E94 und HckSH3-Kompassrest D95) und des n-Src-Loops (Reste E109 bis W114) auf, also im Bereich der HckSH3-Spezifitätstasche sowie im Bereich der 3_{10} -Helix (Reste I127, S129 und N130), wo sich die beiden hydrophoben Bindungstaschen befinden. Die Amidresonanzen der RT-Loop-Reste H92 und H93 waren im freien Zustand von HckSH3 nicht detektierbar, wodurch die Änderungen dieser Resonanzen nicht bestimmt werden konnten.

Neben den Änderungen der chemischen Verschiebungen der Proteinerückgrat-Amidgruppen zeigen sich im Vergleich der beiden (^{15}N - ^1H)-HSQC-Spektren auch Änderungen in den chemischen Verschiebungen der Iminogruppen von W113 und W114 sowie der Seitenketten-Amidgruppen von N130 (Abbildung 3.14), was aufgrund von Interaktionen dieser Seitenketten mit PD1 verursacht werden könnte.

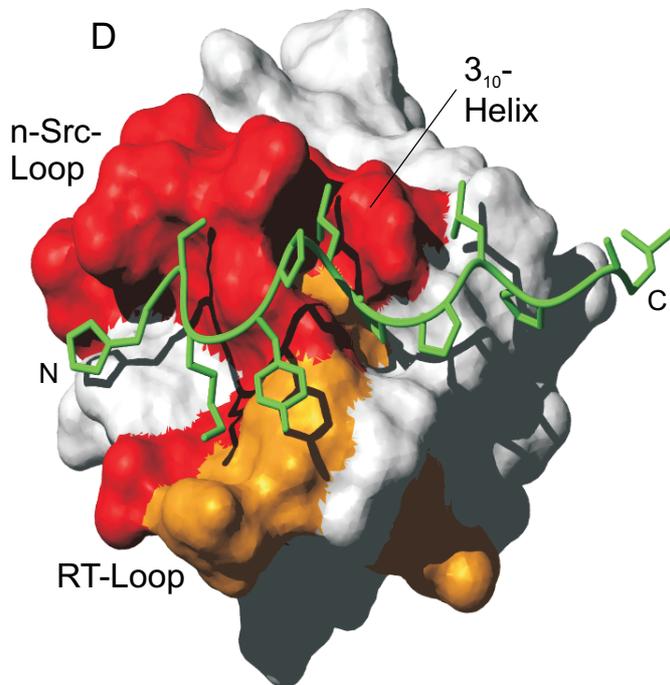
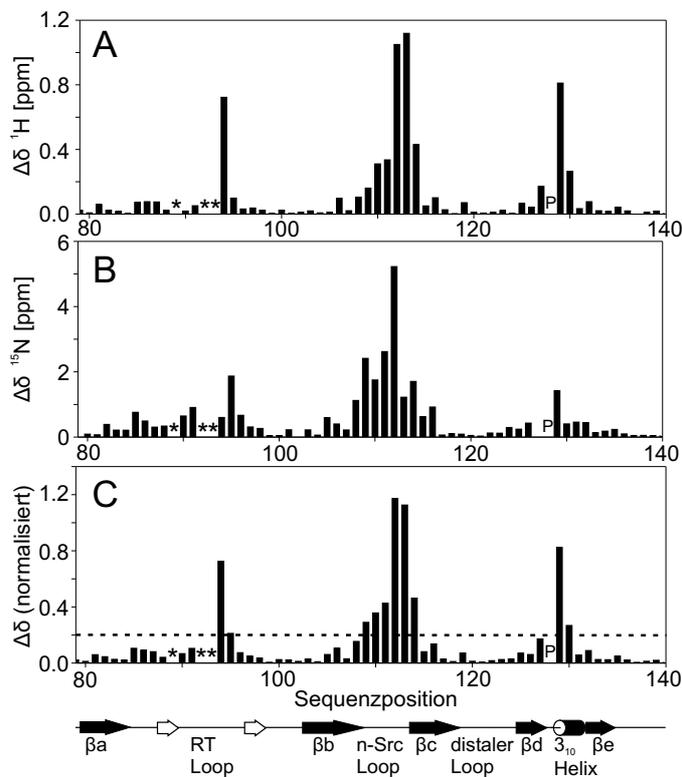


Abbildung 3.15: Änderung der chemischen Verschiebungen der HckSH3-Proteinrückgrat-Amidresonanzen bei PD1-Bindung. **A** Änderung der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen-, **B** der Amidstickstoff-Resonanzen. **C** Normalisierte Änderung der chemischen Verschiebungen (nach Gleichung 2.6). Aminosäuren, deren Änderung der chemischen Verschiebungen ihrer Amidresonanzen nicht bestimmbar waren, sind durch "*"**, Proline durch "P" markiert. Die Sekundärstrukturelemente sind eingezeichnet. **D** Oberflächendarstellung des HckSH3:PD1-Komplexes. Aminosäuren, deren Amidresonanzen Änderungen in der chemischen Verschiebung größer als die eingezeichnete Linie in (C) aufweisen (0,2 ppm), sind in rot hervorgehoben, Aminosäuren, deren Änderung der chemischen Verschiebungen ihrer Amidresonanzen nicht bestimmbar waren und Proline orange eingefärbt. Das PD1-Peptid ist in grün dargestellt.

3.7 Untersuchung der HckSH3:PD1-Bindungsstelle

Bei der Komplexbildung von HckSH3 und PD1 werden etwa 689 \AA^2 dem Lösungsmittel zugängliche Oberfläche eingeschlossen (berechnet mit MOLMOL; Koradi et al., 1996), die miteinander interagierenden Regionen von HckSH3 und PD1 besitzen überwiegend hydrophoben Charakter (Abbildung 3.16). Die PD1-Position deckt sich mit der in Kapitel 3.6 kartierten Bindungsstelle, sie liegt zwischen n-Src-Loop, 3_{10} -Helix und dem RT-Loop.

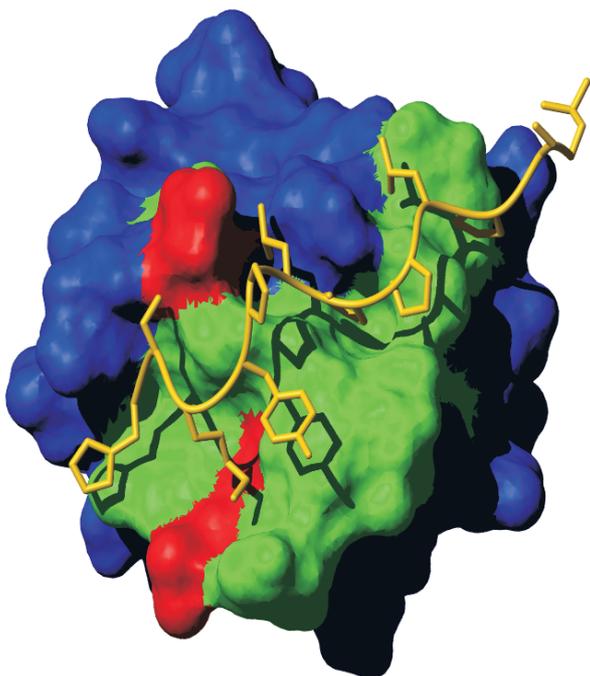


Abbildung 3.16: Oberflächendarstellung von HckSH3 im Komplex mit dem PD1-Peptid. Hydrophobe Aminosäuren im Bereich der SH3-Bindungsstelle sind grün, die negativ geladenen Aminosäuren im n-Src- (E112, oben) und RT-Loop (E94 und D95, unten) rot eingefärbt. Das Peptid ist in orange dargestellt.

Abbildung 3.17 zeigt die Bindungsstelle des HckSH3:PD1-Komplexes. Das Peptid nimmt eine Typ-I Bindungsorientierung ein, der Aminoterminal des Peptids bindet in die Kompassstasche von HckSH3. Die Aminosäuren Leu6 bis Pro10 zeigen die typischen ϕ - und ψ -Torsionswinkel einer PPII-Helix-Konformation. Aminoterminal von Leu6 wölbt sich das Peptidrückgrat etwas von der HckSH3-Oberfläche ab und lagert sich dann im Bereich der Kompassstasche von HckSH3 in einer "S"-förmigen Schleife wieder an deren Oberfläche zwischen RT- und n-Src-Loop an. Die konservierten Prolinreste der xP-Dipeptide Pro7 und Pro10 binden in die Positionen P_0 und P_3 , während die Aminosäuren Leu6 und Leu9 die Positionen P_{-2} und P_2 von HckSH3 besetzen (Kapitel 1.3.2). Die Seitenketten des Dipeptids Leu9/Pro10 binden in die zweite hydrophobe xP-Dipeptid-Bindungstasche von HckSH3, die durch die Seitenketten des Y131-Restes der 3_{10} -Helix und des Y86-Restes im RT-Loop gebildet wird (vgl. mit Abbildung 1.10).

Die Seitenketten des Leu6/Pro7-Dipeptids bilden starke hydrophobe Kontakte mit den Aminosäuren der ersten xP-Dipeptid-Bindungstasche von HckSH3 (vgl. mit Abbildung 1.10). Diese Bindungstasche besteht aus den Seitenketten der Reste W113 des n-Src-Loops, P128 und Y131 der 3_{10} -Helix sowie Y88, I91 und H95 des RT-Loops. Die Seitenkette

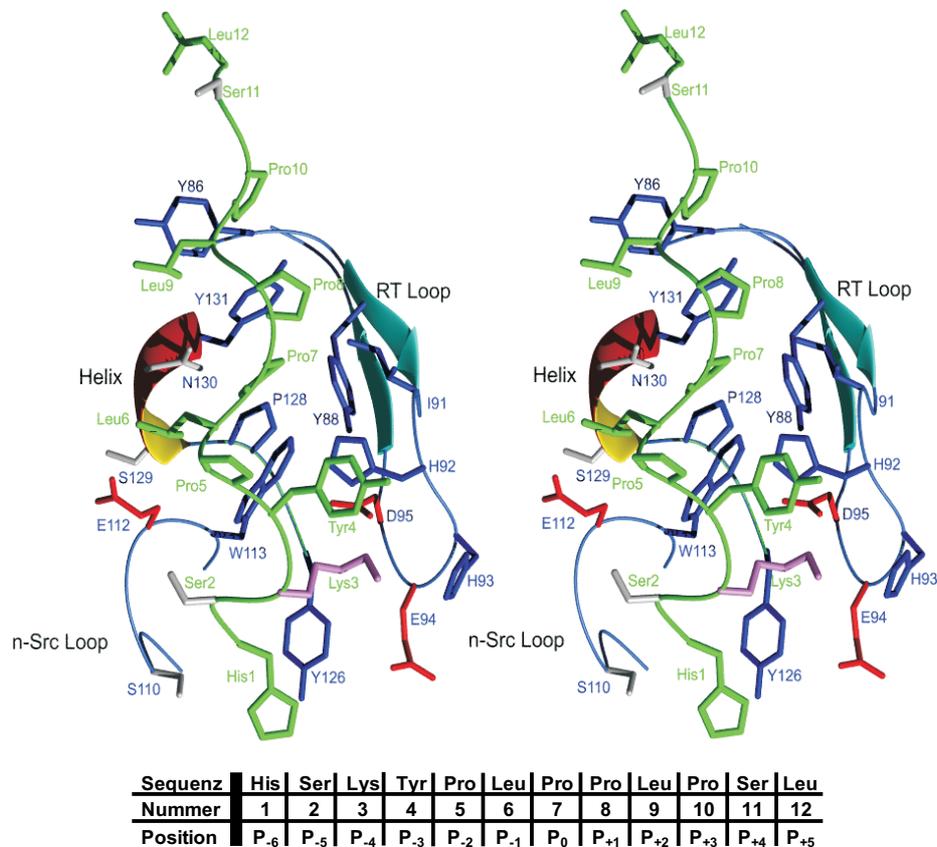


Abbildung 3.17: Stereodarstellung der Bindungsregion des HckSH3:PD1-Komplexes mit den relevanten Aminosäureseitenketten. Proteinrückgrat und hydrophobe Seitenketten von HckSH3 sind blau, die des Peptids grün dargestellt. Geladene Aminosäureseitenketten von HckSH3 sind rot, die des Peptids violett eingefärbt, polare Seitenketten sind grau dargestellt. Die Aminosäurereste von HckSH3 sind im Einbuchstaben-, die des Peptids im Dreibuchstaben-Aminosäure-Kode beschriftet. Aminosäuresequenz, Sequenznummerierung und Position (nach Lim & Richards, 1994; Kapitel 1.3.2) des PD1-Peptids sind unten angegeben.

von Leu6 lagert sich dabei zwischen die Seitenketten der HckSH3-Reste E112, S129 und N130, wobei letztere zwischen den Seitenketten der Leucine 6 und 9 positioniert ist. Die Seitenketten-Amidgruppe von N130 bildet in allen 20 betrachteten Strukturen eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Carbonylgruppe des Pro7 aus, was die Änderung der chemischen Verschiebung dieser Seitenketten-Amidgruppe bei Zugabe von PD1 zu HckSH3 erklären könnte (Kapitel 3.6). Die Atompositionen der beiden Dipeptide von PD1 zeigen in den 20 Konformeren die geringsten relativen Abweichungen zueinander (Abbildung 3.11), was durch die große Zahl an intermolekularen NOE-Distanzeinschränkungen zustande kommt (Abbildung 3.9 D).

Die Seitenkette des zwischen den beiden Dipeptiden liegenden Pro8 weist von der Bindungsfläche von HckSH3 weg, bildet jedoch, wie auch Pro7, Kontakte mit der hydrophoben Seitenkette von I91 im RT-Loop, zu der auch intermolekulare NOEs erkennbar sind. Eine für SH3:PPII-Liganden mit Typ-I-Orientierung typische Wasserstoff-

brückenbindung zwischen der Carbonylgruppe des Pro8-Restes und der Hydroxylgruppe des HckSH3-Restes Y131 (Musacchio, 2003) ist nicht auszuschließen, aber in nur fünf der 20 betrachteten Strukturen definiert.

Die carboxyterminalen Aminosäuren Ser11 und Leu12 scheinen keinen Beitrag zur Bindungsaffinität zu leisten. Die Seitenkette von Ser11 weist in entgegengesetzte Richtung zur HckSH3-Oberfläche und zeigt keine Distanzeinschränkungen mittlerer oder großer Reichweite sowie keine intermolekularen Distanzeinschränkungen. Der Leu12-Rest zeigt schwache intermolekulare NOE-Korrelationen zur hydrophoben Seitenkette von Y86 (Abbildung 3.8). Die geringe Zahl von Distanzeinschränkungen für die beiden carboxyterminalen Aminosäuren des Peptids (Abbildung 3.9 D) schlägt sich in einem hohen r.m.s.d.-Wert in der Strukturrechnung nieder (Abbildung 3.11).

Die Seitenkette des Restes Pro5 weist ebenfalls in entgegengesetzte Richtung der HckSH3-Oberfläche und scheint keinen Beitrag zur Bindungsenergie zu liefern. Der Pro5-Rest liegt über der Seitenkette des W113-Restes, an dieser Position endet die PPII-Helix Konformation für SH3-gebundene Liganden typischerweise (Williams et al., 1998), was auch für den HckSH3:PD1-Komplex zutrifft. An dieser Position "knickt" das Peptidrückgrat ab und lagert sich aminoterminal an die HckSH3-Oberfläche zwischen n-Src- und RT-Loop an.

Der aromatische Ring von Tyr4 liegt auf einer hydrophoben Oberfläche, die aus den Seitenketten der HckSH3-Reste W113, H93, H92 und I91 gebildet wird und trägt durch extensive van-der-Waals-Wechselwirkung mit dem Imidazolring von H92, der in die SH3-Kompasstasche hinein geklappt ist, zur Bindungsaffinität bei. Die beiden Ringe bilden in elf der 20 betrachteten Strukturen eine parallel verschobene, π -geschachtelte Konformation aus, für fünf der Konformeren steht die planare Tyrosin-Seitenkette senkrecht auf dem Histidin-Ring und in vier Strukturen bilden sie einen 45° -Winkel zueinander. Die unterschiedlichen Konformationen der Tyr4-Seitenketten relativ zur Seitenkette von H92 in den Konformeren weist vermutlich darauf hin, dass der aromatische Ring von Tyr4 trotz der intermolekularen Wechselwirkung mit H92 frei rotierbar bleibt. Der Tyr4-Rest bildet über seine Carbonylgruppe zwei Wasserstoffbrückenbindungen aus. Die Wasserstoffbrückenbindung zur Iminogruppe des Indolrings von W113 ist in allen 20 Strukturen vorhanden und typisch für SH3-Bindungen an Liganden mit PPII-Konformation (Musacchio, 2003). Die Wasserstoffbrückenbindung zur Amidgruppe von Leu6 ist in 19 der 20 Strukturen definiert und könnte wichtig für die Stabilisierung der Wölbung des Peptidrückgrats im Bereich des Pro5-Restes sein und damit für die optimale Positionierung der aminoterminal folgenden Reste des PD1-Peptids (siehe Kapitel 4.3.5). Beispiele für intermolekulare NOE-Korrelationen zwischen Tyr4 und den Aminosäuren H92 sowie W113 sind in Abbildung 3.8 dargestellt, die Wasserstoffbrückenbindung zur Iminogruppe des Indolrings von W113 wird zudem durch die Änderung der chemischen Verschiebung dieser Iminogruppe bei PD1-Titration zu HckSH3 bestätigt (Kapitel 3.6).

Die basische Seitenkette von Lys3 weist in Richtung der Kompasstasche von HckSH3 (vgl. mit Abbildung 1.10). Für diese Aminosäure wurden keine intermolekularen NOE-Distanzeinschränkungen gefunden, wodurch die Seitenkette keine definierte Konformation besitzt. Eine für SH3:PPII-Liganden-Wechselwirkungen typische Salzbrücke mit der sauren D95-Seitenkette konnte nicht verifiziert werden.

In einigen der 20 Konformeren weist die Seitenkette des Lys3-Restes allerdings in die Komparttasche von HckSH3 hinein, was zeigt, dass eine Salzbrückenbildung mit D95 sterisch erlaubt ist. Möglich ist auch eine Salzbrückenbildung mit der sauren Seitenkette von E94 im RT-Loop von HckSH3 (Abbildung 3.18) oder beiden Resten. Obwohl sich die Aminosäure Lys3 an der Position P₋₄ anstatt der typischen P₋₃-Position (Src-Typ SH3-Konsensus-Sequenz für Klasse-I-Liganden, Kapitel 1.3.2) befindet, ist deren Seitenkette in der Lage, eine Salzbrücke mit der des D95-Restes zu bilden. Eine DYANA-Strukturberechnung mit zusätzlichen Distanzeinschränkungen für eine Salzbrücke zwischen den Seitenketten von Lys3 und D95 (obere Abstandseinschränkung $(H^{\zeta 1}/H^{\zeta 2}/H^{\zeta 3})_{Lys3}-(O^{\delta 1})_{D95} = 3\text{\AA}$) ergab keine zusätzlichen Verletzungen von Abstandseinschränkungen oder van-der-Waals-Radien (Abbildung 3.18).

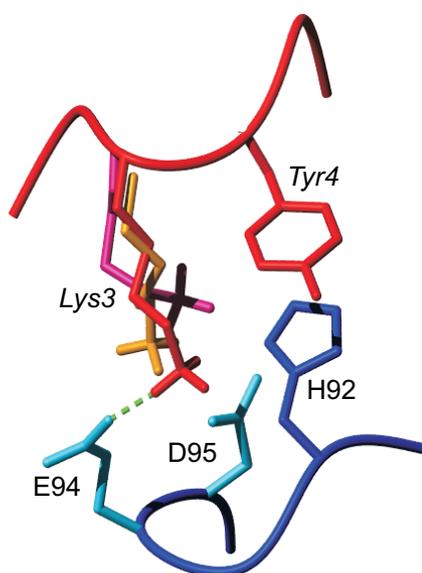


Abbildung 3.18: Lys3-Positionen des Peptids in der Komparttasche von HckSH3 bei zwei verschiedenen Konformeren der berechneten Strukturschar. Rückgrat und Aminosäureseitenketten von HckSH3 sind blau, die des Peptids rot bzw. violett dargestellt. Die orange gefärbte Lys3-Seitenkette zeigt deren Position nach Strukturrechnung mit zusätzlichen Distanzeinschränkungen für eine Salzbrücke zwischen den Seitenketten von Lys3 und D95.

Die kurze Seitenkette von Ser2 fügt sich perfekt in die Lücke zwischen den Seitenketten der Aminosäuren S110 und E112 im n-Src-Loop.

Die Seitenkette des Restes His1 liegt zwischen n-Src- und RT-Loop. Der Seitenketten-Indolring ist aufgrund unvollständiger Resonanzzuordnung und fehlender intermolekularer Distanzeinschränkungen (Kapitel 3.3.5 und 3.5) nicht exakt definiert und liegt auf einer hydrophoben Oberfläche, die von den Resten Y126, W113 und den zwei Histidinresten im RT-Loop (H92 und H93) gebildet wird. Die Position des aminoterminalen Peptidrückgrats ist sehr gut definiert und löst sich nicht wie am Carboxyterminus von der SH3-Oberfläche, was auf Wechselwirkungen dieser Aminosäuren mit der SH3-Domäne schließen lässt. Der Imidazolring von His1 könnte durch schwache van-der-Waals-Wechselwirkungen mit der Seitenkette des Y126 zur Bindungsenergie beitragen. Es existieren direkte NOE-Korrelationen zwischen dem His1-Amidproton und den Protonen der Y126-Seitenkette. Weitere NOE-Korrelationen sind zwischen den Protonen der SH3-Aminosäuren des n-Src-Loops G111, E112, W114 und vor allem W113 mit der His1-Amidgruppe erkennbar (siehe auch Abbildung 3.8). In 13 der 20 Konformeren bildet die Amidgruppe von His1 eine Wasserstoffbrücke mit der Carbonylgruppe von W113 aus.

Da das PD1-Peptid in Typ-I-Orientierung an HckSH3 bindet und die Konsensus-Sequenz für Liganden der Klasse I' (LPxXP; Kapitel 1.3.2) erfüllt, wurde die Konformation der W113-Seitenkette von HckSH3 genauer inspiziert. Da HckSH3 an der Aminosäuresequenzposition 126 einen hydrophoben Rest besitzt (Y126), ist die W113-Seitenkette in der Lage, sowohl eine SH3-I- als auch eine SH3-II-Orientierung einzunehmen (Kapitel 1.3.2). Somit können sowohl Liganden in Typ-I- als auch in Typ-II-Orientierung an HckSH3 binden.

Die Kristallstruktur des FynSH3:3BP2-Komplexes (PDB-Eintrag 1FYN; Musacchio et al., 1994) zeigt eine SH3-I-Orientierung der Seitenkette des konservierten Tryptophanrestes W119 in der Fyn SH3-Domäne (Fernandez-Ballester et al., 2004). Diese Struktur wurde daher dazu verwendet, die Konformation der W119-Seitenkette mit der des entsprechenden Tryptophanrestes W113 von HckSH3 im HckSH3:PD1-Komplex zu vergleichen.

Eine Überlagerung der β -Faltblatt- C^α -Atompositionen der Fyn SH3-Domäne und von HckSH3 zeigt, dass sich die W113-Seitenkette von HckSH3 in SH3-II-Orientierung befindet (Abbildung 3.19).

Die Seitenkette neigt sich gegenüber der der Fyn SH3-Domäne um etwa 15° zum konservierten P128-Rest hin, dessen Seitenkette wiederum in Richtung des Y131-Restes in der 3_{10} -Helix weist.

Da das PD1-Peptid in Typ-I-Orientierung an HckSH3 bindet und sich die W113-Seitenkette von HckSH3 in SH3-II-Orientierung befindet, kann die Peptidbindung zur Klasse I' zugeordnet werden.

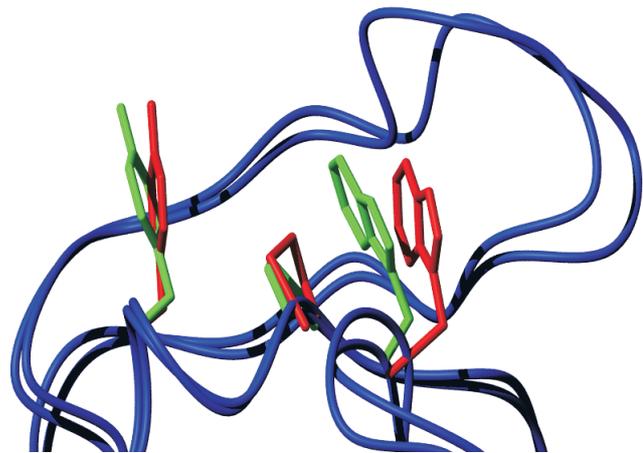


Abbildung 3.19: Überlagerung der Fyn (1FYN) und der Hck SH3-Domäne. Die Seitenketten der Aminosäuren W113, P128 und Y131 von HckSH3 sind grün, die der entsprechenden Aminosäuren W119, P134 und Y137 der Fyn SH3-Domäne rot dargestellt.

3.8 Untersuchung von H_2O -/ D_2O -Austauschraten der HckSH3-Amidprotonen

Zur Identifizierung von Wasserstoffbrückenbindungen in Proteinen mittels NMR-Spektroskopie existieren zwei Möglichkeiten: Durch direkte Messung von skalaren Kopplungen, die durch die Wasserstoffbrückenbindung vermittelt werden, oder durch Nachweis einer stark reduzierten Austauschrate der in die Bindungen involvierten Amidpro-

tonen. Die direkte Messung der skalaren Kopplungen war nicht möglich, da die (H^N -C)-Korrelationssignale aufgrund der schnellen Relaxation der Stickstoffatome kaum detektierbar waren und der HckSH3:PD1-Komplex bei Messungen mit höheren Temperaturen (zur Erhöhung der ^{15}N -Relaxationszeiten) destabilisierte. Um den Einfluss der Bindung des PD1-Liganden an HckSH3 weiter zu untersuchen und vor allem die entstehenden Sekundärstrukturen im RT-Loop zu verifizieren, wurden daher NMR-Experimente zur Bestimmung von $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Austauschraten der HckSH3-Amidprotonen durchgeführt.

Die Proteinproben von freier HckSH3 und des äquimolaren Verhältnisses aus HckSH3 und PD1 wurden dazu lyophilisiert und in D_2O aufgenommen. Die in Wasserstoffbrückenbindungen involvierten Amidprotonen sind weniger zugänglich für das umgebende Lösungsmittel und können so aufgrund ihrer langlebigen Korrelationssignale im (^{15}N - ^1H)-HSQC-Spektrum identifiziert werden. Das allmähliche Verschwinden der Kreuzsignale wurde durch eine Zeitreihe von (^{15}N - ^1H)-HSQC-Spektren-Aufnahmen verfolgt und die Halbwertszeiten der Amidprotonen-Lebensdauer berechnet. Dies ist die Zeit, nach der die Signale der (H^N/N)-Resonanzen auf halbe Intensität gesunken sind. Das Ergebnis der Experimente ist in Abbildung 3.20 dargestellt.

Im Fall von freier HckSH3 konnten die Amidresonanzen der Aminosäuren H92, H93, S129 und N130 in den (^{15}N - ^1H)-HSQC-Spektren nicht detektiert werden, die Amidgruppen-Resonanzen der Aminosäuren V82 und V83, I91 und D95, V105 und Y126 zeigen Überlappungen. Bei der Analyse des HckSH3:PD1-Komplexes wurde die Amidresonanz von H93 nicht detektiert, überlagert waren hier die Amidresonanzen der Reste D102 und W114, Q103 und V106, E108 und S110. Die Überlappung der Resonanzen erhöht den Fehler in der Resonanzintensitätsintegration und damit der Halbwertszeitberechnung. Da die Peakmaximas der Resonanzen jedoch voneinander getrennt werden konnten, beeinflusst dies die Ergebnisse der Auswertung nur marginal.

Die HckSH3-Amidprotonen mit verlängerten Lebenszeiten koinzidieren mit den für antiparallele β -Faltblatt-Strukturen zu erwartenden Wasserstoffbrückenbindungen ($\text{H}_i^N\text{-O}_j$, $\text{H}_j^N\text{-O}_i$; $\text{H}_{i+2}^N\text{-O}_{j-2}$, $\text{H}_{j-2}^N\text{-O}_{i+2}$). Neben diesen zeigen sich auch im amino- und carboxyterminalen Bereich des RT-Loops Amidresonanzen mit langer Lebensdauer (Abbildung 3.20 A).

Abbildung 3.20 B, in der die Halbwertszeiten der Amidprotonen des HckSH3:PD1-Komplexes dargestellt ist, zeigt ein ähnliches Bild wie Abbildung 3.20 A. Die Halbwertszeiten der HckSH3-Amidprotonen des HckSH3:PD1-Komplexes sind im Mittel um etwa einen Faktor 20 höher als die von freier HckSH3.

Die Resonanzen der Amidprotonen des unstrukturierten amino- und carboxyterminalen Bereichs (Aminosäuren G55 bis I80 und D136 bis T140) verschwinden bei freier und gebundener HckSH3 erwartungsgemäß sofort nach Aufnahme der Proben in D_2O . Die Seitenketten-Amidresonanzen verschwinden ebenfalls sofort bis auf die der Indolringe von W113 und W114, die beide im Bereich der Bindungsoberfläche liegen. Die Indol-Amidgruppe von W113 verschwindet sofort im Falle von freier HckSH3, besitzt im gebundenen Zustand jedoch eine Halbwertszeit von 30 min, die des W114 besitzt eine Halbwertszeit von 10 min im Falle der freien Hck und 30 min im gebundenen Zustand. Während die Indol-Amidgruppe des W113 eine Wasserstoffbrückenbindung mit der

W114 (46fach) und I127 (32fach). Keine dieser Aminosäuren ist direkt in die Bindung involviert, die drei Valinreste befinden sich sogar auf der gegenüberliegenden Seite der HckSH3-Bindungsstelle. Die stärksten Halbwertszeitverlängerungen von an der Bindung beteiligten Aminosäuren zeigen sich bei Y86 und Y88 im RT-Loop, was die berechnete β -Faltblatt-Struktur in diesem Loop unterstützt. Die starke Halbwertszeitverlängerung von Amidgruppen im RT-Loop deutet zudem darauf hin, dass dieser bei Bindung des PD1-Peptids an Flexibilität verliert.

3.9 Vergleich mit anderen HckSH3-Strukturen

Die Raumstruktur des HckSH3:PD1-Komplexes wurde mit HckSH3-Strukturen aus der RCSB Protein Datenbank (PDB) verglichen. Die hier bestimmte Struktur des HckSH3:PD1-Komplexes ist die erste Komplexstruktur der Hck SH3-Domäne mit einem Liganden. Der Vergleich wird daher mit den Raumstrukturen der freien und intramolekular gebundenen SH3-Domäne der Hck (Bindung der SH3-Domäne an den SH2-Kinase-Linker) durchgeführt, um strukturelle Änderungen in der SH3-Domäne bei Ligandenbindung aufzuzeigen. Da der SH2-Kinase-Linker, an den die SH3-Domäne im inaktiven Kinasezustand bindet, keine ideale Bindung mit der SH3-Domäne eingeht (MSSKPQKP; Sicheri et al., 1997), können auch die Strukturen von intermolekular gebundener HckSH3 nicht als "Standard"-Komplexstruktur (Bindung eines Liganden mit PxxP-Motiv) angesehen werden und bindungsbedingte Unterschiede zu HckSH3 im Komplex mit PD1 aufzeigen. Verwendet wurden die NMR-Lösungsstruktur (Horita et al., 1998; PDB-Eintrag 4HCK) und Kristallstruktur (Arold et al., 1998; PDB-Eintrag 1BU1) von freier HckSH3 sowie die Kristallstrukturen von inaktiver Hck, welche die SH2-, SH3- und katalytischen Domänen umfassen (Sicheri et al., 1997; PDB-Eintrag 1AD5 und Schindler et al., 1999; PDB-Eintrag 1QCF).

Tabelle 3.3: Globale r.m.s.-Abweichungen der Rückgratschweratompositionen der mittleren HckSH3-Struktur des HckSH3:PD1-Komplexes zu Vergleichsstrukturen der Hck SH3-Domäne. Die Strukturen wurden überlagert indem die r.m.s.-Abweichungen ihrer C $^{\alpha}$ -Atompositionen der Aminosäurereste in den β -Faltblattsträngen (Aminosäuren 80 bis 84, 103 bis 108, 114 bis 119, 125 bis 127 und 132 bis 134) minimiert wurden. Die r.m.s.d.-Werte wurden über die angegebenden Reste berechnet.

Struktur	r.m.s.d. (Reste 80-134)	r.m.s.d. ohne RT-Loop (Reste 80-84, 103-134)	r.m.s.d. ohne Loops und Helix (Reste 80-84, 103-108, 114-119, 125-127, 132-134)
4HCK	1,32	0,82	0,75
1AD5	0,92	0,73	0,55
1QCF	0,91	0,71	0,63
1BU1	0,95	0,80	0,68

Der Vergleich der Struktur des HckSH3:PD1-Komplexes mit den Strukturen aus der Datenbank zeigt einen hohen Grad an Ähnlichkeit und eine nahezu identische Anordnung der Sekundärstrukturelemente, was darauf hindeutet, dass keine signifikanten Konformationsänderungen bei Bindung des PD1-Peptids in HckSH3 stattfinden. Die r.m.s.-

Abweichungen der Aminosäurepositionen der Hck SH3-Domäne aus dem HckSH3:PD1-Komplex relativ zu den Vergleichsstrukturen ist in Tabelle 3.3 dargestellt.

Der Hauptanteil der r.m.s.-Abweichungen zwischen der gemittelten HckSH3-Struktur des Komplexes und den Vergleichsstrukturen rührt von den Aminosäuren der flexibleren Loopregionen - insbesondere des RT-Loops - und der 3_{10} -Helix (v.a. im Fall der Lösungsstruktur von freier HckSH3, 4HCK) her (Abbildung 3.21, Tabelle 3.3). Die drei Kristallstrukturen zeigen dabei eine höhere strukturelle Ähnlichkeit und geringere r.m.s.-Abweichungen der Rückgratschweratompositionen zur Struktur des HckSH3:PD1-Komplexes.

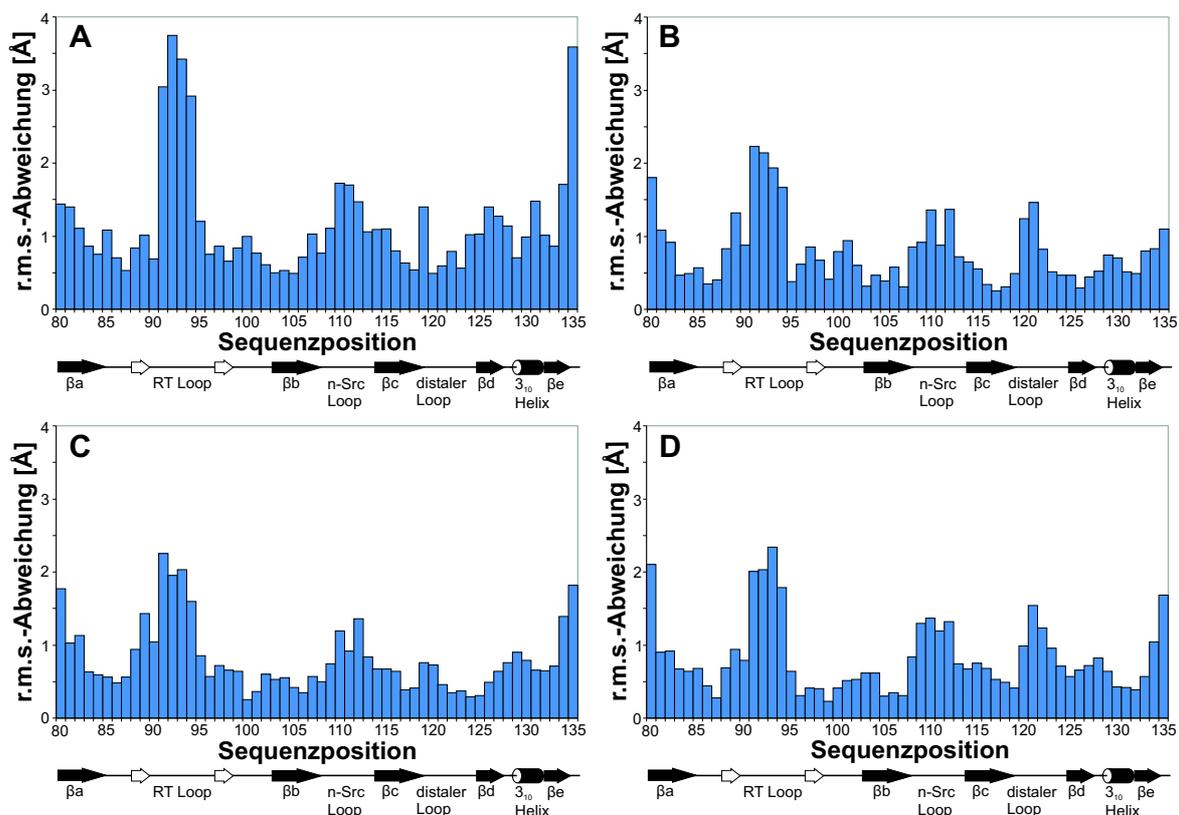


Abbildung 3.21: R.m.s.-Abweichungen der Proteinrückgratschweratompositionen zwischen der gemittelten Struktur des HckSH3:PD1-Komplexes und der gemittelten Lösungsstruktur von freier HckSH3 (4HCK; **A**), den Kristallstrukturen von intermolekular gebundener HckSH3 (1AD5; **B** und 1QCF; **C**) sowie der Kristallstruktur von freier HckSH3 (1BU1; **D**). Die Strukturen wurden durch Minimierung der r.m.s.d.-Werte der C^α -Atompositionen der Aminosäurereste in den β -Faltblattsträngen (Aminosäuren 80 bis 84, 103 bis 108, 114 bis 119, 125 bis 127 und 132 bis 134) übereinandergelegt. Die Sekundärstrukturelemente sind unten eingezeichnet.

Relativ zum HckSH3:PD1-Komplex zeigt sich in allen vier Vergleichsstrukturen eine Verschiebung der Aminosäurepositionen im mittleren Bereich des RT-Loops zur Ligandenbindungsstelle von HckSH3 hin, die Seitenkette von H92 klappt in die Kompartasche hinein und die Seitenkette von Y131 weist eine Drehung um im Mittel etwa

30° auf (Abbildung 3.22). Keine der Strukturen zeigt außerdem die hier vorhandenen β -Faltblattstrukturen im RT-Loop von HckSH3. Daher scheinen diese Unterschiede durch die Bindung des PD1-Peptids verursacht zu werden.

Im Vergleich mit der gemittelten Lösungsstruktur der freien Hck SH3-Domäne von Horita et al. (1998; 4HCK) zeigt sich eine Verschiebung des Proteinrückgrats der HckSH3-Komplexstruktur im β -Strang und der 3_{10} -Helix um bis zu 1,3 Å zum Kern der SH3-Domäne hin (Abbildung 3.22 A). Diese Abweichungen zwischen den beiden Strukturen kann nicht auf die Bindung des Peptids zurückgeführt werden, da sie in diesem Fall auch in der Kristallstruktur der freien Hck SH3-Domäne (1BU1) erkennbar sein müssten.

Die Unterschiede der einzelnen Kristallstrukturen von intramolekular gebundener (1AD5 und 1QCF) und freier HckSH3 (1BU1) zu der des HckSH3:PD1-Komplexes sind sehr ähnlich. Der n-Src-Loop ist in der Komplexstruktur um bis zu 2 Å, der distale Loop um bis zu 1,2 Å zum HckSH3-Kern verschoben. Letztere Verschiebung wurde von Horita et al. (1998) als Artefakt des Kristallisationsprozesses gedeutet. Desweiteren neigt sich die Seitenkette des W113 relativ zum HckSH3:PD1-Komplexes um etwa 16° von der 3_{10} -Helix weg (Abbildung 3.22 B). Damit besitzt die W113-Seitenkette in den Kristallstrukturen eine SH3-I-Konformation, während es in der Lösungsstruktur von freier HckSH3 wie auch im HckSH3:PD1-Komplex eine SH3-II-Konformation besitzt (siehe Kapitel 1.3.2 und 3.7).

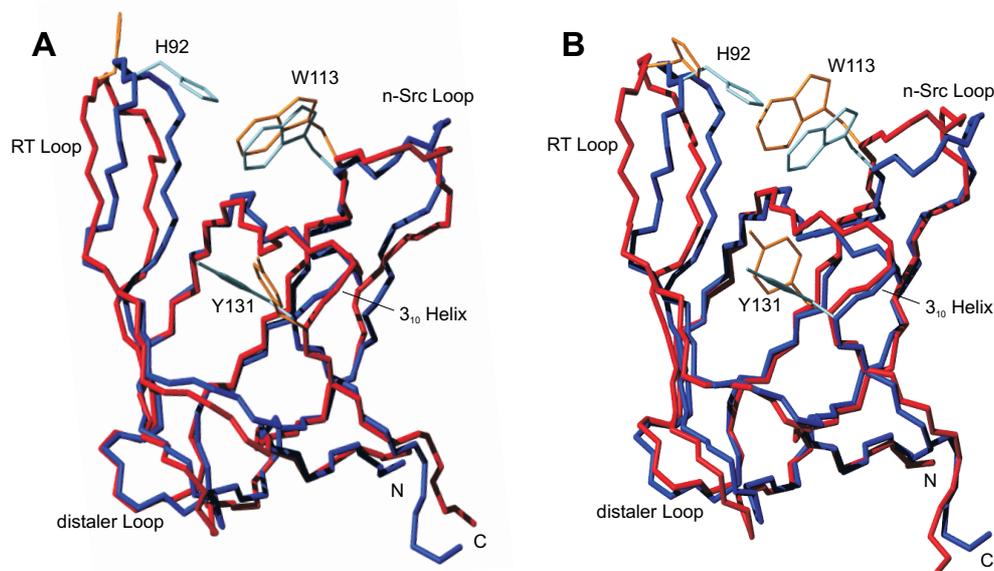


Abbildung 3.22: Überlagerungen der Proteinrückgrate der HckSH3-Vergleichsstrukturen 4HCK (**A**) und 1AD5 (**B**) mit der des HckSH3:PD1-Komplexes. Die Vergleichsstrukturen sind rot, die Hck SH3-Domäne des Komplexes blau dargestellt. Die Aminosäure-Seitenketten, die einen signifikanten Unterschied zu denen des HckSH3:PD1-Komplexes aufweisen sind ebenfalls angezeigt. Die Strukturen wurden durch Minimierung der r.m.s.d.-Werte der C^{α} -Atompositionen der Aminosäurereste in den β -Faltblattsträngen übereinandergelegt.

Kapitel 4

Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Raumstruktur der Hck SH3-Domäne im Komplex mit einem artifiziellen, hochaffinen Peptid-Liganden mittels mehrdimensionaler, heteronuklearer NMR-spektroskopischer Methoden in Lösung bestimmt. Die struktureinschränkende Parameter wurden NOE-basiert ermittelt und die Bindungseigenschaften des Komplexes aus der mittels Torsionswinkeldynamik-Simulation berechneten Struktur sowie aus dem Vergleich mit bereits vorhandenen HckSH3-Strukturen analysiert.

4.1 Standardverfahren für Proteinreinigungen lieferte ausreichende Mengen an rekombinantem HckSH3

Zur Herstellung einer NMR-Probe wurde [U - ^{13}C , U - ^{15}N]-HckSH3 als rekombinantes GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Das Protein wurde löslich exprimiert, was eine native Reinigung mittels Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose ermöglichte.

Da die Abspaltung des GST-Affinitätstags vom HckSH3-Protein durch die PreScission-Protease auf der Säule eine sehr niedrige Effizienz aufwies, wurde das Fusionsprotein zunächst von der GSH-Sepharose-Säule eluiert und anschließend gespalten. Ursache für diese schlechte Effizienz könnte zum Einen eine schlechtere Zugänglichkeit der Proteaseschnittstelle auf der Säule, zum Anderen eine geringere Beweglichkeit der Protease sein, da die PreScission-Protease selbst mit GST fusioniert ist.

Nach der Abspaltung von GST vom HckSH3-Protein mittels PreScission-Protease konnten diese drei Komponenten durch eine Größenausschlußchromatographie voneinander getrennt werden.

Um eine ausreichende Spalteffizienz der Protease zu gewährleisten, dienten 17 aminoterminal Aminosäuren (P60 bis G76) als Linker zwischen GST und der SH3-Domäne. Diese Reste gehören strukturell zur Hck Unique-Domäne.

4.2 NMR-spektroskopische Experimente ermöglichen nahezu vollständige Resonanzzuordnung

Mittels mehrdimensionaler, heteronuklearer NMR-spektroskopischer Experimente konnte eine nahezu vollständige Zuordnung des HckSH3:PD1-Komplexes erreicht werden.

Im (^{15}N - ^1H)-HSQC-Spektrum von freier HckSH3 konnten 95% der (H^{N} - N)-Resonanzen zugeordnet werden. Nicht detektierbar waren Resonanzen in flexiblen Bereichen des Proteins (H65 und N66 im Aminoterminal des Proteins, E89, H92 und H93 im RT-Loop).

Im Fall des HckSH3:PD1-Komplexes wurden 99% der (H^{N} - N)-Resonanzen zugeordnet. Nicht detektiert wurde hier lediglich die (H^{N} - N)-Korrelation des H93-Restes von HckSH3. Die höhere Vollständigkeit lässt sich, zumindest für die Aminosäuren des RT-Loops, vermutlich auf die Bindung des PD1-Peptids zurückführen, die die Flexibilität des HckSH3-Proteinrückgrats senkt und die Lösungsmittel-Zugänglichkeit dieser Reste einschränkt. Dies wird auch durch die Analyse der $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Amidprotonenaustausch-Experimente gestützt (Kapitel 3.8).

Die Zuordnung der H^{α} - und C^{α} -Resonanzen war zu 100%, die der Proteinrückgrat-Carbonylkohlenstoffkernen zu 92% vollständig. Die Zuordnung der HckSH3-Seitenketten-Resonanzen wurde zu 94% für die Protonen und 93% für die Heterokerne (^{13}C und ^{15}N) vervollständigt.

Zum Vergleich erreichten Horita et al. (1998) für die Lösungsstruktur der freien Hck SH3-Domäne eine Vollständigkeit der Zuordnung von 92% für die (H^{N} - N)-Resonanzen, 87% für die Proteinrückgrat-Carbonylkohlenstoffkerne, 100% für die H^{α} - und C^{α} -Resonanzen sowie 94% für die Zuordnung der Protonen und der Heterokerne der HckSH3-Seitenketten-Resonanzen.

Die Protonenresonanzen des Peptids konnten ebenfalls nahezu vollständig zugeordnet werden (95%). Die Zuordnung mittels 2D NMR-Experimente war aufgrund des nur 12 Aminosäure langen PD1-Peptids ausreichend. Fehlend sind hier die $\text{H}^{\delta 1}$ - und $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Resonanzen der Aminosäure His1 sowie die der Seitenketten-Aminogruppen-Protonen des Lys3-Restes.

4.3 Lösungsstruktur des HckSH3:PD1-Komplexes

Die Lösungsstruktur des HckSH3:PD1-Komplexes zeigt eine globuläre Form von HckSH3 mit der SH3-typischen β -barrel-Struktur bestehend aus zwei β -Faltblättern mit je drei antiparallelen β -Strängen, die durch RT-, n-Src- und distalen Loop sowie eine kurze 3_{10} -Helix getrennt werden. Der Kern von HckSH3 setzt sich ausschließlich aus Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten zusammen, die hydrophobe Liganden-Bindungsfläche ist leicht abgeflacht (Abbildung 3.13).

Zusätzlich existiert ein kurzes antiparalleles β -Faltblatt im RT-Loop, welches in den bisherigen Strukturen der freien und intramolekular gebundenen Hck SH3-Domäne nicht erkennbar ist und daher durch die PD1-Bindung induziert werden muss. In anderen SH3-Domänen wurden solche β -Faltblattstrukturen im RT-Loop schon beobachtet (SrcSH3, PLC γ , PI3K, C-terminale Grb2SH3; Kohda et al., 1994).

Die β -Faltblatt-Struktur im RT Loop von HckSH3 wird durch die starke Verminderung der Amidprotonen-Austauschraten der an den Faltblatt-induzieren Wasserstoffbrückenbindungen beteiligten Aminosäuren (Y88 und F98) bestätigt.

Der Amino- und Carboxyterminus (Aminosäuren G55 bis D79 und S137 bis T140) sowie der zentrale Bereich des RT-Loops (Aminosäuren H92 bis E40), die Bereiche des n-Src- und des distalen Loops zeichnen sich durch eine geringe Anzahl von bestimmbareren Distanzeinschränkungen aus. Der n-Src-Loop Bereich sowie Amino- und Carboxyterminus weisen zudem keine Distanzeinschränkungen mit hoher sequenzieller Reichweite auf ($|i - j| > 5$; Abbildung 3.9 C).

Analog dazu zeigen die Aminosäuren dieser Bereiche, insbesondere des Aminoterminus von HckSH3, eine deutlich verminderte Koordinatenpräzision der Schweratompositionen in der errechneten Strukturschar (Abbildung 3.11). Da die Resonanzzuordnung in den Bereichen erhöhter r.m.s.-Abweichung ebenfalls nahezu vollständig ist, lässt sich die geringe Zahl an Distanzeinschränkungen und die daraus resultierende verminderte Koordinatenpräzision durch das Fehlen von stabilisierender Sekundär- und Tertiärstruktur in diesen Regionen erklären. Dies wiederum weist auf eine erhöhte Flexibilität der entsprechenden Regionen hin. Für die aminoterminalen Reste P60 bis G76 war dies zu erwarten, da diese strukturell der flexiblen, unstrukturierten Hck Unique-Domäne angehören.

Die β -Faltblatt-Strukturbereiche zeigen hingegen eine besonders hohe Anzahl langreichweitiger Distanzeinschränkungen, wie auch einige Reste im amino- und carboxyterminalen Teil des RT-Loops. Die Atompositionen der Aminosäuren dieser Bereiche besitzen dementsprechend geringe r.m.s.-Abweichungen und sind in der Strukturschar sehr gut definiert.

4.3.1 Die Bindung von PD1 stabilisiert die HckSH3-Struktur

Die Analyse der H₂O/D₂O-Austauschraten der HckSH3-Amidprotonen zeigt verlängerte Lebenszeiten für die Amidprotonen, die an für antiparallele β -Faltblatt-Strukturen zu erwartende Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind. Neben diesen zeigen sich auch im amino- und carboxyterminalen Bereich des RT-Loops Amidresonanzen mit langen Lebensdauern, zu denen auch die Reste gehören, die für die Bildung des β -Faltblatts verantwortlich sind (Abbildung 3.20). Dies bestätigt die β -Faltblatt-Struktur im RT-Loop und deutet darauf hin, dass die PD1-Bindung die Flexibilität des RT-Loops herabsetzt.

Die Lebensdauer der an Wasserstoffbrückenbindungen beteiligten Amidprotonen-Resonanzen verlängern sich in gesamter HckSH3 sehr stark bei Bindung an PD1. Dieser Effekt wurde auch von Horita et al. (1998) und Engen et al. (1997) bei Bindung von HckSH3 an Liganden beschrieben. Dies deutet auf eine Verstärkung der internen Wasserstoffbrückenbindungen und damit eine Strukturstabilisierung der SH3-Domäne bei Bindung mit dem Liganden hin. Da auch Aminosäuren, die nicht direkt in die Bindung involviert sind, eine hohe Halbwertszeitverlängerung bei Bindung des Liganden an HckSH3 zeigen, scheint sich dieser stabilisierende Effekt durch das gesamte HckSH3-Protein fortzupflanzen, wie von Palencia et al. (2004) vermutet.

Im Gegensatz zu Horita et al. (1998), die HckSH3 im Komplex mit einem Peptid aus einem physiologischen Liganden (GTPase-aktivierenden-Proteins, GAP) untersucht haben, findet man hier eine deutlich stärker gesenkte Amidprotonen-Austauschrate bei HckSH3-Aminosäuren in den β -Faltblättern und im RT-Loop. Während die Amidprotonen-Lebenszeiten der HckSH3 bei Bindung an GAP im Mittel um einen Faktor sechs steigen, beträgt die mittlere Erhöhung bei PD1-Bindung einen Faktor 13. Grund hierfür könnte der 50- bis 250-fach höhere K_D -Wert des PD1-Peptids sein ($K_D(\text{GAP}) = 10 - 50\mu\text{M}$), der zu einer höheren Stabilisierung der SH3-Domänenstruktur und einem Verlust an Flexibilität im Bereich des RT-Loop führen könnte. Letzteres wiederum würde die Ausbildung des β -Faltblatts im RT-Loop erklären.

4.3.2 HckSH3:PD1-Komplexstruktur zeigt einige deutliche Abweichungen zu bekannten HckSH3-Strukturen

Der Vergleich der Struktur des HckSH3:PD1-Komplexes mit den HckSH3-Strukturen aus der PDB-Datenbank (4HCK, 1BU1, 1AD5 und 1QCF) zeigt eine hohe Homologie sowohl zu den Strukturen von freier wie auch zu denen von intramolekular gebundener HckSH3s, was darauf schließen lässt, dass keine signifikanten Konformationsänderungen in der Hck SH3-Domäne bei Bindung des PD1-Peptids stattfinden. Höhere r.m.s.-Abweichungen zwischen den Strukturen zeigen sich vor allem in den Rückgratschweratompositionen der Aminosäuren in den Bereichen der flexibleren Loop-Regionen (Abbildung 3.21).

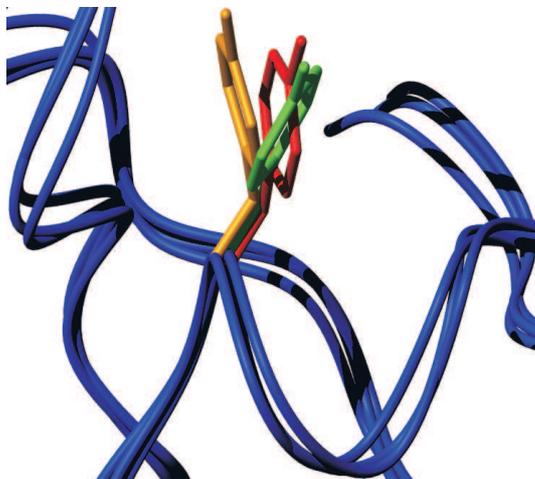


Abbildung 4.1: Überlagerung verschiedener Strukturen der c-Src SH3-Domäne. Zu erkennen sind die Seitenkettenkonformationen des Tyrosinrestes in der 3_{10} -Helix (Y138) im ungebundenen Zustand (rot; Xu et al., 1997; PDB-Eintrag 1FMK) sowie im Komplex mit den Peptidliganden PLR1 (grün; Feng et al., 1994; PDB-Eintrag 1PRM) und VSL12 (orange; Feng et al., 1995; PDB-Eintrag 1QWF).

Relativ zu allen Vergleichsstrukturen zeigt sich in der HckSH3:PD1-Komplexstruktur eine Verlagerung des Proteinrückgrats im mittleren RT-Loop-Bereich zum PD1-Peptid hin, die Seitenkette von H92 im RT-Loop klappt in die Kompassstasche hinein und interagiert mit der Seitenkette der PD1-Aminosäure Tyr4. Die Bindung des PD1-Peptids verursacht zudem eine Verstärkung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Amid- und Carbonylgruppen der Aminosäuren Y88 und F98 im RT-Loop, wodurch ein kurzes, antiparalleles β -Faltblatt entsteht, welches in den Vergleichsstrukturen nicht erkennbar ist. Die Rotation der Y131-Seitenkette im RT-Loop von HckSH3 bei Ligandenbindung ist auch in

Komplexstrukturen anderer SH3-Domänen erkennbar, unabhängig von der Bindungsorientierung des Liganden und hat vermutlich sterische Gründe (Abbildung 4.1).

4.3.3 Bindungsstellenkartierung bestätigt die Ergebnisse der Strukturanalysen

Die Kartierung der Bindungsstelle von PD1 zu HckSH3 mittels Analyse der Änderungen der chemischen Verschiebungen der HckSH3-Amidresonanzen bei Peptidbindung (Kapitel 3.6) zeigt eine hohe Übereinstimmung mit den übrigen Ergebnissen. Die Regionen der höchsten Änderungen befinden sich im RT- und im n-*Src*-Loop (Spezifitätstasche, inklusive des sauren Kompassrestes D95) sowie in der 3_{10} -Helix (xP-Dipeptid-Taschen). Dies steht im Einklang mit der Raumstruktur des HckSH3:PD1-Komplexes, in dem PD1 vor allem an diese Bereiche bindet (Kapitel 3.7). In den Vergleichen des HckSH3:PD1-Komplexes mit anderen HckSH3-Strukturen im freien Zustand zeigt das Proteinrückgrat in diesen drei Bereichen ebenfalls die höchsten r.m.s.-Abweichungen (Kapitel 3.9). Die in der Komplexstruktur entdeckten Wasserstoffbrückenbindungen der Seitenketten-Amidgruppe von N130 und den Iminogruppen von W113 sowie W114 zu Peptidresten konnten auch aufgrund der Änderungen ihrer chemischen Verschiebungen bei PD1-Titration zu HckSH3 beobachtet werden. Die Wasserstoffbrückenbindungen der beiden Tryptophan-Reste werden zudem von den H₂O/D₂O-Amidprotonenaustausch-Experimenten bestätigt (Kapitel 3.8).

Damit zeigt sich, dass insbesondere in Fällen in denen eine Raumstrukturanalyse nicht möglich ist, die Analyse von chemischen-Verschiebungsänderungen mittels NMR-Titrationsexperimenten ein großes Potential zur Kartierung und Charakterisierung von Bindungsepitopen in Protein-Ligand-Wechselwirkungen bietet, zumal sich dieses Verfahren auch auf andere Atome (C' , C^α/H^α , C^β/H^β) erweitern lässt.

4.3.4 PD1 ist ein Klasse-I'-Ligand von HckSH3

Das Peptid bildet im Bereich der Aminosäuren Leu6 bis Pro10 eine Poly-Prolin-Helix des Typs II aus, die aminoterminalen Reste bilden Kontakte zu HckSH3-Aminosäuren in der Kompassstasche zwischen RT- und n-*Src*-Loop.

Das Peptid zeigt nur sehr wenige intramolekulare Distanzeinschränkungen von mittlerer Reichweite und keine Langreichweiten-Einschränkungen auf, was für ein kurzes Peptid mit PPII-Helix-Konformation zu erwarten ist, da die Ganghöhe einer solchen Helix etwa 9 Å beträgt. Die Berechnung der dreidimensionalen Struktur des Peptids wird daher im Wesentlichen durch die intermolekularen Distanzeinschränkungen mit Aminosäuren von HckSH3 bestimmt.

Intermolekulare Distanzeinschränkungen zeigen sich bei einigen Aminosäureresten im RT-Loop, im n-*Src*-Loop und im Bereich der 3_{10} -Helix von HckSH3 vor allem zu den Peptidresten des xP-Dipeptid-Motivs (Leu6/Pro7 und Leu9/Pro10), aber auch zu den Ser2-, Tyr4- und die His1-Rückgratatomen im aminoterminalen Teil des Peptids.

Dementsprechend zeigen die Schweratompositionen der Aminosäuren im Bereich des Kernmotivs xPxxP (Tyr4 bis Pro10) nur geringe r.m.s.-Abweichungen, wie auch die Koordinaten der Schweratome des Aminosäurerückgrats der aminoterminalen Reste. Vor allem die carboxyterminalen Aminosäuren Ser11 und Leu12 sind aufgrund fehlender intermolekularer Distanzeinschränkungen nicht gut definiert und scheinen keinen Beitrag zur Bindungsaffinität zu leisten. Lediglich schwache intermolekulare NOE-Korrelationen zwischen Leu12 und der hydrophoben Seitenkette von Y86 könnte auf eine geringe hydrophobe Wechselwirkung der beiden Seitenketten hinweisen. Das Peptid nimmt eine Klasse-I-Bindungsorientierung ein, der Aminoterminus des Peptids bindet in die HckSH3-Kompasstasche, die Prolin-Reste der xP-Dipeptide Pro7 und Pro10 binden in die Positionen P₀ und P₃, die Aminosäurereste Leu6 und Leu9 in die Positionen P₋₂ und P₂ von HckSH3. Da sich die Seitenkette des konservierten Tryptophanrestes W113 von HckSH3 in SH3-II-Orientierung befindet, kann das PD1-Peptid der Klasse I' zugeordnet werden. Das Peptidrückgrat bildet dabei zwischen den Aminosäuren Leu6 und Pro10 eine Poly-Prolin-Helix des Typs II aus. Aminoterminal von Leu6 beschreibt das Peptidrückgrat einen Knick von HckSH3-Oberfläche weg und lagert sich dann im Bereich der Kompasstasche von HckSH3 in einer "S"-förmigen Schleife wieder an deren Oberfläche zwischen RT- und n-Src-Loop an (Abbildungen 4.2 und 3.13).

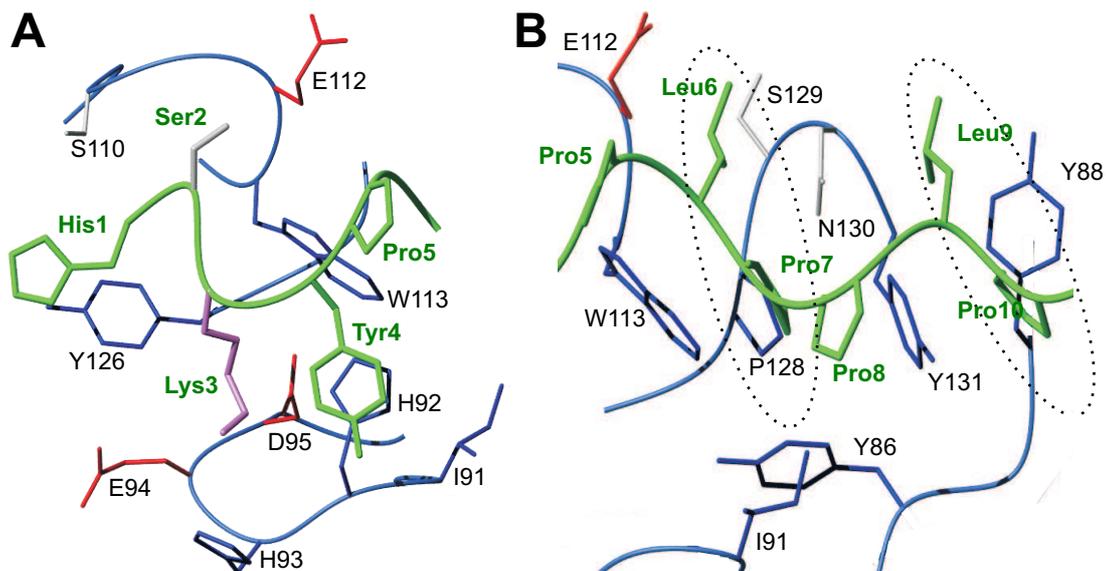


Abbildung 4.2: Darstellung der Bindungsregionen von HckSH3 im Komplex mit PD1. **A** Aminoterminalen PD1-Reste (His1 bis Tyr4) binden in die HckSH3-Kompasstasche. **B** PD1-Reste des xPxxP-Motivs binden in die hydrophoben HckSH3-xP-Dipeptid-Bindungstaschen. Die Reste der HckSH3 sind in blau, die des Peptids in grün dargestellt, saure Seitenketten sind rot bzw. violett, polare Seitenketten grau eingefärbt. Die beiden xP-Dipeptide (Leu6/Pro7 und Leu9/Pro10) von PD1 sind durch gestrichelte Linien umrahmt.

Die miteinander interagierenden Regionen von HckSH3 und PD1 besitzen überwiegend hydrophoben Charakter (Abbildung 3.16). Allerdings zeigten thermodynamische Analysen der Bindungsenergien eines AblSH3:Peptid-Komplexes mittels isothermaler Titrationska-

lorimetrie (ITC) einen stark exothermen Bindungscharakter, der inkonsistent mit den auch hier scheinbar überwiegenden hydrophoben Interaktionen ist (Palencia et al., 2004). Die Ursache dafür scheint die Bildung eines komplexen Wasserstoffbrückennetzwerks zwischen SH3-Domäne und Peptid zu sein, welches durch in die Bindungsoberfläche eingegrabene Wassermoleküle vermittelt wird. Ob dies bei Bildung des HckSH3:PD1-Komplexes ebenfalls der Fall ist, müsste mittels ITC-Experimenten und/oder NMR-spektroskopischer Methoden (Otting, 1997; Dalvit et al., 1999) untersucht werden.

4.3.5 Die aminoterminalen PD1-Aminosäurereste zeigen eine untypische Ligandensequenz mit neuen Bindungseigenschaften zu HckSH3

Der aminoternale Bereich des PD1-Peptids zeigt eine für Src-Typ SH3-Domänen unübliche Ligandensequenz, da der typische Ankerrest an Position P₋₃ durch einen hydrophoben Rest (Tyr4) ersetzt ist, während sich ein basischer Rest (Lys3) an Position P₋₄ befindet. Obwohl an untypischer Position, weist die Seitenkette des Lys3-Restes in die HckSH3-Kompassstasche hinein. Eine Salzbrücke mit den sauren Seitenketten von D95 und/oder E94 im RT-Loop von HckSH3 kann nicht nachgewiesen werden, Strukturrechnungen ergeben jedoch keinen sterischen Hinderungsgrund für die Ausbildung einer solchen Ionenwechselwirkung (Kapitel 3.7), die Änderung der chemischen Verschiebungen in den Amidresonanzen von E94 und D95 bei PD1-Titration zu HckSH3 weisen auf eine direkte oder indirekte Wechselwirkung dieser Reste mit dem Peptid hin (Abbildung 3.15).

Eine Überlagerung von anderen prolinreichen Liganden aus Komplexen mit der SH3-Domäne der Protein-Tyrosin-Kinase Src (VSL12, Feng et al., 1995; PDB-Eintrag 1QWF und RLP2, Feng et al., 1994; PDB-Eintrag 1RLP) mit PD1 zeigt zudem, dass sich der Lys3-Rest (P₋₄) von PD1 in ähnlicher Position befindet wie die Argininreste (P₋₃) der Vergleichsliganden (Abbildung 4.3). In den Src-Komplexstrukturen weisen diese Liganden eine Salzbrücke zwischen dem Argininrest der Peptide und des Asparaginsäurerestes der Src SH3-Domäne auf.

Grund für die Verschiebung des Lys3-Restes an Position P₋₃ zu den P₋₄-Positionen der Argininreste der Vergleichspeptide ist die Wölbung des PD1-Peptidrückgrats bei Aminosäurerest Pro5 und eine aminoterminal anschließende, ausgedehnte Schleife in Richtung des RT-Loops. Diese beiden Eigenheiten könnten damit sehr wichtig für die ideale Positionierung des Restes Lys3 zur HckSH3-Kompassstasche sein.

Der Abstand der C^α-Atompositionen der Argininreste bzw. des Lysinrestes der drei Liganden von der des D95 der HckSH3-Struktur beträgt für VSL12 10,3 Å, für RLP2 10,8 Å und für PD1 10,1 Å. Der Abstand der C^α-Atompositionen zwischen den Argininresten und des SrcSH3-Asparaginsäurerestes in den Komplexstrukturen der Liganden mit Src, in denen eine Salzbrücke zwischen den Seitenketten vorhanden ist, beträgt 10,8 Å für VSL12 und 12 Å für RLP2. Daher ist die Bildung einer Salzbrücke zwischen der Seitenketten-Aminogruppe der Aminosäure Lys3 des PD1-Peptids und der

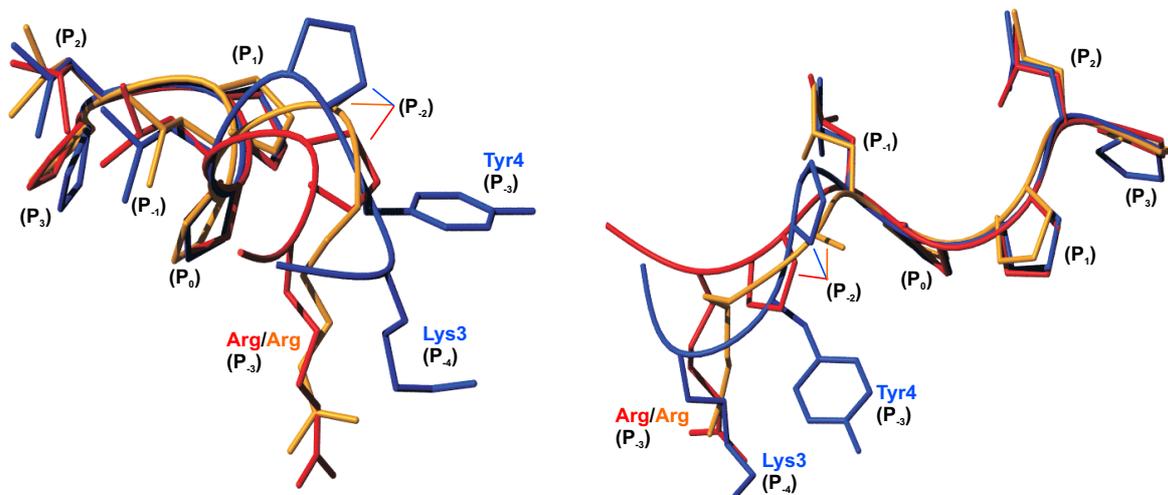


Abbildung 4.3: Überlagerung der SH3-Peptidliganden VSL12 (rot), RLP2 (orange) und PD1 (blau) durch Minimierung der C $^{\alpha}$ -Atompositionsdifferenzen der Aminosäurereste des xPxxP-Motivs.

D95-Seitenkettencarboxygruppe von HckSH3 wahrscheinlich, konnte jedoch hier nicht nachgewiesen werden.

Der fehlende Nachweis einer existierenden Salzbrücke ist nicht ungewöhnlich, in der Lösungsstruktur der Fyn SH3-Domäne mit einem Peptidliganden aus der p85-Untereinheit der Phosphoinositid 3-Kinase fanden Renzoni et al. (1996) ebenfalls keine Anzeichen einer Salzbrücke zwischen der Arginin-Ankerrest-Seitenkette des Peptids und des Asparaginsäurerestes in der SH3-Domäne, obwohl sich der Ankerrest hier an der typischen Position (P $_{-3}$) befindet und die Strukturrechnung ebenfalls keinen Hinweis auf eine sterische Behinderung der Ionenbindung lieferte.

Eine Lysin- statt Arginin-Aminosäure als Ankerrest ist nicht ungewöhnlich für SH3-bindende Proteine. Einige natürliche Liganden der Hck SH3-Domäne weisen einen solchen Lysin-Ankerrest auf (Vif, KKIKPPLP; Hassaine et al., 2001 und Btk, KKPLPPLP; Cheng et al., 1994). Allerdings zeigen die SH3-Interaktionen zu diesen Liganden meist schlechtere K_D -Werte (Alexandropoulos et al., 1995).

Arold et al. (1998) wiesen durch isothermale Titrationskalorimetrie nach, dass die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen Peptid und SH3-Domäne keinen wesentlichen Beitrag zur Bindungsenergie liefert und vermuten daher, dass die Präferenz der Src-Typ SH3-Domänen zu Peptiden mit basischem Rest an Position P $_{-3}$ in Phage Display Selektionen dadurch zustande kommt, dass sich SH3-Domäne und Ligand vor der Bindung durch die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Ankerrest und Komparttasche in optimale Position zueinander orientieren können (Erhöhung der Assoziationsrate (k_{on})). Demnach wäre die Ausbildung einer Salzbrücke nicht so relevant wie eine Positionierung des basischen Restes zur Komparttasche hin, die in der Struktur des HckSH3:PD1-Komplexes gegeben ist. Die Aminosäure Lys3 an Position P $_{-4}$ scheint demnach die "Aufgabe" des basischen Ankerrests in Src-Typ SH3-Liganden zu übernehmen.

In Fluoreszenz-Titrationsexperimenten konnte eine Bindung von PD1 an die AblSH3-Domäne nicht nachgewiesen werden (Tran, 2005), obwohl eine hydrophobe Aminosäure an Position P_{-3} der Konsensussequenz von AblSH3 genügt (PPxhxPPaP, h: hydrophober, a: aliphatischer Rest; Sparks et al., 1996). Dies könnte nun durch die Positionsverschiebung der aminoterminalen PD1-Peptidreste erklärt werden. Tatsächlich zeigt eine Überlagerung des PD1-Peptids mit AblSH3-Liganden (3BP-1 und 3BP-2, Musacchio et al., 1994, PDB-Einträge 1ABO und 1FYN; p41, Pisabarro et al., 1998, PDB-Eintrag 1BBZ), dass sich die Position der hydrophoben Aminosäuren der Vergleichsliganden (P_{-3}) mit der des PD1-Restes Lys3 (P_{-4}) deckt (Abbildung 4.4). Daher befindet sich die Aminosäure Tyr4 des PD1-Peptids nicht in der richtigen Position, um mit dem hydrophoben Threoninrest im RT-Loop der AblSH3 zu interagieren. Da sich im Aminoterminus von PD1 keine weiteren, für AblSH3-Ligandenbindungen essentiellen, hydrophobe Reste befinden, erklärt sich so die geringe Affinität des PD1-Peptids zur AblSH3.

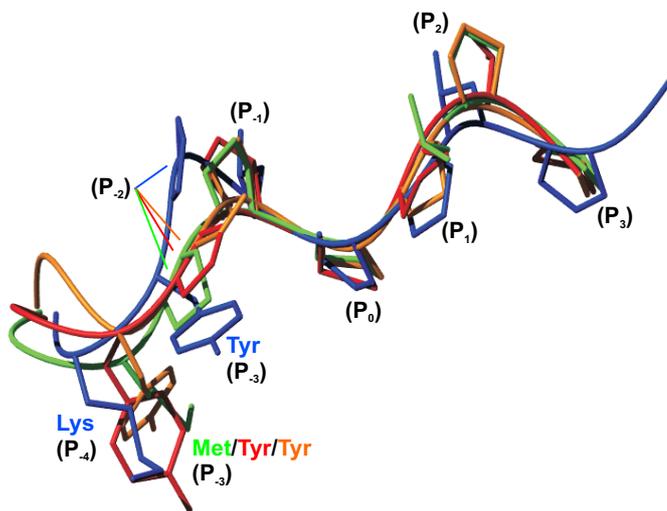


Abbildung 4.4: Überlagerung der AblSH3-Peptidliganden 3BP-1 (grün), 3BP-2 (rot, aus einem Komplex mit FynSH3), p41 (orange) und PD1 (blau) durch Minimierung der C^α -Atompositionsdifferenzen der Aminosäuren des xPxxP-Motivs.

Die Seitenkette von His1 liegt auf einer hydrophoben Oberfläche zwischen RT- und n-Src-Loop, zeigt jedoch keine feste Position in der berechneten Strukturschar. Trotzdem könnte sie durch van-der-Waals-Wechselwirkung mit der Seitenkette von Y126 zur Bindungsaffinität beitragen, zumal sich das Peptidrückgrat in diesem Bereich nicht von der SH3-Oberfläche löst und NOE-Korrelationen zwischen His1-Iminogruppe und Y126-Seitenkette darauf hinweisen. NOE-Korrelationen existieren auch zwischen der His1-Iminogruppe und des W113-Restes, eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Iminogruppe des His1-Restes und der Carbonylgruppe des W113-Restes ist in einigen Strukturen definiert. Phage-Display Screening-Experimente mit HckSH3 lieferten zudem in mehr als 60 % der nach der Selektion charakterisierten Peptide mindestens einen Histidin-Rest an den Positionen P_{-7} , P_{-6} oder P_{-5} (J. Glück, noch nicht veröffentlicht), was eine Präferenz von HckSH3 für Histidin-Reste in diesem aminoterminalen Bereich der Liganden zeigt.

Fluoreszenz-Titrationsexperimente mit der PD1-Mutante PD1-Y(-3)R, bei der die Aminosäure Tyr4 durch einen für Src-Typ SH3-Liganden typischen Argininrest substituiert wurde, ergeben einen K_D -Wert von etwa $0,7 \mu\text{M}$ (Tabelle 3.1), also eine um den Faktor zwei höhere Dissoziationskonstante als für PD1 (Kapitel 3.2). Dies zeigt, dass das ein Tyrosinrest anstelle eines Argininrestes an Position P_{-3} für die Bindung an HckSH3 gleichwertig ist oder sogar bevorzugt wird. Der Grund für eine affinere HckSH3-Interaktion von PD1 gegenüber dem PD1-Y(-3)R-Peptid könnte die zusätzlich entstehende Wechselwirkung zwischen den Resten Tyr4 und H92 sein. Möglich ist auch eine ungünstigere Positionierung der aminoterminalen Reste Ser2 und His1 zur HckSH3-Bindungsfläche durch die Y(-3)R-Substitution. Durch den fehlenden Tyrosinrest könnte der Standard-Konsensus für Src-Typ SH3-Liganden wiederhergestellt werden und der Argininrest die Ankerrestposition übernehmen. Dies müsste jedoch durch eine Strukturaufklärung des HckSH3:PD1-K(-4)A-Komplexes verifiziert werden.

Die Affinität des PD1-K(-4)A-Peptids, die deutlich unter der des PD1- und des PD1-Y(-3)R-Peptids liegt (Tabelle 3.1), zeigt, dass der Lysinrest tatsächlich eine wichtige Rolle in der HckSH3-Bindung spielt. Grund für den 9fach höheren K_D -Wert des PD1-K(-4)A-Peptids (relativ zu PD1) wird der für Src-Typ SH3-Liganden wichtige basische Ankerrest sein, der bei dieser Mutante fehlt. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass der Lys3-Rest im PD1-Peptid die Rolle des Ankerrestes bei der HckSH3-Bindung übernimmt. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass der höhere K_D -Wert auf eine ungünstigere Positionierung der aminoterminalen Reste (Ser2 und His1) zu HckSH3 durch die K(-4)A-Substitution zustande kommt.

Das PD1-Y(-3)A-Peptid zeigt mit einem 48fach höheren K_D -Wert als PD1 die geringste Affinität von den vier Peptiden zu HckSH3 (Tabelle 3.1). Grund hierfür könnte die fehlende Interaktion des Tyr4-Restes zu HckSH3 sein. Da im Fall des PD1-Y(-3)R-Peptids die Substitution dieses Tyrosinrestes aber nur kleinere Auswirkungen auf die Affinität zu HckSH3 zeigt, scheint der Argininrest den Beitrag von Tyr4 zur Bindungsaffinität zum Teil ausgleichen zu können. Es lässt sich vermuten, dass eine weitere wichtige Ursache für den hohen K_D -Wert des PD1-Y(-3)A-Peptids zu HckSH3 eine ungünstigere Positionierung der dem Tyrosinrest aminoterminal folgenden Aminosäuren des Peptids zur HckSH3-Bindungsfläche durch die Y(-3)A-Substitution ist. Möglicherweise ist der Lys3-Rest dieses Peptids nicht mehr in der Lage, in die HckSH3-Kompasstasche zu binden, so dass auch im HckSH3:PD1-Y(-3)A-Komplex kein Ankerrest vorhanden ist. Diese Vermutung muss aber durch eine Strukturaufklärung verifiziert werden.

Die Lösungsstruktur des HckSH3:PD1-Komplexes zeigt einen anderen Bindungsmodus der aminoterminalen Peptidreste zu HckSH3 als bisherige Src-Typ SH3:Ligandenkomplexe. Durch die strukturelle Konformation des Peptidrückgrats, die möglicherweise durch den Tyr4-Rest verursacht wird, nimmt die Aminosäure Lys3 an Position P_{-4} die Aufgabe des basischen Ankerrests ein, der sich nach der Konsensus-Sequenz für Src-Typ SH3-Domänen an Position P_{-3} befindet. An Position P_{-3} bildet die Seitenkette des PD1-Restes Tyr4 zusätzliche Kontakte zum Imidazolring von H92 in HckSH3, welcher dazu in die Kompassstasche hineinklappt.

Die Seitenketten der Aminosäuren His1 und Lys3 sind kaum definiert. Die His1-Seitenkette könnte tatsächlich flexibel sein, während für die Lys3-Seitenkette eine Salzbrückenbildung mit den sauren Resten im RT-Loop zu erwarten ist, jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte.

Eine Isotopenmarkierung des Peptids könnte weitere strukturelle Einschränkungen liefern, die vor allem den Einfluss dieser beiden Peptidreste auf die Bindungsaffinität klären könnte (z.B. durch NMR-Spinrelaxationsexperimente, Kay, 1998) sowie den Einfluss von Wassermolekülen auf die Bindung (Kapitel 4.3.4).

4.4 PD1 ist der erste hochaffine Nicht-Standard-Ligand für Src-Typ SH3-Domänen

In der Literatur existieren bereits einige Berichte über SH3-Liganden, deren Aminosäuresequenzen nicht dem xPxxP-Motiv genügen (Tabelle 4.1). Die SH3-Domänen, welche diese Liganden binden, sind Bestandteil von Proteinen, die nicht zur Familie der Src-Typ Protein-Tyrosin-Kinasen gehören.

Protein	SH3-Domäne	Konsensussequenz	Referenz
FYN T-bindendes Protein	FYB-SH3	RKxxYxxY	Kang et al., 2000
Aktin-bindendes Protein	Abp1-SH3	+xxxPxxPx+PxxL	Fazi et al., 2002
p53-bindendes Protein 2	p53BP2-SH3	VPMRLR*	Espanel & Sudol, 2001
Epidermaler-Wachstumsfaktor-Rezeptor-Kinase Substrat 8	Eps8-SH3	PxxDY	Mongioli et al., 1999
SH3-Domänen-Kinase-bindendes Protein 1	CIN85-SH3s	PxxxPR	Kowanetz et al., 2003
Wachstumsfaktor-Rezeptor-gebundenes Protein 2	Grb2-C-SH3	PxxxRxxKP	Lewitzky et al., 2001
Endophilin	Endo-SH3s	xP(+/x)RPPxp(r)	Cestra et al., 1999
Amphiphysin 1	Amph1-SH3	#xRPxR	Cestra et al., 1999
p53-bindendes Protein 2	p53BP2-SH3	SCMGGMNR ⁺	Gorina & Pavletich, 1996

Tabelle 4.1: Auflistung von SH3-Domänen mit ungewöhnlichen Liganden-Konsensussequenzen. Die Konsensussequenzen wurden durch Phage-Display-Screenings und/oder Yeast-Two-Hybrid-Methoden ermittelt. " + " bezeichnen basische, " # " hydrophobe, kleine Buchstaben bevorzugte Aminosäurereste. *p53BP2-SH3-Bindungssequenz des Yes-assoziierten Proteins (YAP); ⁺p53BP2-SH3-Bindungssequenz des Tumor Suppressors p53, bindet durch zwei voneinander getrennte Bereiche (SCM und NR).

Die Ursache der ungewöhnlichen Konsensussequenzen für die Liganden dieser SH3-Domänen liegt meist in Unterschieden in der SH3-Aminosäuresequenz relativ zu den SH3-Domänen, die das typische xPxxP-Motiv erkennen. Im Fall der Wildtyp-Abp1 SH3-Domäne führt eine E6L-Substitution (typischerweise hydrophober Rest, L85 in HckSH3), für die Wildtyp-FYB SH3-Domäne eine W976R-Substitution (K115 in HckSH3) zu einer Änderung der Erkennungssequenz. Durch die Substitutionen binden diese modifizierten SH3-Domänen Liganden mit typischem xPxxP-Motiv.

Die SH3-Domänen von Eps8 und CIN85 binden keine Liganden mit xPxxP-Motiv,

was ebenfalls darauf schliessen lässt, das die Ursache in der SH3-Sequenz oder in konformellen Eigenheiten zu suchen ist. Für die SH3-Domäne von Eps8 kommen dafür einige Aminosäurereste im RT-Loop in Frage (Mongiovi et al., 1999), die ungewöhnliche Erkennungssequenz der FYB SH3-Domäne könnte neben zusätzlichen Aminosäuren im RT-Loop durch einen fehlenden Tryptophanrest (W114 in HckSH3) zustande kommen. Kang et al. (2000) fanden mittels NMR-Titrationsexperimenten einen FYB SH3-Liganden mit YxxY-Motiv, der mit schwacher Affinität auch an die SH3-Domänen der Src-Kinasen Lck und Fyn bindet. Mit geringer Affinität interagieren die SH3-Domänen der Src-Kinasen zudem intramolekular mit dem SH2-Kinase-Linker, welcher bei einigen Kinasen nur ein Prolinrest aufweist.

Im Gegensatz dazu zeigt PD1 trotz seiner ungewöhnlichen Konsensussequenz eine hochaffine Wechselwirkung mit der SH3-Domäne von Hck. Die Ergebnisse aus den Fluoreszenztitrationsexperimenten zeigen einen ähnlichen oder sogar niedrigeren K_D -Wert für die Wechselwirkung von HckSH3 mit PD1 als mit PD1-Y(-3)R, welches der Standard-Konsensussequenz genügt.

4.5 Vorhersage-Algorithmen für SH3-Bindungspartner erkennen PD1 nicht als hochaffinen HckSH3-Liganden

Trotz der immer noch nicht detailliert verstandenen Bindungseigenschaften von SH3-Domänen wird versucht, durch Algorithmen, die auf bereits existierende strukturelle Komplex- und Bindungsdaten basieren, die sequentielle Bindungspräferenz von Liganden an verschiedene SH3-Domänen vorherzusagen. Einer dieser Algorithmen ist "SH3-SPOT" (Brannetti et al., 2000).

Aus bestehenden Komplexstrukturdaten wurden zunächst alle möglichen positionsspezifischen Kontakte zwischen SH3- und Liganden-Aminosäureresten ermittelt. SH3-Liganden aus Phage-Display-Experimenten wurden dann dazu verwendet, eine SH3-spezifische Interaktionsdatenbank zu erzeugen. Diese besteht aus einem multidimensionalen Gitter, welches die Häufigkeiten von Kontakten bestimmter Liganden-Aminosäurereste an bestimmten Positionen enthält (SH3-spezifische Matrix).

Durch Auswahl der SH3-Domäne (der SH3-spezifischen Matrix) und Eingabe eines zu untersuchenden potentiellen Liganden berechnet der Algorithmus die Wahrscheinlichkeit, mit der der Ligand an die ausgewählte SH3-Domäne bindet (iSPOT-Score).

Zum Test dieses Algorithmus (<http://cbm.bio.uniroma2.it/ispot/>; Brannetti & Citterich, 2003) wurden die HckSH3-Bindungswahrscheinlichkeiten von Peptidsequenzen aus physiologischen SH3-Liganden sowie des PD1-Peptids und der PD1-Mutanten berechnet und mit den in dieser Arbeit bestimmten bzw. bereits bekannten K_D -Werten verglichen (Tabelle 4.2).

Die Peptide aus physiologischen SH3-Liganden (Sos_{1147–1161} und Sam68_{34–48}) wurden von Tran et al. (2006) auf Interaktion mit der Lck SH3-Domäne untersucht und stammen aus einer systematischen Suche nach PxxP-Motiven in den Aminosäuresequenzen von bekannten Interaktionspartnern der Lck SH3-Domäne. Die zugehörigen K_D -Werte der Peptide zur Wechselwirkung mit HckSH3 wurden von mittels Fluoreszenztitrationsexperimenten bestimmt (A. Aladag, noch nicht veröffentlicht).

Name	Sequenz	iSPOT-Sequenz	K_D -Wert [μM]	iSPOT-Score
PD1	HSKYPLPPLPSL	HSKYPLPPLP	$0,33 \pm 0,02$	0,7119
PD1-Y(-3)R	HSKRPLPPLPSL	HSKRPLPPLP	$0,66 \pm 0,02$	0,9110
PD1-Y(-3)A	HSKAPLPPLPSL	HSKAPLPPLP	$15,89 \pm 0,27$	0,7084
PD1-K(-4)A	HSAYPLPPLPSL	HSAYPLPPLP	$3,11 \pm 0,18$	0,7182
Sos _{1147–1161}	VPVPPPVPVRRRES	PPPVPVRRRE	$5,55 \pm 0,30$	0,8926
Sam68 _{34–48}	PSRQPPLPHRSRGG	QPPLPHRSRG	$21,72 \pm 0,89$	0,8378

Tabelle 4.2: Vergleich der mittels Fluoreszenz-Titration bestimmten K_D -Werte von HckSH3-bindenden Peptiden mit den vom SH3-SPOT-Algorithmus vorhergesagten Bindungswahrscheinlichkeiten. Die iSPOT-Sequenz ist dabei der vom Algorithmus verwendete Sequenzbereich, der den besten Score ergibt.

Der Vergleich zeigt, dass das relative Verhältnis des iSPOT-Scores der Peptide aus physiologischen SH3-Liganden (Sos_{1147–1161} und Sam68_{34–48}) die gemessenen K_D -Werte widerspiegelt.

Sehr deutlich zeigt sich dagegen, dass der Algorithmus nicht in der Lage ist, das PD1-Peptid als hochaffinen HckSH3-Liganden zu erkennen. Obwohl der K_D -Wert des PD1-Peptids um einen Faktor zwei über dem der PD1-Y(-3)R-Mutante liegt, berechnet der Algorithmus zweiteres Peptid als viel wahrscheinlicheren Bindungspartner und ordnet dem PD1-Peptid nur einen mässigen Score zu. Die verwendete SH3-spezifische Matrix ordnet also einem Peptid, welches ein Arginin-Rest an Position P_{-3} besitzt (entsprechend der Konsensus-Sequenz für Src-Typ SH3-Domänen), eine viel höhere Interaktionswahrscheinlichkeit mit der SH3-Domäne zu. Dies ist wiederum darauf zurück zu führen, dass die Matrix durch Komplexstrukturen erstellt wurde, in denen die Sequenzen der SH3-gebundenen Peptide alle der Konsensus-Sequenz für Src-Typ SH3-Liganden entsprechen. Daher entsteht ein systematischer Fehler in der Wahrscheinlichkeitsberechnung für Peptidliganden, der eine Bevorzugung für Liganden mit Konsensus-Sequenz bewirkt. Da auch andere Methodiken zur Vorhersage von SH3-Liganden (z.B. Scansite; Obenauer et al., 2003 oder SPMFEP; Hou et al., 2006) auf diesen Komplexstrukturen beruhen, werden auch diese bei der Vorhersage der HckSH3:PD1-Bindung fehlschlagen.

Dies zeigt die Wichtigkeit der Untersuchung dieser Komplexstruktur zum Verständnis der molekularen Grundlage von SH3-Liganden-Interaktion und für die Entwicklung von verlässlicheren Algorithmen zur Erkennung von potentiellen SH3-Liganden.

4.6 Es existieren PD1-ähnliche Sequenzen im humanen Proteom

Um die physiologische Relevanz der Bindung von HckSH3-Liganden mit PD1-ähnlichen Bindungsmotiven zu untersuchen, wurde eine BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)-Suche (Altschul et al., 1997) mit der PD1-Sequenz (HSKYPLPPLP) in der SWISS-PROT-Datenbank durchgeführt. Verwendet wurde das Tool zur Suche nach kurzen, nahezu exakten Sequenzübereinstimmungen des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI; <http://www.ncbi.nih.gov/>). Die Suche wurde, eingeschränkt auf das humane Proteom, mittels der PAM-30-Matrix durchgeführt, die vor allem für kurze Sequenzalignments geeignet ist (Altschul, 1991). Weitere BLAST-Parameter waren der "Expect value" (Stringenz der Suche; 20000), die "Word size" (Mindestlänge von Übereinstimmungen; 2) sowie die "Gap costs" ("Strafen" für die Erzeugung einer Lücke (open; 9) bzw. Verlängerung einer existierenden Lücke (extension; 1) beim Alignment).

Ein vielversprechender Treffer war ADAM-22 (Swiss-Prot-Eintrag Q9P0K1), ein Protein aus der ADAM (a disintegrin and metalloprotease)-Familie sowie zwei Isoformen des Proteins (Swiss-Prot-Eintrag Q9P0K1-2 und Q9P0K1-5). Die PD1-ähnliche Region befindet sich im cytoplasmatischen Teil des Proteins (Aminosäurepositionen 877 bis 890, Tabelle 4.3).

PD1		H	S	K	Y	P	L	P	P	L	P	(SL)
ADAM-22_1	(SR)	K	Y	P	Y	P	M	P	P	L	P	(DE)
ADAM-22_2		S	R	K	Y	P	Y	P	M	P	P	(LPDE)

Tabelle 4.3: Vergleich der Aminosäuresequenz des PD1-Peptids mit der Poly-Prolin-reichen Sequenz der zytoplasmatischen Domäne von ADAM-22. Die Sequenz ADAM-22_1 wurde durch eine BLAST-Suche des humanen Genoms entdeckt, die Sequenz ADAM-22_2 ist um zwei Aminosäuren relativ zu ADAM-22_1 verschoben. Beide Sequenzen zeigen ein PxxP-Motiv und einen Tyrosinrest an Position P₋₃, die ADAM-22_2-Sequenz zusätzlich ein Lysinrest an Position P₋₄.

Die ADAM-22-Aminosäuresequenz beinhaltet zwei mögliche PxxP-Motive, die um zwei Aminosäuren gegeneinander verschoben sind. Das erste Motiv (ADAM-22_1, Reste 879-888) besitzt eine größere Ähnlichkeit mit der PD1-Sequenz (60% gleiche Aminosäuren, 70% gleiche Aminosäurearten für die PD1-Sequenz 1-10), beim zweiten Motiv (ADAM-22_2, Reste 877-886; 50% gleiche Aminosäuren, 80% gleiche Aminosäurearten) ist neben dem Tyrosinrest an Position P₋₃ (Tyr4 in PD1) auch der Lysinrest an Position P₋₄ (Lys3 in PD1) vorhanden.

Die ADAM-Proteine gehören zu der Superfamilie der Metalloproteasen. Sie bestehen aus einem extrazellulären Teil, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne. Der extrazelluläre Teil enthält eine EGF (epidermal growth factor)-ähnliche, cysteinreiche Domäne sowie eine für die ADAM-Familie typische Disintegrin- und Metalloproteinase-Domäne (Black & White, 1998).

Sie besitzen proteolytische Eigenschaften und sind in Zelladhäsion, Membranfusion und intrazelluläre Signaltransduktion involviert (Schlöndorff & Blobel, 1999).

Poghosyan et al. (2002) konnten eine Interaktion zwischen dem Protein ADAM-15 und den SH3-Domänen der Kinasen Lck, Fyn, Abl, Src und Hck *in vitro* nachweisen. Die Kinasen Lck und Hck phosphorylieren ADAM-15 *in vivo*.

ADAM-22 wird allerdings, entgegen ADAM-15, nicht in allen Zelltypen exprimiert, sondern kommt überwiegend in Zellen des Gehirngewebes vor (Sagane et al., 1998). Zwar wird auch Hck in Mikroglia-Zellen (Immunzellen des zentralen Nervensystems mit phagozytischen Eigenschaften) des Gehirns exprimiert (Kradny et al., 2002), ob jedoch auch ADAM-22 in diesen Zellen vorkommt, sodass eine physiologische Interaktion der beiden Proteine möglich ist, bleibt zu untersuchen.

Jedoch ist eine Interaktion der zytoplasmatischen Domäne von ADAM-22 mit den Src-Kinasen Src, Fyn, Yes und/oder Lyn möglich, da diese auch in Zellen des Gehirngewebes exprimiert werden. Vor allem interessant ist dabei die Untersuchung der Wechselwirkung von ADAM-22 mit Lyn, da diese Kinase einen Histidinrest an der selben Position im RT-Loop wie bei Hck besitzt (H92 in HckSH3) und dieser Histidinrest durch die Interaktion mit Tyr4 in PD1 eine wichtige Rolle für den PD1-Bindungsmodus zu besitzen scheint. Ob die Poly-Prolin-reiche Sequenz in der zytoplasmatischen Domäne von ADAM-22 tatsächlich an die SH3-Domänen dieser Kinasen bindet, müsste z.B. durch Ko-Immunopräzipitation und Interaktionsversuche (wie Oberflächenplasmonenresonanz oder Fluoreszenztitration) untersucht werden. Ob diese potentielle Interaktion einen PD1-ähnlichen Charakter besitzt, müsste schließlich durch eine Strukturaufklärung der zytoplasmatischen Domäne von ADAM-22 im Komplex mit diesen SH3-Domänen bestimmt werden.

4.7 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Bindungseigenschaften der SH3-Domänen deutlich komplexer sind als angenommen. Die Konsensussequenz für SH3-Domänen des Src-Typs kann nicht uneingeschränkt für die Suche nach SH3-bindenden Proteinen angewendet werden, da die PD1-Aminosäuresequenz von ihr abweicht und zudem eine scheinbar höhere Affinität an HckSH3 aufweist als z.B. das PD1-Y(-3)R-Peptid, das der Konsensussequenz genügt.

Weitere Analysen sind notwendig, um die Ursachen der hohen Affinität des PD1-Peptids zu HckSH3 zu klären. Isothermale titrationskalorimetrische Experimente mit dem PD1-Peptid und HckSH3 sowie Aminosäuresubstitutionen in beiden Proteinen sowie deren Strukturaufklärungen könnten Aufschluss über den Einfluss der einzelnen Reste auf die Bindungsaffinität und die Art deren Wechselwirkung (hydrophob, elektrostatisch oder polar) liefern. NMR-Experimente zur Untersuchung der Interaktionsdynamiken (Kay, 1998; Mittag et al., 2003) und Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationsraten mittels Fluoreszenzspektroskopie oder Oberflächenplasmonenresonanz könnten weitere Aufschlüsse über das SH3-Bindungsverhalten geben.

Eine wichtige Frage, die sich stellt, ist, warum Src-Typ SH3-bindende Peptide mit ungewöhnlichen Aminosäuresequenzen wie das PD1 bisher nicht durch Phage-Display-Screenings entdeckt wurden, obwohl sie zumindest im Fall der HckSH3-PD1-Interaktion eine hohe Affinität zu SH3-Domänen aufweisen.

Eine mögliche Erklärung könnte der von Arold et al. (1998) vorgeschlagene Einfluss des Peptid-Ankerrests vor der Komplexbildung auf die Assoziationsrate sein (Kapitel 4.3.5). Der höhere k_{on} -Wert von Peptidliganden mit Ankerrest an Position P₋₃ könnte verhindern, dass Peptide ohne diesen Ankerrest oder mit Ankerrest an anderer Position beim Phage-Display-Screening selektiert werden und wodurch ein systematischer Fehler entsteht. Dies könnte durch Bestimmung von Assoziations- und Dissoziationsraten der Peptide verifiziert werden. Sollte dies der Fall sein, könnte man z.B. Phage-Display- oder NMR-basierte Screeningmethoden (Wang et al., 2004), in denen man andere SH3-Domänen als Kompetitoren einsetzt, zur Suche nach weiteren Peptiden mit ungewöhnlichen Peptidsequenzen verwenden. Solche Liganden könnten das Verständnis der komplexen SH3-Bindungseigenschaften erhöhen und dabei helfen, die Parameter zu finden, welche die Bindungsspezifitäten der SH3-Domänen ausmachen.

Eine Untersuchung der Interaktion der zytoplasmatischen Domäne von ADAM-22, welche eine PD1-ähnliche Aminosäuresequenz enthält, mit SH3-Domänen von Src-Kinasen, die (wie ADAM-22) auch in Zellen des Gehirngewebes exprimiert werden, könnte klären, inwiefern der für den HckSH3:PD1-Komplex entdeckten Bindungsmodus auch eine physiologische Relevanz besitzt.

Das PD1-Peptid ist in der Lage, die Bindung des HIV-1 Nef-Proteins an HckSH3 zu inhibieren (Tran, 2005). Daher ist die Untersuchung der Kinaseaktivitätsmodulation von Hck in Anwesenheit von HIV-1 Nef und/oder PD1 *in vitro* und *in vivo* sehr interessant. Zwar eignen sich Peptide aufgrund ihrer möglichen Proteolyseempfindlichkeit und immunogenen

Eigenschaften nicht zu therapeutischen Zwecken, jedoch könnte das PD1-Peptid als Kompetitor in Screenings von chemischen Bibliotheken mit HckSH3 verwendet werden, um möglicherweise niedermolekulare, spezifische und affine HckSH3-Liganden zu finden. Ein solches Verfahren wurde beispielsweise von Björklund et al. (2006) auf leukozytenspezifische Integrinrezeptoren angewandt. Auf lange Sicht wären solche niedermolekularen Wirkstoffe als Medikament gegen die Folgen der HIV-Infektion oder für eine gezielte immunsupprimierende Wirkung denkbar.

Da die Kinaseaktivität von Protein-Tyrosin-Kinasen durch ihre komplexen intramolekularen Mechanismen scheinbar nicht ein- und ausgeschaltet werden kann, sondern dynamisch reguliert zu werden scheint (Lowell, 2004), eignen sich diese Proteine als Ziele für therapeutische Zwecke, da keine "knock-out"-Effekte eintreten können.

Problematisch ist jedoch, dass Protein-Tyrosin-Kinasen des gleichen Typs in verschiedensten Signaltransduktionswegen gleichzeitig involviert sind und eine hohe gegenseitige Redundanz aufweisen. Auch scheinen die Funktionen einer Kinase zudem noch von deren Lokalisation in der Zelle abzuhängen (Modafferi & Black, 1999; Robbins et al., 1995).

Die hohe Sequenzhomologie der Src-Typ SH3-Domänen hat zudem zur Folge, dass sich die Identifizierung von spezifischen Liganden, welche selektiv für eine bestimmte Src-Typ Kinase sind, als problematisch erweist. Erste Erfolge konnten z.B. durch eine kombinatorische Peptidbibliothek (Peptid/Nicht-Peptid-Chimere) für die Fyn SH3-Domäne erzielt werden (Li & Lawrence, 2005).

Kapitel 5

Anhang

5.1 Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

1D, 2D, 3D	Ein-, Zwei-, Dreidimensional
Å	Angström (0,1 nm)
AIDS	aquired immunodeficiency syndrome (Erworbenes Immunschwäche-Syndrom)
ATNOS	automated NOESY peak picking (Programm zur automatischen Selektion von NOE-Resonanzen in NMR-Spektren)
BMRB	Biological Magnetic Resonance Bank
°C	Grad Celsius
CANDID	Combined automated NOE assignment and structure determination module (Programm zur automatischen Zuordnung von NOE-Resonanzen in NMR-Spektren)
CARA	Computer Aided Resonance Assignment (Programm zur Visualisierung und Auswertung von NMR-Spektren)
cm	Zentimeter
COSY	correlated spectroscopy (Korrelationsspektroskopie)
ct	constant time (konstante Zeit)
δ	chemische Verschiebung
D ₂ O	Deuteriumoxid (² D ₂ O)
Da	Dalton (Molekulargewichtsangabe für Biopolymere)
DIPSI-3	decoupling in the presence of scalar interactions (TOCSY-Mischsequenz)
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat
DYANA	dynamics algorithm for NMR applications (Programm zur Berechnung von Protein- und Nukleinsäurestrukturen aus NMR-Daten)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

et al.	et alis (und andere)
F1, F2, F3	Dimensionen von NMR-Spektren nach Fourier-Transformation
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (bei Zentrifugengeschwindigkeitsangaben)
GARP	globally optimized, alternating-phase rectangular pulses (Entkopplungsschema)
GSH-Sepharose	Glutathion Sepharose
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
Hck	hematopoietic cell kinase (Hämatopoetische Zell-Kinase)
HckSH3	Hck SH3-Domäne
HIV-1	human immunodeficiencyvirus type 1 (Humanes Immundefizienzvirus Typ 1)
HSQC	heteronuclear single quantum coherence (Heteronukleare Einquanten-Kohärenz)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
iSPOT	Internet-Werkzeug zur Bestimmung der Wechselwirkungs- spezifitäten von Proteinmodul-Familien
K_D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
k_{on}	Assoziationsrate
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
M	Molar (Mol/Liter)
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
μ m	Mikrometer
M9-Medium	künstliches Minimalmedium zur Isotopenmarkierung
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MHC-I	major histocompatibility complex class I (Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I)
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOLMOL	molecule analysis and molecule display (Programm zur Visualisierung und Analyse von 3D Molekülkoordinaten)
MWCO	molecular weight cut-off (Molekulargewichtsausschlussgrenze)
ν	Frequenz
Nef	negative factor (HI-virales Protein)
nm	Nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernmagnetische Resonanz)

NMRPipe	Programm zur Prozessierung von NMR-Spektren
NOE	nuclear overhauser effect / enhancement (Kern-Overhauser-Effekt)
NOESY	NOE spectroscopy (NOE-Spektroskopie)
n-Src-Loop	neuronaler Src-Loop
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDB	Protein Data Bank
PFG	pulsed field gradient (Möglichkeit des NMR-Spektrometers für das Probenvolumen einen kurzzeitigen magnetischen Feldgradienten in einer oder in mehreren Raumachsen zu erzeugen)
PPII	Poly-Prolin Helix Typ II
ppm	parts per million (Masseinheit für chemische Verschiebungen)
PROCHECK-NMR	Programm zur Analyse von NMR-Daten
r.m.s.d.	root mean square deviation (Quadratwurzel aus den mittleren Abweichungsquadraten)
RADAR	automated NOESY peak picking and NOE assignment (Programmpaket aus ATNOS und CANDID)
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-Loop	Arginin-Threonin-Loop
s	Sekunde
SDS	sodium dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SH1, SH2, SH3, SH4	Src Homologie 1, 2, 3, 4
Src	Sarcoma virales Onkogen-Homolog
$(\Theta)_{MRW}$	mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest
TOCSY	total correlated spectroscopy (Totale Korrelationspektroskopie)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TROSY	transverse relaxation optimized spectroscopy (Optimierte transverse Relaxationsspektroskopie)
U	unit (Einheit)
$[U -^{13}C]$, $[U -^{15}N]$	Uniforme Isotopenanreicherungen mit dem Nuklid ^{13}C bzw. ^{15}N (Grad des Einbaus ungekannt; Nomenklatur nach Markley et al., 1998)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VNMRJ	Varian NMR-Software
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
WALTZ-16	wonderful alternating phase technique for zero residual splittings (Entkopplungsschema)
WATERGATE	water supression by gradient-tailored exitation (Technik zur Unterdrückung des H ₂ O-NMR-Signals)

5.2 Ein- und Dreibuchstaben-Aminosäure-Kode

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

Literaturverzeichnis

- Agrawal, V. & K. V. Kisha (2002). Promiscuous binding nature of SH3 domains to their target proteins. *Protein Pept. Lett.* **9**, 185–193.
- Alexandropoulos, K., G. Cheng, & D. Baltimore (1995). Proline-rich sequences that bind to Src homology 3 domains with individual specificities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3110–3114.
- Altschul, S. (1991). Amino acid substitution matrices from an information theoretic perspective. *J. Mol. Biol.* **219**, 555–565.
- Altschul, S., T. Madden, A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, & D. Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402.
- Anderson, S. & B. Jorgensen (1995). Activation of *src*-related tyrosine kinases by IL-3. *J. Immunol.* **155**, 1660–1670.
- Arold, S., P. Franken, M. Strub, F. Hoh, S. Benichou, R. Benarous, & C. Dumas (1997). The crystal structure of HIV-1 Nef protein bound to the Fyn kinase SH3 domain suggests a role for this complex in altered T cell receptor signaling. *Structure* **5**, 1361–1372.
- Arold, S., R. O'Brien, P. Franken, M. Strub, F. Hoh, C. Dumas, & J. Ladbury (1998). RT loop flexibility enhances the specificity of Src family SH3 domains for HIV-1 Nef. *Biochemistry* **37**, 14683–14691.
- Aue, W., E. Bartholdi, & R. R. Ernst (1976). Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *J. Chem. Phys.* **64**, 2229–2246.
- Bax, A. (1994). Multi-dimensional nuclear magnetic resonance methods for protein studies. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 738–744.
- Bax, A., G. M. Clore, P. C. Driscoll, A. M. Gronenborn, M. Ikura, & L. E. Kay (1990). Practical aspects of proton-carbon-carbon-proton three-dimensional correlation spectroscopy of ¹³C-labeled proteins. *J. Magn. Reson.* **87**, 620–627.

- Benson, R., A. Sanfridson, J. Ottinger, C. Doyle, & B. Cullen (1993). Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. *J. Exp. Med.* **177**, 1561–1566.
- Biggs, T., S. Cooke, C. Barton, M. Harris, K. Saksela, & D. Mann (1999). Induction of activator protein 1 (AP1) in macrophages by human immunodeficiency virus type-1 Nef is a cell-type-specific response that requires both Hck and MAPK signaling events. *J. Mol. Biol.* **290**, 21–35.
- Björklund, M., O. Aitio, M. Stefanidakis, J. Suojanen, T. Salo, T. Sorsa, & E. Koivunen (2006). Stabilisation of the activated $\alpha_M\beta_2$ integrin by a small molecule inhibits leukocyte migration and recruitment. *Biochemistry* **45**, 2862–2871.
- Black, R. & J. White (1998). ADAMs: focus on the protease domain. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 654–659.
- Bloch, F., W. Hansen, & M. Packard (1946). The nuclear induction. *Phys. Rev.* **69**, 127.
- Bodenhausen, G. & D. J. Ruben (1980). Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **69**, 185.
- Booker, G., I. Gout, A. Downing, P. D. J. Boyd, M. Waterfield, & I. Campbell (1993). Solution structure and ligand-binding site of the SH3 domain of the p85 alpha subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* **73**, 813–822.
- Bosco, M., R. Curiel, A. Zea, M. Malabarba, J. Ortaldo, & I. Espinoza-Delgado (2000). IL-2 signaling in human monocytes involves the phosphorylation and activation of p59^{hck}. *J. Immunol.* **164**, 4575–4585.
- Brannetti, B. & M. Citterich (2003). iSPOT: A web tool to infer the interaction specificity of families of protein modules. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3709–3711.
- Brannetti, B., A. Via, G. Cestra, G. Cesareni, & M. Citterich (2000). SH3-SPOT: An algorithm to predict preferred ligands to different members of the SH3 gene family. *J. Mol. Biol.* **298**, 313–328.
- Briggs, S., S. Bryant, R. Jove, S. Sanderson, & T. Smithgall (1995). The Ras GTPase-activating Protein (GAP) is an SH3 domain-binding protein and substrate for the Src-related tyrosine kinase, Hck. *J. Biol. Chem.* **270**, 14718–14724.
- Briggs, S., B. Scholtz, J.-M. Jacque, S. Swingler, M. Stevenson, & T. Smithgall (2001). HIV-1 Nef promotes survival of myeloid cells by a Stat3-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 25605–25611.
- Briggs, S., M. Sharkey, M. Stevenson, & T. Smithgall (1997). SH3-mediated Hck tyrosine kinase activation and fibroblast transformation by the Nef protein of HIV-1. *J. Biol. Chem.* **272**, 17899–17902.

- Brown, M. & J. Cooper (1996). Regulation, substrates and function of src. *Biochim. Biophys. Acta* **1287**, 121–149.
- Brüschweiler, R. (2003). New approaches to the dynamic interpretation and prediction of NMR relaxation data from proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 175–183.
- Burton, E., S. Hunter, S. Wu, & S. Anderson (1997). Binding of src-like kinases to the β -subunit of the Interleukin-3 Receptor. *J. Biol. Chem.* **272**, 16189–16195.
- Carréno, S., E. Caron, C. Cougoule, & L. Emorine (2002). p59Hck isoform induces F-actin reorganization to form protrusions of the plasma membrane in a Cdc42- and Rac-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **277**, 21007–21016.
- Carréno, S., M. Gouze, S. Schaak, L. Emorine, & I. Maridonneau-Parini (2000). Lack of palmitoylation redirects p59Hck from the plasma membrane to p61Hck-positive lysosomes. *J. Biol. Chem.* **275**, 36223–36229.
- Case, D. (1998). The use of chemical shifts and their anisotropies in biomolecular structure determination. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 624–630.
- Cestra, G., L. Castagnoli, L. Dente, O. Minenkova, A. Petrelli, N. Migone, U. Hoffmuller, J. Schneider-Mergener, & G. Cesareni (1999). The SH3 domains of endophilin and amphiphysin bind to the proline-rich region of synaptojanin 1 at distinct sites that display an unconventional binding specificity. *J. Biol. Chem.* **274**, 32001–32007.
- Chang, A., M. O’Shaughnessy, & F. Jirik (2001). Hck SH3 domain-dependent abrogation of Nef-induced class 1 MHC down-regulation. *Eur. J. Immunol.* **31**, 2382–2387.
- Cheng, G., Z. Ye, & D. Baltimore (1994). Binding of Bruton’s tyrosine kinase to Fyn, Lyn, or Hck through a Src homology 3 domain-mediated interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8152–8155.
- Chiaradonna, F., L. Fontana, C. Iavarone, M. Carriero, G. Scholz, M. Barone, & M. Stoppelli (1999). Urokinase receptor-dependent and -independent p56/59^{hck} activation state is a molecular switch between myelomonocytic cell motility and adherence. *EMBO J.* **18**, 3013–3023.
- Choi, H.-J. & T. Smithgall (2004). Conserved residues in the HIV-1 Nef hydrophobic pocket are essential for recruitment and activation of the Hck tyrosine kinase. *J. Mol. Biol.* **343**, 1255–1268.
- Cicchetti, P., B. Mayer, G. Thiel, & D. Baltimore (1992). Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho. *Science* **257**, 803–806.
- Clore, G. M., A. M. Gronenborn, M. Nilges, & C. A. Ryan (1987). Three-dimensional structure of potato carboxypeptidase inhibitor in solution. A study using nuclear magnetic resonance, distance geometry, and restrained molecular dynamics. *Biochemistry* **26**, 8012–8023.

- Cohen, G., R. Ren, & D. Baltimore (1995). Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* **80**, 237–248.
- Cougoule, C., S. Carréno, J. Castandet, A. Labrousse, C. Astarie-Dequeker, R. Poincloux, V. LeCabec, & I. Maridonneau-Parini (2005). Activation of the lysosome-associated p61Hck isoform triggers the biogenesis of podosomes. *Traffic* **6**, 682–694.
- Courcoul, M., C. Patience, F. Rey, D. Blanc, A. Harmache, J. Sire, R. Vigne, & B. Spire (1995). Peripheral blood mononuclear cells produce normal amounts of defective Vif-human immunodeficiency virus type 1 particles which are restricted for the preretrotranscription steps. *J. Virol.* **69**, 2068–2074.
- Cowan, P. & S. McGavin (1955). Structure of poly-L-proline. *Nature* **176**, 470–478.
- Cowan-Jacob, S., G. Fendrich, P. Manley, W. Jahnke, D. Fabbro, J. Liebetanz, & T. Meyer (2005). The crystal structure of a c-Src complex in an active conformation suggests possible steps in c-Src activation. *Structure* **13**, 861–871.
- Cullen, B. (1998). HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell* **93**, 685–692.
- Dalgarno, D., M. Botfield, & R. Rickles (1997). SH3 domains and drug design: ligands, structure, and biological function. *Biopolymers* **43**, 383–400.
- Dalvit, C., S. Cottens, P. Ramage, & U. Hommel (1999). Half-filter experiments for assignment, structure determination and hydration analysis of unlabelled ligands bound to ¹³C/¹⁵N labelled proteins. *J. Biomol. NMR* **13**, 43–50.
- Deacon, N., A. Tsykin, A. Solomon, K. Smith, M. Ludford-Menting, D. Hooker, D. McPhee, A. Greenway, A. Ellett, C. Chatfield, V. Lawson, S. Crowe, A. Maerz, S. Sonza, J. Learmont, J. Sullivan, A. Cunningham, D. Dwyer, D. Dowton, & J. Mills (1995). Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* **270**, 988–991.
- Dehner, A. & H. Kessler (2005). Diffusion NMR spectroscopy: folding and aggregation of domains in p53. *Chembiochem.* **6**, 1550–1565.
- Delaglio, F., S. Grzesiek, G. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, & A. Bax (1995). NMRPipe: a multidimensional spectral processing program based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* **6**, 227–293.
- Dötsch, V. & G. Wagner (1998). New approaches to structure determination by NMR spectroscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 619–623.
- Douaisi, M., S. Dussart, M. Courcoul, G. Bessou, E. Lerner, E. Decroly, & R. Vigne (2005). The tyrosine kinases Fyn and Hck favor the recruitment of tyrosine-phosphorylated APOBEC3G into vif-defective HIV-1 particles. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **329**, 917–924.

- Durden, D., H. Kim, B. Calore, & Y. Liu (1995). The Fc γ RI receptor signals through the activation of *hck* and MAP kinase. *J. Immunol.* **154**, 4039–4047.
- Dykstra, M., A. Cherukuri, H. Sohn, S. Tzeng, & S. Pierce (2003). Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 457–481.
- Dyson, H. & P. . Wright (1998). Equilibrium NMR studies of unfolded and partially folded proteins. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 499–503.
- Eck, M., S. Atwell, S. Shoelson, & S. Harrison (1994). Structure of the regulatory domains of the Src-family tyrosine kinase Lck. *Nature* **368**, 764–769.
- Engen, J., T. Smithgall, W. Gmeiner, & D. Smith (1997). Identification and localization of slow, natural, cooperative unfolding in the hematopoietic cell kinase SH3 domain by amide hydrogen exchange and mass spectrometry. *Biochemistry* **36**, 14384–14391.
- Ernst, M., D. Gearing, & A. Dunn (1994). Functional and biochemical association of Hck with the LIF/IL-6 receptor signal transduction subunit gp130 in embryonic stem cells. *EMBO J.* **13**, 1574–1584.
- Ernst, M., M. Inglese, G. Scholz, K. Warder, F. Clay, S. Bozinovski, P. Waring, R. Darwiche, T. Kay, P. Sly, R. Collins, D. Turner, M. Hibbs, G. Anderson, & A. Dunn (2002). Constitutive activation of the Src family kinase Hck results in spontaneous pulmonary inflammation and an enhanced innate immune response. *J. Exp. Med.* **196**, 589–604.
- Ernst, M., U. Novak, S. Nicholson, J. Layton, & A. Dunn (1999). The carboxyl-terminal domains of gp130-related cytokine receptors are necessary for suppressing embryonic stem cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **274**, 9729–9737.
- Espanel, X. & M. Sudol (2001). Yes-associated protein and p53-binding protein-2 interact through their WW and SH3 domains. *J. Biol. Chem.* **276**, 14514–14523.
- Fazi, B., M. Cope, A. Douangamath, S. Ferracuti, K. Schirwitz, A. Zucconi, D. Drubin, M. Wilmanns, G. Cesareni, & L. Castagnoli (2002). Unusual binding properties of the SH3 domain of the yeast actin-binding protein Abp1: structural and functional analysis. *J. Biol. Chem.* **277**, 5290–5298.
- Feng, S., J. Chen, H. Yu, J. Simon, & S. Schreiber (1994). Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science* **266**, 1241–1247.
- Feng, S., C. Kasahara, R. Rickles, & S. Schreiber (1995). Specific interactions outside the proline-rich core of two classes of Src homology 3 ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 12408–12415.

- Fernandez-Ballester, G., C. Blanes-Mira, & L. Serrano (2004). The tryptophan switch: Changing ligand-binding specificity from type I to type II in SH3 domains. *J. Biol. Mol.* **335**, 619–629.
- Fesik, S. & E. Zuiderweg (1988). Heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy. A strategy for simplification of homonuclear two-dimensional NMR spectra. *J. Magn. Reson.* **78**, 588–593.
- Fiaux, J., E. Bertelsen, A. Horwich, & K. Wüthrich (2002). NMR analysis of a 900 K GroEL-GroES complex. *Nature* **418**, 207–211.
- Fitzer-Attas, C., M. Lowry, M. Crowley, A. Finn, F. Meng, A. DeFranco, & C. Lowell (2000). Fc γ receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr and Lyn. *J. Exp. Med.* **191**, 669–681.
- Foti, M., L. Cartier, V. Piguet, D. Lew, J. Carpentier, D. Trono, & K. Krause (1999). The HIV Nef protein alters Ca²⁺ signaling in myelomonocytic cells through SH3-mediated protein-protein interactions. *J. Biol. Chem.* **274**, 34765–34772.
- Frankel, A. & J. Young (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Ann. Rev. Biochem.* **67**, 1–25.
- Franz, W., P. Berger, & J. Wang (1989). Deletion of an N-terminal regulatory domain of the c-abl tyrosine kinase activates its oncogenic potential. *EMBO J.* **8**, 137–147.
- Freeman, R. (1998). Shaped radiofrequency pulses in high resolution NMR. *Prog. NMR Spectr.* **32**, 59–106.
- Gabuzda, D., K. Lawrence, E. Langhoff, E. Terwilliger, T. Dorfman, W. Haseltine, & J. Sodroski (1992). Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J. Virol.* **66**, 6489–6495.
- Garcia, J. & A. Miller (1992). Downregulation of cell surface CD4 by nef. *Res. Virol.* **143**, 52–55.
- Gardner, K. & L. Kay (1998). The use of ²H, ¹³C, ¹⁵N multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 357–406.
- Ghazizadeh, S., J. Bolen, & H. Fleit (1994). Physical and functional association of src-related protein tyrosine kinases with Fc γ RII in monocytic THP-1 cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 8878–8884.
- Gill, S. C. & P. H. von Hippel (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319–326.
- Goldsmith, M., M. Warmerdam, R. Atchison, M. Miller, & W. Greene (1995). Dissociation of the CD4 downregulation and viral infectivity enhancement functions of human immunodeficiency virus type 1 Nef. *J. Virol.* **69**, 4112–4121.

- Gorina, S. & N. Pavletich (1996). Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science* **274**, 1001–1005.
- Grodberg, J. & J. J. Dunn (1988). ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* **170**, 1245–1253.
- Grzesiek, S., J. Anglister, & A. Bax (1993). Correlation of backbone amide and aliphatic side-chain resonances in $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins by isotropic mixing of ^{13}C magnetisation. *J. Magn. Reson.* **101**, 114–119.
- Grzesiek, S. & A. Bax (1993). The importance of not saturating H_2O in protein NMR. Application to sensitivity enhancement and NOE measurements. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 12593–12594.
- Güntert, P., W. Braun, & K. Wüthrich (1991). Efficient computation of three-dimensional protein structures in solution from nuclear magnetic resonance data using the program DIANA and the supporting programs CALIBA, HABAS and GLOMSA. *J. Mol. Biol.* **217**, 517–530.
- Güntert, P., C. Mumenthaler, & K. Wüthrich (1997). Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new Program DYANA. *J. Mol. Biol.* **273**, 283–298.
- Hajduk, P., D. Augeri, J. Mack, R. Mendoza, J. Yang, S. Betz, & S. Fesik (2000). NMR-based screening of proteins containing ^{13}C -labeled methyl groups. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 7898–7904.
- Hanks, S. & T. Hunter (1995). In G. Hardie & S. Hanks (Eds.), *The Protein Kinase Facts Book*. Academic Press.
- Hanna, Z., D. Kay, N. Rebai, A. Guimond, S. Jothy, & P. Jolicoeur (1998). Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell* **95**, 163–175.
- Hassaine, G., M. Courcoul, G. Bessou, Y. Barthalay, C. Picard, D. Olive, Y. Collette, R. Vigne, & E. Decroly (2001). The tyrosine kinase Hck is an inhibitor of HIV-1 replication counteracted by the viral Vif protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 16885–16893.
- Henzler, T., A. Harmache, H. Herrmann, H. Spring, M. Suzan, G. Audoly, T. Panek, & V. Bosch (2001). Fully functional, naturally occurring and C-terminally truncated variant human immunodeficiency virus (HIV) Vif does not bind to HIV Gag but influences intermediate filament structure. *J. Gen. Virol.* **82**, 561–573.
- Herrmann, T., P. Güntert, & K. Wüthrich (2002a). Protein NMR structure determination with automated NOE-identification in the NOESY spectra using new software ATNOS. *J. Biomol. NMR* **24**, 171–189.

- Herrmann, T., P. Güntert, & K. Wüthrich (2002b). Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the Torsion Dynamics Algorithm DYANA. *J. Mol. Biol.* **319**, 209–227.
- Holtzmann, D., W. Cook, & A. Dunn (1987). Isolation and Sequence of a cDNA Corresponding to a src-Related Gene Expressed in Murine Hemopoietic Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8325–8329.
- Horita, D., D. Baldisseri, W. Zhang, A. Altieri, T. Smithgall, W. Gmeiner, & R. Byrd (1998). Solution structure of the human Hck SH3 domain and identification of its ligand binding site. *J. Mol. Biol.* **278**, 253–265.
- Hou, T., K. Chen, W. McLaughlin, & W. Wang (2006). Computational analysis and prediction of the binding motif and protein interacting partners of the Abl SH3 domain. *PLoS Comput. Biol.* **2**, 46–55.
- Hu, Y., Y. Liu, S. Pelletier, E. Buchdunger, M. Warmuth, D. Fabbro, M. Hallek, R. van Etten, & S. Li (2004). Requirement of Src kinases Lyn, Hck and Fgr for BCR-ABL1-induced B-lymphoblastic leukemia but not chronic myeloid leukemia. *Nat. Genet.* **36**, 453–461.
- Hubbard, S. & J. Till (2000). Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 373–398.
- Ikura, M. & A. Bax (1992). Isotope-Filtered 2D NMR of a Protein-Peptide Complex: Study of a Skeletal Muscle Myosin Light Chain Kinase Fragment Bound to Calmodulin. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 2433–2440.
- Ikura, M., L. E. Kay, & A. Bax (1990). A novel approach for sequential assignment of ^1H , ^{13}C and ^{15}N spectra of proteins: heteronuclear triple-resonance three-dimensional NMR spectroscopy. Application to Calmodulin. *Biochemistry* **29**, 4659–4667.
- Ishima, R. & D. Torchia (2000). Protein dynamics from NMR. *Nature Struct. Biol.* **7**, 740–743.
- Jackson, P. & D. Baltimore (1989). N-terminal mutations activate the leukemogenic potential of the myristoylated form of c-abl. *EMBO J.* **8**, 449–456.
- Johnson, M., N. Williamson, G. Scholz, A. Jaworowski, R. Wettenhall, A. Dunn, & H.-C. Cheng (2000). Modulation of the catalytic activity of the Src family tyrosine kinase Hck by autophosphorylation at a novel site in the unique domain. *J. Biol. Chem.* **275**, 33353–33364.
- Kang, H., C. Freund, J. Duke-Cohan, A. Musacchio, G. Wagner, & C. Rudd (2000). SH3 domain recognition of a proline-independent tyrosine-based RKxxYxxY motif in immune cell adaptor SKAP55. *EMBO J.* **19**, 2889–2899.

- Kay, L. (1995). Field gradient techniques in NMR spectroscopy. *Curr .Opin. Struct. Biol.* **5**, 674–681.
- Kay, L. (1998). Protein dynamics from NMR. *Nature Struct. Biol.* **5**, 513–517.
- Kay, L., M. Ikura, R. Tschudin, & A. Bax (1990). Three-dimensional triple resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins. *J. Magn. Reson.* **89**, 496–514.
- Kay, L. E., P. Keifer, & T. Saarinen (1992). Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10663–10665.
- Kedzierska, K., N. Vardaxis, A. Jaworowski, & S. Crowe (2001). Fc γ R-mediated phagocytosis by human macrophages involves Hck, Syk, and Pyk2 and is augmented by GM-CSF. *J. Leukoc. Biol.* **70**, 322–328.
- Keller, R. (2004). In *The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial*. CANTINA Verlag.
- Kelly, M., L. Ball, C. Krieger, Y. Yu, M. Fischer, S. Schiffmann, P. Schmieder, R. Kuhne, W. Bermel, A. Bacher, G. Richter, & H. Oschkinat (2001). The NMR structure of the 47-kDa dimeric enzyme 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase and ligand binding studies reveal the location of the active site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 13025–13030.
- Kestler, H., D. Ringler, K. Mori, D. Panicali, P. Sehgal, M. Daniel, & R. Desrosiers (1991). Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* **65**, 651–662.
- Kim, P., Z.-Y. Sun, S. Blacklow, G. Wagner, & M. Eck (2003). A zinc clasp structure tethers Lck to T cell coreceptors CD4 and CD8. *Science* **301**, 1725–1728.
- Kirchhoff, F., T. Greenough, D. Brettler, J. Sullivan, & R. Desrosiers (1995). Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* **332**, 228–232.
- Klejman, A., S. Schreiner, M. Nieborowska-Skorska, A. Slupianek, M. Wilson, T. Smithgall, & T. Skorski (2002). The Src family kinase Hck couples BCR/ABL to STAT5 activation in myeloid leukemia cells. *EMBO J.* **21**, 5766–5774.
- Koch, C., D. Anderson, M. Moran, C. Ellis, & T. Pawson (1991). SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* **252**, 668–674.
- Kohda, D., H. Terasawa, S. Ichikawa, K. Ogura, H. Hatanaka, V. Mandiyan, A. Ullrich, J. Schlessinger, & F. Inagaki (1994). Solution structure and ligand-binding site of the carboxy-terminal SH3 domain of GRB2. *Structure* **2**, 1029–1040.

- Koradi, R., M. Billeter, & K. Wüthrich (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphics* **14**, 51–55.
- Kowanetz, K., I. Szymkiewicz, K. Haglund, M. Kowanetz, K. Husnjak, J. Taylor, P. Soubeyran, U. Engstrom, J. Ladbury, & I. Dikic (2003). Identification of a novel proline-arginine motif involved in CIN85-dependent clustering of Cbl and down-regulation of epidermal growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* **278**, 39735–39746.
- Koyama, S., H. Yu, D. Dalgarno, T. Shin, L. Zydowsky, & S. Schreiber (1993). Structure of the PI3K SH3 domain and analysis of the SH3 family. *Cell* **72**, 945–952.
- Krady, J., A. Basu, S. Levison, & R. Milner (2002). Differential expression of protein tyrosine kinase genes during microglial activation. *Glia* **40**, 11–24.
- Krauss, G. (1997). In G. Krauss (Ed.), *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*. WILEY-VCH.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Laskowski, R. A., J. A. Rullmann, M. W. MacArthur, R. Kaptein, & J. M. Thornton (1996). AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR* **8**, 477–496.
- Lee, C., B. Leung, M. Lemmon, J. Zheng, D. Cowburn, J. Kuriyan, & K. Saksela (1995). A single amino acid in the SH3 domain of Hck determines its high affinity and specificity in binding to HIV-1 Nef protein. *EMBO J.* **14**, 5006–5015.
- Lemaster, D. (1994). Isotope labeling in solution protein assignment and structural analysis. *Prog. NMR Spectr.* **26**, 371–419.
- Lerner, E. & T. Smithgall (2002). SH3-dependent stimulation of Src-family kinase autophosphorylation without tail release from the SH2 domain in vivo. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 365–369.
- Lerner, E., R. Tribble, A. Schiavone, J. Hochrein, J. Engen, & T. Smithgall (2005). Activation of the Src family kinase Hck without SH3-Linker release. *J. Biol. Chem.* **280**, 40832–40837.
- Lewitzky, M., C. Kardinal, N. Gehring, E. Schmidt, B. Konkol, M. Eulitz, W. Birchmeier, U. Schaeper, & S. Feller (2001). The C-terminal SH3 domain of the adapter protein Grb2 binds with high affinity to sequences in Gab1 and SLP-76 which lack the SH3-typical P-x-x-P core motif. *Oncogene* **20**, 1052–1062.
- Li, H. & D. Lawrence (2005). Acquisition of Fyn-selective SH3 domain ligands via a combinatorial library strategy. *Chem. Biol.* **12**, 905–912.

- Lim, W. & F. Richards (1994). Critical residues in an SH3 domain from Sem-5 suggest a mechanism for proline-rich peptide recognition. *Nat. Struct. Biol.* **1**, 221–225.
- Linnekin, D., O. Howard, L. Park, W. Farrar, D. Ferris, & D. Longo (1994). Hck expression correlates with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced proliferation in HL-60 cells. *Blood* **84**, 94–103.
- Lock, P., S. Ralph, E. Stanley, I. Boulet, R. Ramsey, & A. Dunn (1991). Two isoforms of murine *hck*, generated by utilization of alternative translational initiation codons, exhibit different patterns of subcellular localization. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 4363–4370.
- Lottspeich, F. & H. Zorbas (1998). In *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Lowell, C. (2004). Src-family kinases: rheostats of immune cell signaling. *Mol. Immunol.* **41**, 631–643.
- Lowell, C. & G. Berton (1998). Resistance to endotoxic shock and reduced neutrophil migration in mice deficient for the Src-family kinases Hck and Fgr. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7580–7584.
- Lowell, C., L. Fumagalli, & G. Berton (1996). Deficiency of Src family kinases p59/61hck and p58c-fgr results in defective adhesion-dependent neutrophil functions. *J. Cell. Biol.* **133**, 895–910.
- Lowell, C., M. Niwa, P. Soriano, & H. Varmus (1996). Deficiency of the Hck and Src tyrosine kinases results in extreme levels of extramedullary hematopoiesis. *Blood* **87**, 1780–1792.
- Lowell, C., P. Soriano, & H. Varmus (1994). Functional overlap in the src gene family: inactivation of hck and fgr impairs natural immunity. *Genes Dev.* **8**, 387–398.
- Luria, S. E. & J. W. Burrous (1955). Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *J. Bacteriol.* **74**, 461–476.
- Macintosh, L. & F. Dahlquist (1990). Biosynthetic incorporation of ¹⁵N and ¹³C for assignment and interpretation of nuclear magnetic resonance spectra of proteins. *Q. Rev. Biophys.* **23**, 1–38.
- Manning, G., D. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, & S. Sudarsanam (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912–1934.
- Mariani, R., D. Chen, B. Schrofelbauer, F. Navarro, R. Konig, B. Bollman, C. Munk, H. Nymark-McMahon, & N. Landau (2003). Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* **114**, 21–31.

- Marion, D., M. Ikura, R. Tschudin, & A. Bax (1989). Rapid recording of 2D NMR spectra without phase cycling. Application to the study of hydrogen exchange in proteins. *J. Magn. Reson.* **85**, 393–399.
- Marion, D., L. Kay, S. Sparks, D. Torchia, & A. Bax (1989). Three-dimensional heteronuclear NMR of ^{15}N labeled proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 1515–1517.
- Markley, J., A. Bax, Y. Arata, C. Hilbers, R. Kaptein, B. Sykes, P. Wright, & K. Wüthrich (1998). Recommendations for the resresentation of NMR structures of proteins and nucleic acids. *J. Biomol. NMR* **12**, 1–23.
- Marsh, J. (1999). The numerous effector functions of Nef. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**, 192–198.
- Mayer, B. & D. Baltimore (1993). Signalling through SH2 and SH3 domains. *Trends Cell. Biol.* **3**, 8–13.
- Meyer, B. & T. Peters (2003). NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42**, 864–890.
- Michel, N., I. Allespach, S. Venzke, O. Fackler, & O. Keppler (2005). The Nef protein of human immunodeficiency virus establishes superinfection immunity by a dual strategy to downregulate cell-surface CCR5 and CD4. *Curr. Biol.* **15**, 714–723.
- Miller, M., M. Warmerdam, I. Gaston, W. Greene, & M. Feinberg (1994). The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J. Exp. Med.* **179**, 101–113.
- Mittag, T., B. Schaffhausen, & U. Günther (2003). Direct observation of protein-ligand interaction kinetics. *Biochemistry* **42**, 11128–11136.
- Moarefi, I., M. LaFevre-Bernt, F. Sicheri, M. Huse, C.-H. Lee, J. Kuriyan, & W. Miller (1997). Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature* **385**, 650–653.
- Mócsai, A., Z. Jakus, T. Vántus, G. Berton, C. Lowell, & E. Ligeti (2000). Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases. *J. Immunol.* **164**, 4321–4331.
- Mócsai, A., E. Ligeti, C. Lowell, & G. Berton (1999). Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *J. Immunol.* **162**, 1120–1126.
- Modafferi, E. & D. Black (1999). Combinatorial control of a neuron-specific exon. *RNA* **5**, 687–706.
- Möhn, H., V. L. Cabec, S. Fischer, & I. Maridonneau-Parini (1995). The src-family protein-tyrosine kinase p59hck is located on the secretory granules in human neutrophils and translocates towards the phagosome during cell activation. *Biochem. J.* **309**, 657–665.

- Mongioli, A., P. Romano, S. Panni, M. Mendoza, W. Wong, A. Musacchio, G. Cesareni, & P. D. Fiore (1999). A novel peptide-SH3 interaction. *EMBO J.* **18**, 5300–5309.
- Montelione, G. & G. Wagner (1990). Triple resonance experiments for establishing conformation-independent sequential NMR assignments in isotope-enriched polypeptides. *J. Magn. Res.* **87**, 183–188.
- Musacchio, A. (2003). How SH3 domains recognize proline. *Adv. Protein Chem.* **61**, 211–268.
- Musacchio, A., T. Gibson, V. Letho, & M. Saraste (1992). SH3: an abundant protein domain in search of a function. *FEBS Lett.* **307**, 55–61.
- Musacchio, A., M. Saraste, & M. Willmanns (1994). High-resolution crystal structures of tyrosine kinase SH3 domains complexed with proline-rich peptides. *Nature Struct. Biol.* **1**, 546–551.
- Nair, K. & S. Zingde (2001). Adhesion of neutrophils to fibronectin: role of the CD66 antigens. *Cell. Immunol.* **208**, 96–106.
- N'Diaye, E.-N., X. Darzacq, C. Astarie-Dequeker, M. Daffé, J. Calafat, & I. Maridonneau-Parini (1998). Fusion of azurophil granules with phagosomes and activation of the tyrosine kinase Hck are specifically inhibited during phagocytosis of mycobacteria by human neutrophils. *J. Immunol.* **161**, 4983–4991.
- Norwood, T. J., J. Boyd, J. E. Heritage, N. Soffe, & I. D. Campbell (1990). Comparison of techniques for ^1H -detected heteronuclear ^1H - ^{15}N spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **87**, 488–501.
- Obenauer, J., L. Cantley, & M. Yaffe (2003). Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3635–3641.
- Ohlenschläger, O., R. Ramachandran, K.-H. Gührs, B. Schlott, & L. R. Brown (1998). The NMR solution structure of the plasminogen-activator protein staphylokinase. *Biochemistry* **37**, 10635–10642.
- Otting, G. (1997). NMR studies of water bound to biological molecules. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **31**, 259–285.
- Palencia, A., E. Cobos, P. Mateo, J. Martinez, & I. Luque (2004). Thermodynamic dissection of the binding energetics of proline-rich peptides to the Abl-SH3 domain: implications for rational ligand design. *J. Mol. Biol.* **336**, 527–537.
- PalmerIII, A. (1997). Probing molecular motion by NMR. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 732–737.

- Pawson, T. & G. Gish (1992). SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* **71**, 359–362.
- Pawson, T. & J. Schlessinger (1993). SH2 and SH3 domains. *Curr. Biol.* **3**, 434–442.
- Pervushin, K., R. Riek, G. Wider, & K. Wüthrich (1997). Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12366–12371.
- Pervushin, K., G. Wider, & K. Wüthrich (1998). Single transition-to-single transition polarisation transfer (ST2-PT) in [¹⁵N,¹H]-TROSY. *J. Biomol. NMR* **12**, 345–348.
- Piguet, V. & D. Trono (1999). The Nef protein of primate lentiviruses. *Rev. Med. Virol.* **9**, 111–120.
- Piotto, M., V. Saudek, & V. Sklenář (1992). Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* **2**, 661–665.
- Pisabarro, M., L. Serrano, & M. Willmanns (1998). Crystal structure of the Abl-SH3 domain complexed with a designed high-affinity peptide ligand: implications for a SH3-ligand interaction. *J. Mol. Biol.* **281**, 513–521.
- Podar, K., G. Mostoslavski, M. Sattler, Y.-T. Tai, T. Hayashi, L. Catley, T. Hideshima, R. Mulligan, D. Chauhan, & K. Anderson (2004). Critical role for hematopoietic cell kinase (Hck)-mediated phosphorylation of Gab1 and Gab2 docking proteins in Interleukin 6-induced proliferation and survival of multiple myeloma cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 21658–21665.
- Poghosyan, Z., S. Robbins, M. Houslay, A. Webster, G. Murphy, & D. Edwards (2002). Phosphorylation-dependent interactions between ADAM15 cytoplasmic domain and Src family protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* **277**, 4999–5007.
- Porter-Scott, M., F. Zappacosta, E. Kim, R. Annan, & W. Miller (2002). Identification of novel SH3 domain ligands for the Src family kinase Hck. *J. Biol. Chem.* **277**, 28238–28246.
- Purcell, E., H. Torrey, & R. Pound (1946). Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Phys. Rev.* **69**, 37–38.
- Quintell, N., R. Lebo, H. Varmus, J. Bishop, M. Pettenati, M. L. Beau, M. Diaz, & J. Rowley (1987). Identification of a human gene (HCK) that encodes a protein-tyrosine kinase and is expressed in hematopoietic cells. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2267–2275.
- Radha, V., C. Sudhakar, P. Ray, & G. Swarup (2002). Induction of cytochrome c release and apoptosis by Hck-SH3 domain-mediated signalling requires caspase-3. *Apoptosis* **7**, 195–207.

- Rajendran, L. & K. Simons (2005). Lipid rafts and membrane dynamics. *J. Cell. Sci.* **118**, 1099–1102.
- Ramachandran, G., C. Ramakrishnan, & V. Sasisekharan (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* **7**, 95–99.
- Raulin, J. (2002). Human immunodeficiency virus and host cell lipids. Interesting pathways in research for a new HIV therapy. *Prog. Lipid Res.* **41**, 27–65.
- Ren, R., B. Mayer, P. Cicchetti, & D. Baltimore (1993). Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* **259**, 1157–1161.
- Renzoni, D., D. Pugh, G. Siligardi, P. Das, C. Morton, C. Rossi, M. Waterfield, I. Campbell, & J. Ladbury (1996). Structural and thermodynamic characterization of the interaction of the SH3 domain from Fyn with the proline-rich binding site on the p85 subunit of PI3-Kinase. *Biochemistry* **35**, 15646–15653.
- Resh, M. (1994). Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* **76**, 411–413.
- Robbins, S., N. Quintell, & J. Bishop (1995). Myristoylation and differential palmitoylation of the HCK protein-tyrosine kinases govern their attachment to membranes and association with caveolae. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3507–3515.
- Roskowski, R. (2004). Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 1155–1165.
- Sagane, K., Y. Ohya, Y. Hasegawa, & I. Tanaka (1998). Metalloproteinase-like, disintegrin-like, cysteine-rich proteins MDC2 and MDC3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. *Biochem. J.* **334**, 93–98.
- Saksela, K., G. Cheng, & D. Baltimore (1995). Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef⁺ viruses but not for down-regulation of CD4. *EMBO J.* **14**, 484–491.
- Salghetti, S., R. Mariani, & J. Skowronski (1995). Human immunodeficiency virus type 1 Nef and p56lck protein-tyrosine kinase interact with a common element in CD4 cytoplasmic tail. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 349–353.
- Salzmann, M., K. Pervushin, G. Wider, H. Senn, & K. Wüthrich (2000). NMR assignment and secondary structure determination of an octameric 110 kDa protein using TROSY in triple resonance experiments. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 7543–7548.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, & T. Maniatis (1989). In *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

- Schaeffer, M., M. Schneiderbauer, S. Weidler, R. Tavares, M. Warmuth, G. DeVos, & M. Hallek (2001). Signaling through a novel domain of gp130 mediates cell proliferation and activation of Hck and Erk kinases. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 8068–8081.
- Schindler, T., F. Sicheri, A. Pico, A. Gazit, A. Levitzki, & J. Kuriyan (1999). Crystal structure of Hck in complex with a Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. *Mol. Cell* **3**, 639–648.
- Schlöndorff, J. & C. Blobel (1999). Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J. Cell Sci.* **112**, 3603–3617.
- Schreiner, S., A. Schiavone, & T. Smithgall (2002). Activation of STAT3 by the Src family kinase Hck requires a functional SH3 domain. *J. Biol. Chem.* **277**, 45680–45687.
- Schweimer, K., S. Hoffmann, F. Bauer, U. Friedrich, C. Kardinal, S. Feller, B. Biesinger, & H. Sticht (2002). Structural investigation of the binding of a herpesviral protein to the SH3 domain of tyrosine kinase Lck. *Biochemistry* **41**, 5120–5130.
- Shaka, A. J. & J. Keeler (1987). Broadband spin decoupling in isotropic lipids. *Prog. NMR Spectroscopy* **19**, 49–192.
- Shaka, A. J., J. Keeler, T. Frenkiel, & R. Freeman (1983). An improved sequence for broadband decoupling: Waltz-16. *J. Magn. Reson.* **52**, 335–338.
- Shaka, A. J., C. J. Lee, & A. Pines (1988). Iterative schemes for bilinear operators; application to spin decoupling. *J. Magn. Reson.* **77**, 274–293.
- Sheehy, A., N. Gaddis, J. Choi, & M. Malim (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**, 646–650.
- Shivakrupa, R., V. Radha, C. Sudhakar, & G. Swarup (2003). Physical and functional interaction between Hck tyrosine kinase and guanine nucleotide exchange factor C3G results in apoptosis, which is independent of C3G catalytic domain. *J. Biol. Chem.* **278**, 52188–52194.
- Shuker, S., P. Hajduk, R. Meadows, & S. Fesik (1996). Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science* **274**, 1531–1534.
- Sicheri, F., I. Moarefi, & J. Kuriyan (1997). Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* **385**, 602–609.
- Simon, J., E. Carpenter, R. Fouchier, & M. Malim (1999). Vif and the p55(Gag) polyprotein of human immunodeficiency virus type 1 are present in co-localizing membrane-free cytoplasmic complexes. *J. Virol.* **73**, 2667–2674.

- Simon, J., A. Sheehy, E. Carpenter, R. Fouchier, & M. Malim (1999). Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein. *J. Virol.* **73**, 2675–2681.
- Songyang, Z., S. Shoelson, M. Chaudhuri, G. Gish, T. Pawson, W. Haser, F. King, T. Roberts, S. Ratnofsky, R. L. B. Neel, R. Birge, J. Eduardo-Fajardo, M. Chou, H. Hanafusa, B. Schaffhausen, & L. Cantley (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* **72**, 767–778.
- Sørensen, O., G. Eich, M. Levitt, G. Bodenhausen, & R. Ernst (1983). Product operator formalism for the description of NMR pulse experiments. *Progr. NMR Spectr.* **16**, 163–192.
- Sparks, A., J. Rider, N. Hoffmann, D. Fowlkes, L. Quilliam, & B. Kay (1996). Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1540–1544.
- Suen, P., D. Ilic, E. Cavegion, G. Berton, C. Damsky, & C. Lowell (1999). Impaired integrin-mediated signal transduction, altered cytoskeletal structure and reduced motility in Hck/Fgr deficient macrophages. *J. Cell. Sci.* **112**, 4067–4078.
- Suzu, S., H. Harada, T. Matsumoto, & S. Okada (2005). HIV-1 Nef interferes with M-CSF receptor signaling through Hck activation and inhibits M-CSF bioactivities. *Blood* **105**, 3230–3237.
- Taguchi, T., N. Kiyokawa, N. Sato, M. Saito, & J. Fujimoto (2000). Characteristic expression of Hck in human B-cell precursors. *Exp. Hemat.* **28**, 55–64.
- Tjandra, N. & A. Bax (1997). Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium. *Science* **278**, 1111–1114.
- Tokunaga, K., E. Kiyokawa, M. Nakaya, N. Otsuka, A. Kojima, T. Kurata, & M. Matsuda (1998). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 virion entry by dominant-negative Hck. *J. Virol.* **72**, 6257–6259.
- Tran, T. (2005). In *Analyse der Bindungsspezifität der humanen Lck-SH3-Domäne anhand artifizierlicher und physiologischer Peptid-Liganden und strukturelle Charakterisierung dieser Peptide im Komplex mit SH3-Domänen*. Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich, Germany.
- Tran, T., S. Hoffmann, K. Wiesehan, E. Jonas, C. Luge, A. Aladag, & D. Willbold (2006). Insights into human Lck SH3 domain binding specificity: different binding modes of artificial and native ligands. *Biochemistry* **44**, 15042–15052.
- Tuttle, D., J. Harrison, C. Anders, J. Sleasman, & M. Goodenow (1998). Expression of CCR5 increases during monocyte differentiation and directly mediates macrophage susceptibility to infection by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **72**, 4962–4969.

- Ulmer, T., J. Werner, & I. Campbell (2002). SH3-SH2 domain orientation in Src kinases: NMR studies of Fyn. *Structure* **10**, 901–911.
- und D. Cowburn, J. K. (1997). Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**, 259–288.
- Viguera, A., J. Arrondo, A. Musacchio, M. Saraste, & L. Serrano (1994). Characterization of the interaction of natural proline-rich peptides with five different SH3 domains. *Biochemistry* **33**, 10925–10933.
- von Schwedler, U., J. Song, C. Aiken, & D. Trono (1993). Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J. Virol.* **67**, 4945–4955.
- Vuister, G. W. & A. Bax (1993). Quantitative J correlation: A new approach for measuring homonuclear three-bond $J(\text{H}^N\text{H}^\alpha)$ coupling constants in ^{15}N -enriched proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 7772–7777.
- Wagner, G. (1997). An account of NMR in structural biology. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 841–844.
- Wagner, G. & K. Wüthrich (1982). Sequential resonance assignments in protein ^1H nuclear magnetic resonance spectra. Basic pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.* **155**, 347–366.
- Wang, Y.-S., D. Liu, & D. Wyss (2004). Competition STD NMR for the detection of high-affinity ligands and NMR-based screening. *Magn. Reson. Chem.* **42**, 485–489.
- Welch, H. & I. Maridonneau-Parini (1997). Hck is activated by opsonized zymosan and A23187 in distinct subcellular fractions of human granulocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 102–109.
- Welch, H., C. Mauran, & I. Maridonneau-Parini (1996). Nonreceptor protein-tyrosine kinases in neutrophil activation. *Methods in Enzymology* **9**, 607–618.
- Williams, J. C., R. K. Wierenga, & M. Saraste (1998). Insights into Src kinase functions: Structural comparisons. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 179–184.
- Williamson, M., T. Havel, & K. Wüthrich (1985). Solution conformation of Proteinaseinhibitor IIA from bull seminal plasma by ^1H nuclear magnetic resonance and distance geometry. *J. Mol. Biol.* **182**, 295–315.
- Wishart, D. S., C. G. Bigam, J. Yao, F. Abildgaard, H. J. Dyson, E. Oldfield, J. L. Markley, & B. D. Sykes (1995). ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR* **6**, 135–140.
- Wittekind, M. & L. Mueller (1993). HNCACB, a high-sensitivity 3D NMR experiment to correlate amide-proton and nitrogen resonances with the α - and β -carbon resonances in proteins. *J. Magn. Reson.* **101**, 201–205.

- Wüthrich, K. (1986). In *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Wüthrich, K. (1998). The second decade - into the third millenium. *Nature Struct. Biol.* **5**, 492–495.
- Wüthrich, K., M. Billeter, & W. Braun (1983). Pseudo-structures for the 20 common amino acids for use in studies of protein conformations by measurements of intramolecular proton-proton distance constraints with nuclear magnetic resonance. *J. Mol. Biol.* **169**, 949–961.
- Xu, W., S. Harrison, & M. Eck (1997). Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* **385**, 595–602.
- Yamazaki, T., J. D. Forman-Kay, & L. E. Kay (1993). Two-dimensional NMR experiments for correlating $^{13}\text{C}\beta$ and $^1\text{H}\delta/0$ chemical shifts of aromatic residues in ^{13}C -labeled proteins via scalar couplings. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 11054–11055.
- Yamazaki, T., W. Lee, C. Arrowsmith, D. Muhandiram, & L. Kay (1994). A suite of triple resonance NMR experiments for the backbone assignment of ^{15}N , ^{13}C , ^2H labeled proteins with high sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11655–11666.
- Yang, X. & D. Gabuzda (1999). Regulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by the ERK mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J. Virol.* **73**, 3460–3466.
- Young, M., S. Gonfloni, G. Superti-Furga, B. Roux, & J. Kuriyan (2001). Dynamic Coupling between the SH2 and SH3 domains of c-Src and Hck underlies their inactivation by C-terminal tyrosine phosphorylation. *Cell* **105**, 115–126.
- Yu, H., J. Chen, S. Feng, D. Dalgarno, A. Brauer, & S. Schreiber (1994). Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* **76**, 933–945.
- Yu, H., M. Rosen, T. Shin, C. Seidel-Dugan, J. Brugge, & S. Schreiber (1992). Solution structure of the SH3 domain of Src and identification of its ligand-binding site. *Science* **258**, 1665–1668.
- Zeeb, M. & J. Balbach (2004). Protein folding studied by real-time NMR spectroscopy. *Methods* **34**, 65–74.
- Zhang, H., R. Pomerantz, G. Dornadula, & Y. Sun (2000). Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is an integral component of an mRNP complex of viral RNA and could be involved in the viral RNA folding and packaging process. *J. Virol.* **74**, 8252–8261.
- Ziegler, S., J. Marth, D. Lewis, & R. Perlmutter (1987). Novel protein-tyrosine kinase gene (hck) preferentially expressed in cells of hematopoietic origin. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2276–2285.

Zuiderweg, E. R. & S. W. Fesik (1989). Heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy of the inflammatory protein C5a. *Biochemistry* **28**, 2387–2391.

Zwahlen, C., P. Legault, S. J. F. Vincent, J. Greenblatt, R. Konrat, & L. E. Kay (1997). Methods for measurement of intermolecular NOEs by multinuclear NMR spectroscopy: application to a bacteriophage λ N-peptide/*boxB* RNA complex. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 6711–6721.

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Dieter Willbold, der mir dieses Thema überlassen und mich bei meiner Arbeit betreut hat. Für die Hilfsbereitschaft, die vielen Anregungen, sein allzeit offenes Ohr und die guten Arbeitsbedingungen.

Prof. Dr. Georg Büldt und Dr. Jörg Fitter für die Aufnahme und Betreuung in den ersten Monaten meiner Zeit in Jülich.

Junior Prof. Dr. Matthias Stoldt für die Einführung in die NMR-Spektroskopie und seiner großen Hilfe bei der Aufnahme und Auswertung der Daten.

Dr. Silke Hoffmann für ihre Betreuung in der Thematik meiner Arbeit, für die zahlreichen Diskussionen und ihre stete Hilfsbereitschaft.

Dr. Thi Tuyen Tran für die gute Zusammenarbeit und die Vorarbeiten, die Sie zu diesem Thema geleistet hat.

Esther Jonas und Thi Tuyen Tran, die mir in meiner anfänglich unbeholfenen Zeit als Physiker im Labor kräftig unter die Arme gegriffen haben.

Dr. Thomas Stangler für seine Hilfsbereitschaft in allen Computer-Fragen.

Dr. Katja Wiesehan, Amine Aladag und Julian Glück für die Bereitstellung einiger ihrer Ergebnisse.

Meinen Zimmerkameraden Marc Wittlich, Sven Schünke, Dr. Andreas Eckhoff und Julian Glück für die gute Büroatmosphäre und das Ertragen meiner Launen.

Allen Arbeitskollegen für ihre Hilfsbereitschaft und die nette Atmosphäre in der Arbeitsgruppe.

Kathrin Schmitt, die mich während der stressigen Zeit unterstützt hat und viel Verständnis für meine langen Arbeitszeiten aufgebracht hat.

Marc Wittlich, der mit mir die Zeit des Studiums, der Diplomarbeit und der Dissertation "durchlitten" hat für die gute Zusammenarbeit und die Freundschaft, die während der letzten Jahre viel zu durchleiden hatte.

Meinen Geschwistern Sonja und Kerstin, die immer für mich da waren und Verständnis für meine Launen, Krisen und Probleme hatten.

Meinen Eltern, für ihre Unterstützung bei all meinen Entscheidungen. Für ihre Begleitung während meines bisherigen Lebensweges und ihr Verständnis für meine Sorgen und Probleme.

Dr. Karen Hänel, für die vielen Anregungen, Hilfestellungen, Diskussionen und Gespräche. Für ihr großes Verständnis, ihre Unterstützung und die oft dringend nötige Ablenkung, ohne die die letzte Phase der Arbeit kaum erträglich gewesen wäre. Dafür, dass Sie immer für mich da war.

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.

Jülich, den 12.05.2006