

# **Strukturelle Untersuchung der Interaktion zwischen HCV NS5A und Bin1**

Inaugural-Dissertation

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

Vorgelegt von

**Christina Winzösch**

aus Herdecke

Jülich, November 2014

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. Dieter Willbold

Koreferent: Prof. Dr. Henrike Heise

Tag der mündlichen Prüfung:

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Hepatitis C Virus (HCV)	1
1.1.1.	Aufbau von HCV	2
1.1.2.	Nicht-Strukturprotein 5A (NS5A)	3
1.1.3.	Intrinsisch ungefaltene Proteine und PxxP-Motive	5
1.1.4.	NS5A-bindende Proteine	6
1.2.	Bin1	7
1.3.	Bin1 SH3 und NS5A	9
1.4.	Kernresonanz (NMR)-Spektroskopie	11
1.5.	Zielsetzung der Arbeit	13
2.	Materialien	14
2.1.	Biochemikalien, Chemikalien und Kits	14
2.2.	Puffer und Lösungen	14
2.3.	Größenmarker	14
2.4.	Bakterienstämme	15
2.5.	Antibiotikastammlösungen	15
2.6.	Peptide	15
2.7.	Plasmide	16
2.8.	Enzyme und Proteine	16
2.9.	Chromatographien	19
2.10.	Geräte	19
2.11.	Datenbanken und Software	20
3.	Methoden	21
3.1.	Klonierung	21
3.1.1.	Produktion kompetenter Bakterienzellen	21
3.1.2.	Transformation von <i>E. coli</i>	21
3.1.3.	Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i> -Stämmen	21
3.2.	Proteinexpression	21
3.3.	Reinigung von rekombinant exprimierten Proteinen	23
3.3.1.	Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose	23
3.3.2.	Affinitätschromatographie an Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose	23
3.3.3.	Größenausschlusschromatographie	23
3.3.4.	Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3	24
3.3.5.	NS5A(333-369) und His-Ubiquitin	25
3.3.6.	NS5A(191-340)	25
3.3.7.	NS5A(191-447)	26
3.4.	SDS-PAGE nach Laemmli	27
3.5.	Proteinkonzentrationsbestimmung	28
3.6.	Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR)	28
3.6.1.	Kopplung von His-getaggetem Protein	29
3.6.2.	Bindungsstudien von Bin1 SH3 und NS5A(333-369)	30
3.6.3.	Datenprozessierung und -analyse	30
3.7.	Bio-Layer Interferometrie (BLI)	33
3.7.1.	Bindungsstudien von Bin1 SH3 und NS5A(333-369)	33
3.7.2.	Datenprozessierung und -analyse	34
3.8.	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)	34
3.8.1.	Bindungsstudien von Bin1 SH3 und NS5A-Konstrukten	34
3.8.2.	Datenprozessierung und -analyse	36
3.9.	Analytische Größenausschlusschromatographie	37
3.10.	Röntgenstrukturanalyse	37
3.10.1.	Proteinkristalle	37
3.10.2.	Diffraktionsaufnahme	39
3.10.3.	Auswertung der Diffraktionsdaten	40
3.11.	Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)	41

3.11.1.	Die chemische Verschiebung	42
3.11.2.	Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie	42
3.11.3.	Spektrrentypen und ihre Aussagen	43
3.11.4.	Probenvorbereitung und Messbedingungen	44
3.11.5.	NMR-Spektrometer	44
3.11.6.	NMR-Experimente	44
3.11.7.	Spektrenauswertung	47
3.11.8.	NMR-Titrationsen	47
3.11.9.	Bestimmung der Torsionswinkeleinschränkungen	49
3.11.10.	Strukturrechnung	50
4.	Ergebnisse	52
4.1.	Proteinexpression und Reinigung	52
4.1.1.	Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3	52
4.1.2.	NS5A(333-369)	54
4.1.3.	NS5A(191-340)	56
4.1.4.	NS5A(191-447)	57
4.2.	Charakterisierung der Interaktionen	59
4.2.1.	Bindungsstudien mit SPR	59
4.2.2.	Bindungsstudien mit BLI	68
4.2.3.	Bindungsstudien mit ITC	71
4.2.3.1.	NS5A(347-361)	72
4.2.3.2.	NS5A(341-361)	74
4.2.3.3.	NS5A(333-369)	76
4.2.3.4.	Auswertung der ITC-Messungen	77
4.2.4.	Analytische Größenausschlusschromatographie	79
4.3.	Röntgenstrukturanalyse	81
4.4.	Charakterisierung durch NMR-Titrationsen	85
4.4.1.	NMR-Titration von Bin1 (Tandem-)SH3 und NS5A(341-361)	85
4.4.2.	NMR-Titration von Bin1 Tandem-SH3 und NS5A(191-340)	88
4.4.3.	NMR-Titration von Bin1 Tandem-SH3 und NS5A(191-447)	91
4.5.	Strukturelle Charakterisierung mit NMR	92
4.5.1.	Zuordnung der Proteinerückgrad- und der Seitenkettenresonanzsignale	92
4.5.2.	Sekundärstrukturbestimmungen	98
4.5.3.	Protonen-Protonen-Abstände	101
4.5.4.	Strukturrechnung	105
5.	Diskussion	108
5.1.	Rekombinante Proteinexpression und Reinigung	108
5.1.1.	Expression und Reinigung von SH3-Domänen liefert ausreichende Menge Protein	108
5.1.2.	Erfolgreiche Expression und Reinigung von NS5A-Konstrukten	109
5.2.	Interaktionsstudien	109
5.2.1.	Bindemodi der Bin1 (Tandem-)SH3-Proteine	109
5.2.1.1.	Proteinkomplexe bei hohen lokalen Konzentrationen	112
5.2.1.2.	Akkumulation an biologischen Membranen	113
5.2.1.3.	Bedeutung der Interaktion des dimerisierten Bin1 mit NS5A	115
5.2.2.	Zweizustandsreaktionen der ITC-Experimente	116
5.2.2.1.	Der multivalente Komplex des Bin1 Tandem-SH3 mit ITC	118
5.2.2.2.	Affinitäten der einzelnen PxxP-Motive	118
5.2.2.3.	Interaktion mit zwei distinkten PxxP-Motiven	119
5.2.3.	Größenausschlusschromatographie	121
5.2.4.	Untersuchung der Bindestellen mit NMR	122
5.2.4.1.	Die kanonischen Bindestellen	122
5.2.4.2.	Untersuchung nicht-kanonischer Bindestellen mit NMR	123
5.2.4.3.	Die Selektivität von SH3-Domänen	127
5.3.	Strukturelle Charakterisierung	129
5.3.1.	Kristallisation einer SH3-Domäne	129

5.3.2.	Die globale Struktur von Bin1 Tandem-SH3 mit NMR	131
5.3.3.	Bin1 Tandem-SH3 und Bin1 SH3 im Vergleich	132
5.3.4.	Der Komplex Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361)	133
5.3.5.	Vergleich der apo- und holo-Formen von Bin1 Tandem-SH3	136
5.3.6.	Röntgenkristallographie- und NMR-Strukturen	139
5.3.7.	Vergleich zu anderen Strukturen	140
5.4.	Ausblick	142
5.5.	Zusammenfassung	143
5.6.	Summary	144
6.	Literatur	145
7.	Anhang	156
7.1.	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole	156
7.2.	Weitere experimentelle Daten	158
7.2.1.	ITC	158
7.2.2.	NMR-Zuordnung	165
7.3.	Abbildungsverzeichnis	174
7.4.	Tabellenverzeichnis	176
7.5.	Liste der wissenschaftlichen Publikationen, Poster und Vorträge	177
7.6.	Danksagung	178
7.7.	Eidesstattliche Erklärung	179

# 1. Einleitung

## 1.1. Hepatitis C Virus (HCV)

Die Familie der Flaviviridae enthält mehrere RNA-Viren, darunter das Hepatitis C Virus, HCV, das West Nil-Virus, und das Dengue Virus, und wird unterteilt in u. a. Hepacivirus, Flavivirus und Pestivirus. Allen gemein ist die mögliche gelbliche Verfärbung der Haut nach einer Infektion als Namensgeber der Flaviviridae. Bei HCV handelt es sich um den einzigen Vertreter aus der Gruppe der Hepaciviren. Weltweit sind etwa 170 Millionen Menschen, das entspricht ca. 3 % der Weltbevölkerung, mit HCV infiziert (WHO 2003). Da kein Impfstoff zur aktiven Immunisierung gegen HCV zugelassen ist (Halliday *et al.* 2011), muss eine Exposition zu infiziertem Blut verhindert werden. Eine Infektion verläuft zunächst symptomarm, dabei befallen die Viren primär Hepatozyten und sekundär verschiedene lymphatische Zellen (Hiasa *et al.* 1998). Sie wird allerdings in etwa 80 % der Fälle chronisch (Nelson *et al.* 2011), was über einen Zeitraum von 20-30 Jahren in 10-20 % der Fälle zu Leberzirrhosen und in 1-5 % zu Leberkarzinomen führen kann (Rosen 2011). Aufgrund der Fallzahl wurde HCV als Onkovirus klassifiziert, der zusammen mit dem Hepatitis B Virus, 4,9 % aller menschlicher Karzinome verursacht (Parkin 2006).

Eine Behandlung der Patienten erweist sich als schwierig, da die Genome der HCV-Isolate divergieren. Es existieren weltweit sechs Genotypen mit unterschiedlichen Verbreitungsregionen (Simmonds 1999), die weiter in Subtypen unterteilt werden. Die Genotypen divergieren in bis zu 30-35 % der Nukleotide über das gesamte Genom, während sich die Subtypen in 20-25 % unterscheiden. Diese genomischen Unterschiede werden durch die RNA-Polymerase, die keine Korrekturlesefunktion besitzt, mit einer Mutationsrate von  $10^{-5}$ - $10^{-4}$  pro Nukleotid, verursacht. Selbst während eines Krankheitsverlaufs kann es zur Ausbildung von Quasispezies kommen (Bartenschlager *et al.* 2000). Wegen der hohen Virusvariabilität, ähnlich dem humanen Immunschwächevirus, HIV, erfolgt eine Immunevasion, sodass eine Therapie zusätzlich erschwert wird. So greift die Standardtherapie mit Interferon  $\alpha$ , IFN $\alpha$ , und dem Virostatikum Ribavirin besser im Fall einer HCV-Infektion mit den Genotypen 2 und 3 als mit Genotyp 1 (Poynard *et al.* 2003, Wilkins *et al.* 2010). Inzwischen wird die Therapie den viralen und Wirtsgegebenheiten angepasst. Proteaseinhibitoren Telaprevir und Boceprevir wurden 2011 in Kombination mit den vorhergenannten zur Behandlung von Genotyp 1 zugelassen (Foote *et al.* 2011, Smith *et al.* 2011). Wegen der Nebenwirkungen von IFN $\alpha$ , u. a. grippale Symptome und Depression (Wilkins *et al.* 2010), wurde auch an Interferon-freien Therapien geforscht. Fortschritte hinsichtlich des Verständnisses des HCV-Zellzyklusses beschleunigten die Herstellung von „direct-acting antiviral agents“, DAAs, die auf spezifische Proteine der Replikation wie den Proteasen oder der Polymerase zielen. Unter Verwendung von Asunaprevir und Daclatasavir wurde die Therapiezeit verkürzt (Lok *et al.* 2012, Gentile *et al.* 2014, Hézode *et al.* 2014). Weitere Medikamente kamen unter dem Namen Sofosbuvir (De Clercq 2013, Liang *et al.* 2013), Ledipasvir (De Clercq 2013) oder Simeprevir (Bunchorntavakul *et al.* 2013) auf den Markt. Durch Kombination dieser Präparate ist seit kürzerer Zeit auch die Behandlung schwer-therapierbarer HCV-Patienten möglich.

### 1.1.1. Aufbau von HCV

Ein Hepatitis C Virion besteht aus einem einzelsträngigen RNA-Molekül positiver Polarität, das von Kernproteinen umgeben ist und damit ein Nukleokapsid bildet. Virionen enthalten auf der Lipidmembran, die das Nukleokapsid umschließt, die beiden glykosylierten „envelope proteins“ E1 und E2. Zum Viruseintritt in die Zelle findet eine Wechselwirkung zwischen viralen und Wirtsoberflächenproteinen, z. B. CD81 oder LDL-Rezeptor, statt (Bartenschlager et al. 2000). Durch eine Rezeptor-vermittelte Endozytose und Fusion mit der Zellmembran gelangt das Nukleokapsid ins Zytoplasma, und der Virus übernimmt den Wirtsstoffwechsel (Lindenbach et al. 2005).

Das virale Genom wird flankiert von zwei nicht-translatierten Regionen, „untranslated regions“, UTR. Die ca. 340 Nukleotide umfassende UTR am 5'-Ende des Genoms ist hochkonserviert und die 3'-UTR besteht aus einer variablen Sequenz, einem Poly-Uracil-Trakt variabler Länge und einer hochkonservierten Sequenz, die essentiell für die Replikation ist. Die HCV-Translation wird durch Wechselwirkung der 5'-UTR mit einem Teil der Kernkodierenden Region initiiert und dient als interne ribosomale Eintrittsstelle, IRES, der 40S ribosomalen Untereinheit ohne kanonische Translationsinitiationsfaktoren (Lemon et al. 1997). Die virale RNA mit 9094-9111 Nukleotiden – je nach Genotyp – wird durch den Viruswirt in ca. 3010 Aminosäuren translatiert. Das entstandene Polyprotein wird hydrolytisch in elf Proteine gespalten, dazu gehören das Kernprotein, E1 und E2, das Protein p7, die Nicht-Strukturproteine wie die Protease NS2-3, die Serinproteasen NS3 und NS4A, NS4B und NS5A sowie die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B. Das sogenannte Protein F wird durch einen Versatz des offenen Leserasters in der Kernkodierenden Region translatiert (Xu et al. 2003). Ein Überblick über die virale Genomorganisation und die daraus resultierenden Proteine ist in Abbildung 1 gezeigt.

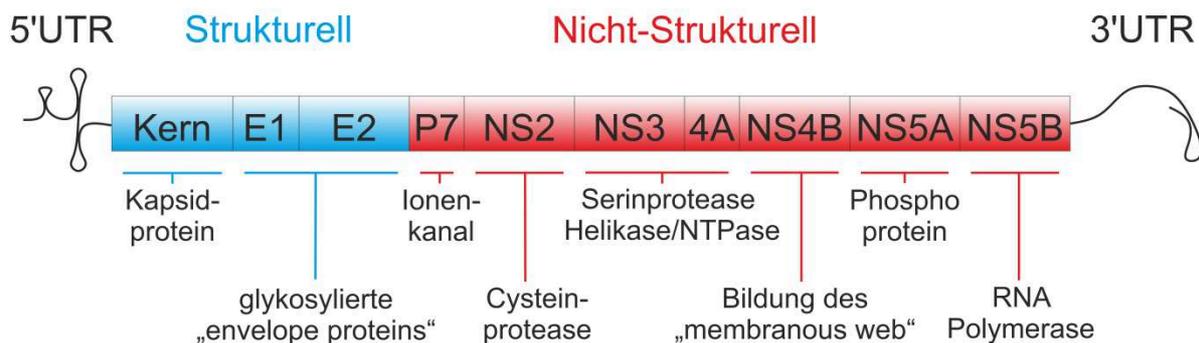


Abbildung 1. Genomorganisation vom Hepatitis C Virus.

Die Übersicht zeigt N-terminal die 5'UTR-IRES und C-terminal die 3'UTR. Dazwischen liegen die proteinkodierenden Bereiche für die Strukturproteine: Kernprotein, „envelope proteins“ E1 und E2 und die Nicht-Strukturproteine, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B. Abbildung modifiziert nach (Villani et al. 2013)

Das Kernprotein assembliert die virale RNA zum Nukleokapsid und fördert die Knospung der Virionen. Die beiden Proteine E1 und E2 bilden ein Heterodimer, das an der Bindung des Virus an Wirtszellen, der darauffolgenden Clathrin-abhängigen Endozytose und der Fusion

mit Wirtsmembranen involviert ist. Das Protein p7 ist ein heptamerer Ionenkanal, Viroporin, der durch das Medikament Amantadine an seiner Rolle bei der Infektion blockiert wird. Die Zink-abhängige Cysteinprotease NS2-3 spaltet sich selbst autokatalytisch in NS2 und NS3. Daraufhin ist NS3 wirksam als Serinprotease, NTPase und RNA-Helikase. In Assoziation mit NS4A hydrolysiert NS3 die Bindungen NS3-NS4A, NS4A-NS4B, NS4B-NS5A und NS5A-NS5B. NS4B induziert eine Membranveränderung am endoplasmatischen Retikulum, ER, dem Replikationsort, um ein Gerüst für die virale Replikation zu generieren. Diese Membranveränderung wird als „membranous web“ bezeichnet (Egger et al. 2002). NS5B ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, die zur Bildung neuer positiv-strängiger RNA-Moleküle beiträgt. Eine herausragende Rolle in der Persistenz des Virus nimmt NS5A ein. Eine Mutation im Protein NS5A erhöht zum Beispiel die Ausbildung einer Resistenz gegen das Medikament und Replikationshemmer Cyclosporin A (Arai et al. 2014) und NS5A blockiert in der Therapie die durch IFN $\alpha$  verringerte virale Translation (Bartenschlager et al. 2000).

### 1.1.2. Nicht-Strukturprotein 5A (NS5A)

Die meisten Proteine des HCV sind Membranproteine, die am ER des Wirts lokalisiert sind. Darunter fallen u. a. die Nicht-Strukturproteine. NS5A ist nach Prozessierung mittels NS3-Protease ein peripheres Membranprotein mit 447 Aminosäuren. Die N-terminale, amphipathische Helix fungiert als Membrananker am ER und an „lipid droplets“ (Elazar et al. 2003). Das Protein kann zusätzlich in drei Domänen unterteilt werden, s. Abbildung 2A. Die Domäne I ist zum Homodimer gefaltet, wobei konträre Anordnungen der beiden Domänen kristallisiert wurden (Tellinghuisen et al. 2005, Love et al. 2009). Diese Domäne komplexiert Zink-Ionen (Tellinghuisen et al. 2004) und enthält eine putative RNA-Bindestelle. Die zweizählige Symmetrie einiger DAAs wie Daclatasvir bezeugt, dass sie an ein NS5A-Dimer binden. Zwischen jeder Domäne liegen Regionen mit anormaler Aminosäureverteilung, die als „low-complexity sequence“, LCS, Regionen bezeichnet werden. Die beiden C-terminalen Domänen II und III sind intrinsisch ungefalteten. In den intrinsisch ungefalteten Sequenzen treten jedoch vier Regionen mit  $\alpha$ -helikaler Neigung auf: drei in LCS I und Domäne II zwischen den Aminosäureresten 205-221; 251-266 und 292-306 (Feuerstein et al. 2012b) und eine in Domäne III bei den Aminosäureresten 368-379 (Hanouille et al. 2009). Proteine, die LCS-Regionen enthalten, tendieren dazu, an eine größere Vielzahl von Proteinen zu binden als solche ohne LCS (Coletta et al. 2010). In der LCS II liegt außerdem eine polyprolinreiche Region, PPR. Gezielt wird auf diese Region im nächsten Kapitel eingegangen.

Positiv-strängige RNA-Viren replizieren typischerweise in der Nähe ihrer Wirtsmembranen. Da NS5A Teil des Replikationskomplexes ist, ist NS5A auch an diesen intrazellulären Membranen, dem „membranous web“, zu finden. Leberbiopsien und Hepatozyten in Zellkultur zeigen, dass NS5A im Zytoplasma, der peripheren Membranfraktion und an der ER/Golgi-Membran lokalisiert ist (Tanji et al. 1995a, Polyak et al. 1999). In Huh-7, Leberkarzinomzellen, kolokalisierte NS5A an den Kernproteinen zur viralen Assemblierung (Gawlik et al. 2014) und am humanen Apolipoprotein A1 an der Oberfläche dieser

Membranen (Shi et al. 2002). Mit Hilfe der RNA-Bindestelle bringt NS5A den Replikationskomplex zu Vesikeln (Huang et al. 2005).

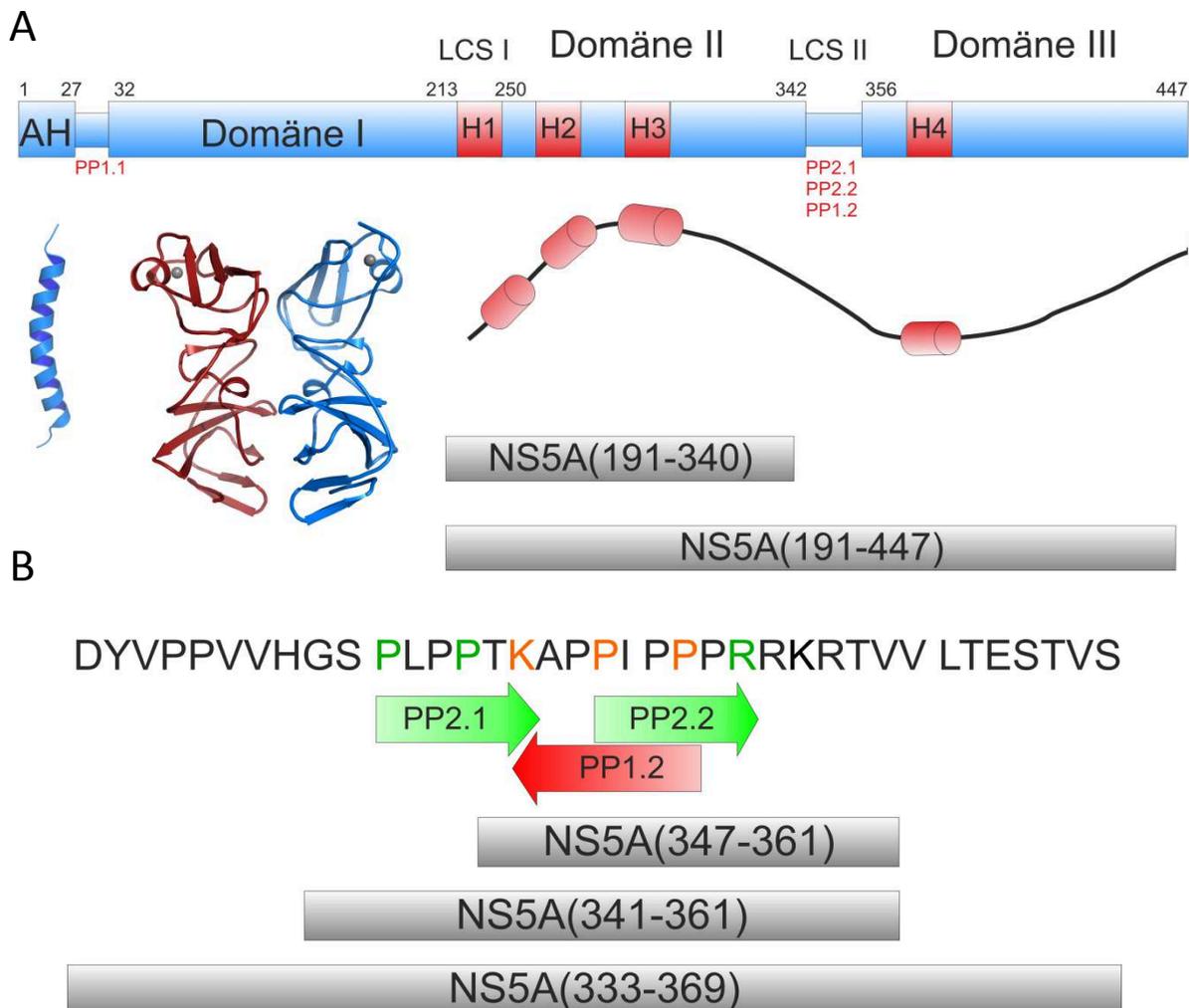


Abbildung 2. Domänenorganisation von NS5A vom Genotyp 1b.

A. Die Aminosäurereste 1-27 bilden eine amphipatische Helix, AH, anschließend folgt das erste PxxP-Motiv PP1.1 in der Domäne I (1-213), die LCS I (213-250), Domäne II (250-342), LCS II (342-356) mit den drei PxxP-Motiven PP2.1, PP2.2 und PP1.2 (343-361) und C-terminal die Domäne III (356-447). Bereiche mit  $\alpha$ -helikaler Neigung sind durchnummeriert mit H1 (205-221), H2 (251-266) und H3 (292-306) sowie H4 (368-379). Das spiegelt sich in der unstrukturierten Aminosäurekette links unten mit den vier Zylindern als Helices wider. Die Strukturen sind aus den PDB-Daten 1R7C (Penin *et al.* 2004) und 3FQM (Love *et al.* 2009). Zwei der in dieser Arbeit verwendeten NS5A-Konstrukte NS5A(191-340) und NS5A(191-447) tragen die Motive, die aus dem darüberstehenden Schema ersichtlich sind.

B. Die drei PxxP-Motive sind farbig markiert, die der Klasse II sind grün unterlegt, die der Klasse I ist rot. Dargestellt sind auch drei in der Arbeit verwendete NS5A-Konstrukte mit ihren Sequenznummern. NS5A(347-361) beinhaltet die beiden C-terminalen PxxP-Motive PP1.2 und PP2.2. Die beiden unteren Konstrukte enthalten alle drei PxxP-Motive, PP2.1, PP1.2 und PP2.2.

NS5A spielt eine wichtige Rolle bei der Replikation und Assemblierung neuer Virionen, deshalb handelt es sich bei NS5A um ein favorisiertes Studienobjekt. Neben diesen für das Virus an sich wichtigen Effekten, werden noch weitere Bereiche des Wirtsmetabolismus verändert. Einige Viren, wie das humane Zytomegalovirus, Herpes Viren und HCV,

programmieren den zellulären Metabolismus um, um ihre Replikation zu ermöglichen. Dabei werden von HCV die Glykolyse und die Fettsäuresynthese besonders in Hepatozyten beeinträchtigt. Die NS5A-Expression korreliert mit einer Aktivierung der zellulären Hexokinase 2, dem ersten ratenbestimmenden Enzym der Glykolyse, zusammen mit vermehrtem Glukosekonsum und Laktatsekretion (Ramière et al. 2014).

Innerhalb der Familie der Flaviviridae zeigen alle NS5A-Proteine die Eigenschaft zur Phosphorylierung. HCV NS5A kommt in zweierlei Formen vor (Tanji et al. 1995b). Die basal-phosphorylierte Form von NS5A, auch p56 genannt, hemmt die virale Replikation. Die hyperphosphorylierte Form, p58, existiert in der Zelle in ähnlichen Konzentrationen wie p56, benötigt jedoch zur Bildung zusätzlich humane Proteine und NS4A. Schon früh wurde erkannt, dass die einzelsträngige RNA-abhängige Proteinkinase, PKR, von NS5A inhibiert wird und somit das Virus Interferon-resistent wird (Gale Jr et al. 1997). Weitere Kinasen, die zur optimalen Replikation für die Phosphorylierung von NS5A nötig sind, sind die beiden Serin/Threonin-Kinasen „large tumor suppressor homolog“ LATS1 und LATS2 (Meistermann et al. 2014). Andere Kinasen wie Casein Kinase I- $\alpha$ , CKI- $\alpha$ , führen zur Hyperphosphorylierung und anschließend zur Anlagerung von NS5A an Membranstrukturen und somit zur infektiösen Virusproduktion (Masaki et al. 2014). Die Proteinkinase A, PKA, phosphoryliert in der LCS II, genauer gesagt in der PPR Region, das Threonin 360. Dessen Mutation hat empfindliche Auswirkungen auf die Replikation, da es als Alanin zu einer Reduktion der RNA-Menge führt, während die Substitution zu Glutamat letal wirkt (Cordek et al. 2014). Somit zeigen die beiden intrinsisch ungefalteten Domänen II und III mit ihren Phosphorylierungsstellen und besonders die PPR Region interessante Eigenschaften, die weiter charakterisiert werden sollen.

### 1.1.3. Intrinsisch ungefalteten Proteine und PxxP-Motive

Auch das humane Proteom enthält eine Vielzahl intrinsisch ungefalteter Proteine, „intrinsic disordered proteins“ IDPs. Sie sind eine Klasse hochgradig dynamischer Proteine, die biologische Aktivität zeigen ohne Tertiärstrukturelemente. Lediglich transiente Sekundärstrukturelemente sind präsent, die meist erst durch Bindung induziert werden (Dyson et al. 2005). Diese Flexibilität bewirkt einen großen Interaktionsradius, was zur Idee des „fly casting“-Mechanismus führte (Shoemaker et al. 2000). Dabei assoziiert das IDP zunächst schwach und nähert sich anschließend der eigentlichen Bindestelle. Kinetisch bewirkt dieser Mechanismus höhere Assoziations- und Dissoziationsraten als bei gefalteten Proteinen mit klassischen Bindeeigenschaften. Die Diversität wird durch die, den intrinsisch-ungefalteten Regionen nahestehenden, Domänen mit koordinierenden, stabilisierenden oder katalytischen Aktivitäten unterstrichen (Dyson et al. 2005).

Innerhalb der IDPs ist der Anteil der Aminosäure Prolin besonders hoch, daher kommen dort auch PPR Regionen und PxxP-Motive vor. Grundsätzlich unterscheiden sich PxxP-Motive anhand ihrer Orientierung. Auf der einen Seite sind die sogenannte Klasse I-Motive mit der Konsensussequenz K/RxxPxxP, wobei P für Prolin, x für jede beliebige Aminosäure steht, und N-terminal ein basischer Ankerrest Lysin oder Arginin für eine Selektivität sorgt. Auf der anderen Seite gibt es die Klasse II-Motive mit der Sequenz PxxPxR/K. NS5A besitzt vier

dieser Motive: PP1.1 und PP1.2 für die beiden Klasse I-Motive und PP2.1 und PP2.2 für die Klasse II-Motive, wobei PP als Abkürzung von PxxP-Motiv steht (Macdonald et al. 2004), s. Abbildung 2B. Besonders die PxxP-Motive in der LCS II sind an Interaktionen zu zellulären Proteinen beteiligt. Dabei ist das N-terminale PxxP-Motiv PP2.1 lediglich in Genotyp 1-Isolaten konserviert, während das C-terminale PP2.2 in allen Isolaten vorkommt. Es konnte durch Mutationsstudien gezeigt werden, dass das PP2.2-Motiv zur Replikation des Genotyps 1 unwichtig ist und dafür das PP2.1 diese Rolle übernimmt (Hughes et al. 2009). Zudem sind PxxP-Motive der Klasse II oft neben Phosphorylierungsstellen lokalisiert, sodass Kinasen die Spezifität und Avidität der Bindung einstellen und unterschiedliche Phosphorylierungszustände das Substratspektrum regulieren.

#### 1.1.4. NS5A-bindende Proteine

Neben den schon beschriebenen Proteinkinasen existieren viele weitere humane Proteine, die mit NS5A interagieren. NS5A interagiert mit 20 % des gesamten Interaktoms von HCV, deswegen hat NS5A eine herausragende Rolle für die HCV-Persistenz in der Leber (de Chasse et al. 2008). Um persistierende Infektionen zu etablieren, haben Viren Mechanismen entwickelt, die das Zellwachstum verändern. Zur Signalübertragung für diese Prozesse dienen mitogenaktivierte Proteinkinasen, MAPK. Von zentraler Bedeutung ist die Bindung von NS5A an die Src-Homologie 3, SH3,-Domäne des „growth factor receptor-bound protein 2“, Grb2, ein Wachstumsfaktor, der den MAPK-Stoffwechselweg und damit die zelluläre Genexpression beeinflusst (Tan et al. 1999).

Außerdem spielt, neben NS3, NS5A eine wichtige Rolle bei der Apoptose, dem gerichteten Zelltod. Die Apoptose ist ein Prozess zur Bekämpfung einer viralen Infektion, bei dem virusinfizierte Zellen eliminiert werden. Viele Viren haben Mechanismen entwickelt, um dieser Abwehr zu entgehen und im Wirt zu überdauern. NS5A interagiert mit dem „tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein-fas-associated protein with death domain“, TRADD-FADD, Signalkomplex und inhibiert die „tumor necrosis factor“, TNF,-abhängige Apoptose (Majumder et al. 2002). Hingegen kann NS5A eine Apoptose, die über den Fas-Liganden eingeleitet wird, nicht verhindern. NS5A und NS3 interagieren unterschiedlich mit dem Tumorsuppressorgen p53 und erniedrigen die p53-Genexpression in subgenomischen HCV-Replikons der Huh-7-Zellen (Sabri et al. 2014).

Zentrale Bedeutung haben Protein-Protein-Interaktionen an konservierten, nicht-katalytischen Domänen wie den Src-Homologie Regionen 2 und 3, SH2 bzw. SH3 (Mayer et al. 1993). Diese Domänen werden häufig zusammen mit Effektordomänen exprimiert, die den Wirtsstoffwechsel in Hinsicht der Lokalisierung zytoplasmatischer Proteine, GTPasen-Regulierung oder Rezeptorsignalvermittlung beeinflussen. SH3-Domänen binden bevorzugt an die PxxP-Motive. Durch die Bindung von NS5A an die SH3-Domänen von Hck, Lyn und Lck werden diese Proteine inhibiert, während Fyn aktiviert wird (Macdonald et al. 2005, Shelton et al. 2008). Ebenso ist die Orientierung der PxxP-Motive auf diesen SH3-Domänen unterschiedlich: SH3-Domänen von Abl, Src, Fyn, Lyn und Hck bevorzugen Klasse I-PxxP-Motive, während Grb2, Crk, Nck bevorzugt die Klasse II-Orientierung binden (Alexandropoulos et al. 1995). Verschiedene virale Proteine nutzen die Divergenz der SH3-

Domänen und ihrer Effektor-domänen aus und binden diese. Auch das IDP Nef des HIV-1 bindet an Fyn SH3, bildet durch die Bindung eine linksgängige Polyprolinhelix und bewirkt eine Veränderung der T-Zellantwort (Arold et al. 1997). Die Fyn Tyrosinkinase mit ihrer SH3-Domäne bildet ebenso einen Komplex mit einem NS5A-Peptid, das PP2.2 umfasst (Martin-Garcia et al. 2012).

Weitere humane Proteine, die mit NS5A an der polyprolinreichen Region interagieren, besitzen ebenfalls eine SH3-Domäne (Nanda et al. 2006). Das „bridging integrator protein 1“, Bin1, das auch Amphiphysin II genannt wird, beeinflusst unterschiedliche Aspekte in der viralen HCV-Infektion, die im nächsten Kapitel näher erläutert werden (Zech et al. 2003, Nanda et al. 2006).

## 1.2. Bin1

Bin1 gehört zur Bin-amphiphysin-Rvs, BAR, -Familie und kodiert mittels alternativem Spleißen für mindestens sieben unterschiedliche Isoformen (Wechsler-Reya et al. 1997). Das Gen wird ubiquitär bzw. als spezifische Isoform im zentralen Nervensystem und in Muskeln exprimiert. Das Protein ist nukleozytoplasmatisch und enthält die N-terminale BAR-Domäne, eine Myelocytomatose, Myc, Bindedomäne, MBD, und C-terminal eine SH3-Domäne, s. Abbildung 3. Sowohl die BAR-Domäne (Casal et al. 2006) als auch die ungefalteten MBD und die globuläre SH3-Domäne (Pineda-Lucena et al. 2001) sind strukturell aufgeklärt. Die Isoformen unterscheiden sich in den mittleren Bereichen durch die Bindestellen für Phosphoinositol, PI, und Clathrin-AP2, CLAP.

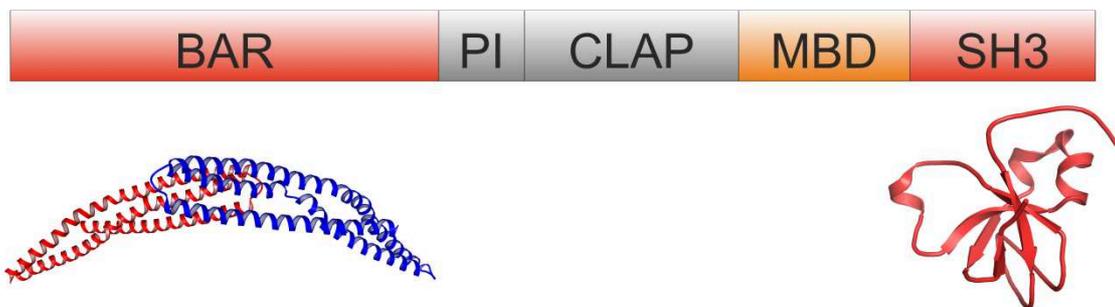


Abbildung 3. Domänenorganisation von Bin1.

Das Bin1-Protein besteht aus folgenden Domänen: homodimerisierender Bin-amphiphysin-Rvs (BAR), Phosphoinositidbindestelle (PI), Clathrinbindestelle (CLAP), Myelocytomatosebindedomäne (MBD) und Src-Homology 3 (SH3). Die beiden Strukturen sind den PDB-Dateien 2FIC (Casal *et al.* 2006) und 1MUZ (Pineda-Lucena *et al.* 2005) entnommen.

Proteine, die Membrankrümmung hervorrufen, zeigen divergente Ladungen und Formen, z. B. haben die IM-Domänen eine konvexe Krümmung, die Bro-1-Domänen sind positiv-geladen mit konvexem Profil und die N-BAR-Domänen sind positiv-geladen mit konkaver Form (Cory et al. 2007). So ist auch die BAR-Domäne von Bin1 involviert in Membrankrümmung und Umgestaltung. Zur Ausübung dieser Funktion werden zwei BAR-

Domänen als Homo- oder Heterodimer assoziiert, die sich durch ihre flexible, linksgängige „coiled-coil“-Faltung auszeichnen und deren beide N-terminale, amphipathische Helices die Membrankrümmung initiieren (Casal et al. 2006, Ren et al. 2006). Damit generiert Bin1 mit Hilfe der membrankrümmenden Eigenschaften der BAR-Domänen aus planaren Membranen Tubuli. Schon früh wurde festgestellt, dass Bin1 an der Rezeptor-vermittelten Endozytose durch Rekrutierung von Dynamin mitwirkt und sich mit frühen Phagosomen assoziiert (Leprince et al. 1997). Folglich wird durch Verlust von Bin1-Expression Phagozytose in der Phase der Membranerweiterung um die gebundenen Partikel verhindert. Bin1 bekommt eine wichtige Rolle bei der Wirtsantwort auf Infektionen im Allgemeinen (Gold et al. 2000) und Viren im Speziellen zugeschrieben (Neuvonen et al. 2011).

Eine zusätzliche Funktion von Bin1 in der Zelle wird durch zweierlei Mechanismen beeinflusst: Myc-unabhängige und Myc-abhängige Zellproliferation. Auf der einen Seite wird Bin1 durch den E2F1-Zellzyklusinitiator und Transkriptionsfaktor aktiviert und bedingt eine E2F1-abhängige Apoptose bei DNA-Schädigung (Cassimere et al. 2009). Auf der anderen Seite inhibiert der Transkriptionsfaktor Myc die Transaktivierung von Bin1 und beeinflusst seinerseits Zellproliferation und Apoptose. Bin1 ist somit ein Myc-interagierendes Adaptorprotein mit Tumorsuppressor-Eigenschaften. Die MBD wurde zunächst als die wichtige Bindestelle des Proteins Myc lokalisiert (Sakamuro et al. 1996). NMR und „pull-down assays“ identifizierten allerdings eine weitere, kritischere Myc-Bindestelle auf der SH3-Domäne (Pineda-Lucena et al. 2005). Ein konserviertes Klasse II-PxxP-Motiv liegt in der MB1-Domäne von Myc, das im Verlauf des Zellzyklus unterschiedlich phosphoryliert wird und die Bindeeigenschaften steuert. Das intrinsische PxxP-Motiv von Bin1 in Exon 12A kann Myc intern verdrängen und somit zur Ausbildung von Tumoren und Apoptose bei Fehlfunktion beitragen (Pineda-Lucena et al. 2005). Auch konnte gezeigt werden, dass Myc von NS5A *in vitro* verdrängt werden kann (Aladag et al. 2014). Ohne Bin1-Expression entstehen bösartige Tumore z. B. Brustkarzinome (Ge et al. 2000). Auch Stoppmutationen in der SH3-Domäne an den Positionen D573 oder K575 führen entweder zu mentaler Retardierung, Muskelschwäche oder verringerter Dynaminbindung (Bohm et al. 2010). Zusammenfassend bewirkt Bin1 bei Fehlfunktion myotonische Dystrophie oder zentronukleäre Myopathie. Bei Herunterregulation bewirkt es Tumorgenese und Kardiomyopathie und bei Hochregulation entwickelt sich eine erhöhte Suszeptibilität für Alzheimer (Prokic et al. 2014).

Die Bin1-Expression im Gehirn von Alzheimer-Patienten ist verstärkt und Tau und Bin1 kolokalisieren in humanen Neuroblastomazellen und in Mäusegehirnen (Chapuis et al. 2013). Da Alzheimer die häufigste Form der Demenz einer älter-werdenden Gesellschaft ist und zusätzlich diskutiert wird, ob nicht die genetische Disposition ein Hauptrisikofaktor ist, wurden Patienten hinsichtlich Polymorphismen in den Allelen von Bin1 untersucht. In „late onset Alzheimer disease“, LOAD, werden Polymorphismen in Bin1 als zweitwichtigster Risikolokus nachgewiesen, allerdings sind die Ursachen der LOAD nicht vollständig verstanden (Ghahesouran et al. 2014). Dabei ist Bin1 involviert im Metabolismus vom „amyloid precursor protein“, APP, zu den beiden Hauptverursachern der Alzheimer Krankheit A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 wegen seiner Rolle in der Endozytose (Lambert et al. 2011). Es wird diskutiert, ob sich Bin1 als Biomarker zur Alzheimer-Diagnose eignet (Sun et al. 2013).

### 1.3. Bin1 SH3 und NS5A

Die hohe Affinität von NS5A an Bin1 SH3 resultiert aus mehreren Eigenschaften beider Proteine. Erstens ist die Oberfläche der Bindetasche von Bin1 SH3 in Bezug zu anderen SH3-Domänen hauptsächlich negativ geladen (Owen et al. 1998), darum werden bevorzugt PPR-Regionen mit positiv-geladenen Aminosäuren gebunden. Die kanonische Bindestelle von NS5A, die PPR Region in der LCS II, besteht aus fünf basischen Aminosäureresten, darum ist die Interaktion von Bin1 SH3 und NS5A hoch affin. Zweitens ist die Bindestelle auf der SH3-Domäne reich an aromatischen Seitenketten (Larson et al. 2000), deshalb werden bevorzugt hydrophobe oder  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen eingegangen. Dabei wird die PPR-Region von NS5A mit acht Prolin-, Alanin-, Leucin- und Isoleucinresten favorisiert. Drittens zeichnet sich die Variabilität zwischen den SH3-Domänen mit ihrer Identität von 15-45 % durch die Längen der N-Src und distalen Schleifen aus. Die Bin1 SH3 sticht mit ihrer Länge der distalen Schleife von dreizehn Aminosäureresten und der Länge der N-Src-Schleife mit elf Aminosäureresten heraus, sodass Bin1 SH3 ein größeres Ligandspektrum aufweisen könnte.

NMR-Titrations mit einem NS5A-Konstrukt, das die LCS I, die Domäne I und die LCS II enthält, und Bin1 SH3 zeigen, dass nach Sättigung der PPR-Region noch weitere Aminosäurereste des NS5A gebunden werden (Feuerstein et al. 2012b). Die Aminosäurereste 200-228 und 295-320 von NS5A werden zusätzlich durch Bindung von Bin1 SH3 beeinflusst. Diese Positionen korrelieren mit den transienten Helices H1 und H3. Sie weisen mit den Sequenzen  $D_{205}PSHITAETAKRRLARG_{221}$  der H1 und  $D_{292}EREISVAAEILRKS_{306}$  der H3 von der kanonischen Bindestelle abweichende Motive auf. Durch die Bindung von Bin1 SH3 bilden sich ihre transienten  $\alpha$ -helikalen Strukturen zurück, sodass ein sogenannter „fuzzy complex“ entsteht. Unter Verwendung kürzerer Konstrukte, die lediglich LCS I und Domäne I oder die exakten Bindestellen enthalten, werden die vorangegangenen Experimente bestätigt (Schwarten et al. 2013). Diese beiden nicht-kanonischen Bindestellen mit mikromolaren Affinitäten weisen niedrigere Affinitäten als die kanonischen Bindestellen, die Affinitäten im submikromolaren Bereich haben, auf, jedoch stellte sich Bin1 SH3 als die Domäne mit der höchsten Affinität der untersuchten SH3-Domänen heraus (Schwarten et al. 2013).

Die Eigenschaft der SH3-Domänen auch an andere Motive abseits des PxxP-Motiv zu binden, lässt sich z. B. auch bei der „epidermal growth factor pathway substrate 8“, Eps8 L1 SH3-Domäne finden (Aitio et al. 2008). Diese SH3-Domäne kann zusätzlich an das Motiv PxxDY des Interaktionspartners CD3 $\epsilon$  binden. Dieses Peptid hat der Struktur zu Folge eine Klasse II-Orientierung und bildet jedoch nicht die erwartete Polyprolin II-Helix, eine linksgängige Helix aus. Zusätzlich kann auch eine Salzbrücke abseits des üblicherweise verwendeten basischen Ankerrests der PxxP-Motive gefunden werden.

Ein zusätzlicher Aspekt von Bin1 ist die Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren zwischen zwei Bin1-Molekülen oder deren verwandten BAR-Domänen wie Amphiphysin I. Verschiedene Ansätze wie Fluoreszenzmessungen, Kristallisation, EPR oder Molekulardynamik wurden zur Analyse gewählt (Blood et al. 2006, Gallop et al. 2006, Capraro et al. 2013). Es wurde zunächst eine Dissoziationskonstante von  $K_D=10 \mu\text{M}$  ermittelt,

die durch weitere Experimente auf  $K_D=12$  nM erniedrigt wurde. Diese hohe Affinität würde ausreichen, um eine Präsenz von Homodimeren zu erklären. Dazu muss beachtet werden, dass zwar die totale Konzentration von Bin1 in einer Zelle  $c\sim 0,1$   $\mu\text{M}$  ist, allerdings die Proteine an Membranen bei  $c\sim 1$   $\mu\text{M}$  konzentrierter vorliegen. Außerdem gibt es Belege von Oligomeren höherer Ordnung bei höheren Proteinkonzentrationen. Somit kann aus allen Parametern geschlussfolgert werden, dass Homodimere *in vivo* präsent sind.

Dieser Aspekt wird gestützt durch die Bindung mehrerer Bin1 SH3-Moleküle an Dynamin (Wigge et al. 1997) und durch die Rekrutierung vieler Dynamin-Moleküle an Endophilin-Dimere, einem zu Bin1 verwandten BAR-Protein, zu Membranabschnitten mit hoher Krümmung. Zusammen ermöglicht das eine beschleunigte Endozytose. Es wurde postuliert, dass oberhalb der BAR-Domäne zwei SH3-Domänen an ein Dynamin-Molekül binden (Gallop et al. 2006), s. Abbildung 4A. Mit Elektronenmikroskopie wurde Endophilin auf Membrantubuli untersucht, die BAR-Domänen dimerisierten ebenfalls, aber die SH3-Domänen kam nicht oberhalb der BAR-Domänen zu liegen, sondern wurden an entgegengesetzten Enden der BAR-Domäne lokalisiert, s. Abbildung 4B. Somit wurde postuliert, dass sich bei hohen Konzentrationen auf den Tubuli die SH3-Domänen benachbarter Homodimere gegenüberstehen. Diese These wird durch „cross-linking“ der SH3-Domänen in Cysteinmutanten bestätigt (Mim et al. 2012). Der zentrale Unterschied zwischen Endophilin und Bin1 besteht darin, dass zwischen ihren BAR- und SH3-Domänen in Endophilin 41 Aminosäurereste und in Vollängen-Bin1 244 Aminosäurereste liegen, sodass eine abschließende Aussage zur Dimerbildung in Bin1 nicht möglich ist.

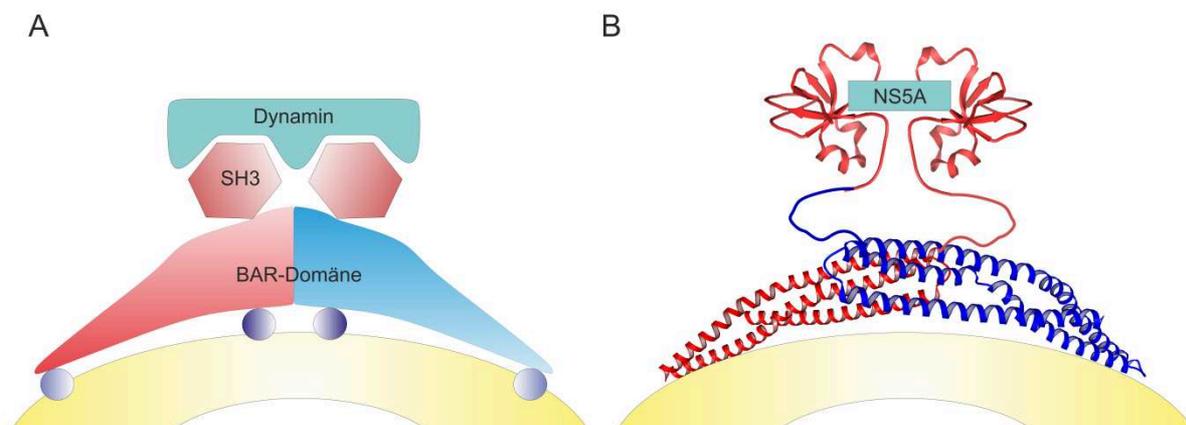


Abbildung 4. Modell der Interaktion zweier SH3-Domänen an ein Adaptormolekül.

A. Endophilin bildet ein Homodimer bestehend aus den amphiphatischen Helices (blaue Kreise), den beiden BAR-Domänen (rote und blaue Form), den internen amphiphatischen Helices (dunkelblaue Kreise) und den SH3-Domänen (rote Sechsecke). An die beiden SH3-Domänen bindet ein Dynamin-Molekül. Modell nach (Gallop *et al.* 2006). B. Mögliches Modell des homodimerisierten Bin1, deren beide SH3-Domänen ein NS5A-Molekül binden

## 1.4. Kernresonanz (NMR)-Spektroskopie

Eine biophysikalische Methode zur Strukturaufklärung von Nukleinsäuren, Proteinen und Oligosacchariden ist die kernmagnetische Resonanzspektroskopie, „nuclear magnetic resonance“, NMR. Besonders aussagekräftig ist diese Methode bei der Untersuchung von IDPs oder Interaktionen von IDPs mit weiteren Proteinen. Diese Methode beruht auf den quantenmechanischen Eigenschaften der Atomkerne. Die Kernspins richten sich im äußeren Magnetfeld aus und werden dann mit Hilfe von Radiofrequenzpulsen in ihrer Ausrichtung gestört. Die zeitliche Änderung der Ausrichtung der Kernspins wird bei der Rückkehr in den Ausgangszustand gemessen. Die erhaltenen gedämpften Schwingungen der einzelnen Kerne werden anschließend mittels Fourier-Transformation in die NMR-typische Frequenzdomäne umgewandelt und auswertbar.

Die Anfänge der NMR-Spektroskopie wurden neben dem bekannten Experiment von Otto Stern und Walther Gerlach von Isidor Rabi 1933 gemacht, welcher für seine Aufnahme von kernmagnetischen Resonanzen mit Radiowellen den Nobelpreis für Physik 1944 erhielt. Die Weiterentwicklung dieser Methode von Edward Purcell und Felix Bloch führte zu einem größeren Verständnis der Sättigung, Relaxation und Wechselwirkungen der Kernspins im Magnetfeld (Bloembergen et al. 1948). Durch Verbesserung der Spektrometertechnik, der Fourier-Transformation (Aue et al. 1976) und Einführung mehrerer Dimensionen (Jeener et al. 1979) wurde die NMR-Spektroskopie für immer anspruchsvollere Moleküle verwendet.

Bislang ist die Flüssig-NMR-Spektroskopie limitiert durch die molekulare Masse der untersuchten Moleküle. Unter Zunahme der Masse nimmt die temperaturabhängige globale Rotationskorrelationszeit des Moleküls zu. Die folglich erhöhte transversale Relaxationsrate bedingt eine Verbreiterung der Resonanzsignale und führt zur Auslöschung des Signals im Rauschen (Wider et al. 1999). Mit Hilfe verschiedener Ansätze wird dieser limitierende Faktor umgangen, damit auch größere Moleküle untersucht werden können. Zu diesen Methoden zählen unter anderem die „transverse relaxation-optimized spectroscopy“, TROSY,-Pulssequenzen (Fernández et al. 2003, Keeler 2005), partielles Markieren mit NMR-aktiven Kernen (Gardner et al. 1998) und / oder inverse Mizellen in niedrigviskosen Lösungsmitteln (Wand et al. 1998, Kielec et al. 2009). Nicht nur Proteinstrukturen werden mit NMR-Spektroskopie aufgeklärt, sondern auch intermediäre Proteinfaltungszustände (Neudecker et al. 2012) und Protein-Protein-Interaktionen (Schmidt et al. 2007). Zur Charakterisierung von IDPs wurden weitere Methoden entwickelt wie BEST-TROSY-Experimente (Solyom et al. 2013), die u. a. an NS5A entwickelt wurden, <sup>13</sup>C-detektierenden Experimente (Felli et al. 2009) und Methoden zur verbesserten Zuordnung von IDPs (Feuerstein et al. 2012a).

NMR ermöglicht die Detektion des chemischen Austausches auch dann, wenn das System sich im Gleichgewicht befindet. Die meisten anderen spektroskopischen Methoden verlagern das System aus dem Gleichgewicht und beobachten die Rückkehr zum Gleichgewichtszustand. Im Gegensatz dazu wird in der NMR die Magnetisierung gestört, um Austauschraten zu erhalten, ohne dass das chemische System gestört wird, darum werden in Echtzeit-NMR positionsabhängige Proben der lokalen Struktur und Dynamiken analysiert. Dabei können Techniken unterschiedliche Zeitskalen (Markwick et al. 2008) untersuchen,

deren Grenzen fließend ineinander übergehen. Die Zeitskalen erlauben die Charakterisierung von schnellen Reorientierungen von Seitenketten bei  $10^{-9}$  s- $10^{-12}$  s, Domänenbewegungen zwischen  $10^{-3}$  s und  $10^{-9}$  s, Diffusion und Konformationsänderungen, sowie globale und lokale Faltungsprozesse und Reaktionskinetiken in Echtzeit. Dazu dienen den Zeitskalen entsprechende Experimente wie die Bestimmung der longitudinalen und transversalen Relaxationsrate, das heteronukleare ( $^1\text{H}$ )- $^{15}\text{N}$ -NOE-Verhältnis (Kay et al. 1989), residuale, dipolare Kopplungen und Kreuzkorrelation, Car-Purcell-Meiboom-Gill-Echo und auch  $R_{1\rho}$ , sowie Protonen-Deuteronen-Austausch und chemische Verschiebungen.

## 1.5. Zielsetzung der Arbeit

Obwohl die Rolle von NS5A in der HCV-Injektion besonders in den letzten beiden Jahren hinsichtlich viraler Replikation und Ausnutzung humaner Stoffwechselwege besser verstanden wurde, gibt es immer noch offene Fragen. Besonders die Vielfältigkeit der Bindeeigenschaften von NS5A ist weiterhin im Fokus der Wissenschaft.

Im „Institute of Complex Systems“ im Forschungszentrum Jülich wurde an den Spezifitäten und Aviditäten von NS5A und verschiedenen SH3-Domänen geforscht, und Bin1 SH3 ist daraus als die SH3-Domäne mit der höchsten Affinität hervorgegangen. Bereits dort als auch im „Institute de Biologie Structurale“ in Grenoble, Frankreich, wurden NMR-Experimente durchgeführt, die die Bindung näher charakterisieren sollten. Die Arbeiten zeigten, dass die Bindung so komplex ist, dass bei der strukturellen Charakterisierung in den Zeitskalen der NMR mehrere Konformationen vorliegen, die eine eindeutige Zuordnung der Resonanzsignale nicht zuließen und somit keine Komplexstruktur von Bin1 SH3:NS5A(333-369) determiniert werden konnte. Die Herausforderung, dennoch eine Komplexstruktur zu bestimmen, wird angenommen, in dem das humane Bin1-Protein als Homodimer agieren kann. Folglich könnten die beiden SH3-Domänen zusammen an die PPR-Sequenz binden und sich die Divergenz der Konformationen zunutze gemacht werden. Damit die Bindung mit NMR charakterisiert werden kann, können aufgrund der molaren Masse Bin1, der Membranassoziation und dem Größenlimit der NMR nicht zwei gesamte membranständige Bin1-Moleküle verwendet werden. Deshalb wurde ein Konstrukt erstellt, das die Eigenschaften kombiniert: Nur die SH3-Domänen in Form eines Tandems. Die beiden sequenzgleichen Bin1 SH3-Domänen wurden durch einen Linker verbunden und anschließend Bin1 Tandem-SH3 genannt. Der Linker bestand aus neun Aminosäureresten, die eine flexible Orientierung der Domänen ermöglichen sollten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die thermodynamische, kinetische und strukturelle Charakterisierung der Bindung zwischen Bin1 SH3 sowie dem neuen Bin1 Tandem-SH3-Konstrukt und NS5A. Dazu sollen die NS5A-Fragmente NS5A(347-361), NS5A(341-361) und NS5A(333-369) mit unterschiedlichen Bereichen der PPR-Region zur Bestimmung der Bindeparameter wie Affinität, Stöchiometrie und Orientierung zu Bin1 (Tandem-)SH3 genutzt werden. Die Ergebnisse sollen Auskunft über die an der Interaktion beteiligten PxxP-Motive geben. Zusätzlich soll die Bindung der kanonischen und nicht-kanonischen Bindestellen von NS5A an Bin1 Tandem-SH3 mit den Konstrukten NS5A(191-340) und NS5A(191-447) untersucht werden. NS5A(191-340) umfasst die LCS I und Domäne II mit den beiden nicht-kanonischen Bindestellen, während NS5A(191-447) die LCS I, Domänen II und III mit sowohl nicht-kanonischen als auch kanonischen Bindestellen beinhaltet. Die Interaktionen sollen mit den Techniken der Oberflächenplasmonresonanz, „surface plasmon resonance“, SPR-Spektroskopie, Bio-Layer Interferometrie, BLI, isotherme Titrationskalorimetrie, ITC, qualitativ und quantitativ untersucht werden und strukturelle Informationen aus Röntgenstrukturanalyse und NMR-Experimenten mit molekuldynamischer Strukturrechnung gewonnen werden.

## 2. Materialien

### 2.1. Biochemikalien, Chemikalien und Kits

In Tabelle 1 nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Fluka (Neu-Ulm, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) und Roth (Karlsruhe, Deutschland) in *pro analysis* oder vergleichbarer Qualität bezogen.

Tabelle 1. Verwendete Materialien und deren Bezugsquellen

Material	Bezugsquelle
<sup>13</sup> C-Glucose [U- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , 99 %]	Euriso-top, Gif-Sur-Yvette, Frankreich
<sup>15</sup> N-Ammoniumchlorid [ <sup>15</sup> N, 99%]	Euriso-top, Gif-Sur-Yvette, Frankreich
2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure (DSS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Acrylamid 4K Lösung (30 %) Mix 29:1	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Complete protease inhibitor cocktail tablet EDTA-frei	Roche, Freiburg, Deutschland
Crystal I/II	Hampton Research, Aliso Viejo, USA
D <sub>2</sub> O [99,990 %]	Euriso-top, Gif-Sur-Yvette, Frankreich
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid (IPTG)	Boehringer, Mannheim, Deutschland
JCSG core I	Qiagen, Hilden, Deutschland
PEG low ion	Sigma, Buchs, Schweiz
PEG Suite I/II	Qiagen, Hilden, Deutschland
reduziertes Glutathion	Sigma, München, Deutschland
Wizard I/II	Rigaku, Bainbridge Island, USA
β-Mercaptoethanol (β-ME)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

### 2.2. Puffer und Lösungen

Alle wässrigen Lösungen wurden mit Wasser unter Verwendung eines Milli-Q-Biocell-Systems und einem 0,22 µm Millipack 20-Filtergerät (Millipore, Schwalbach, Deutschland) angesetzt. Alle verwendeten Puffer wurden zusätzlich durch einen 0,22 µm Membranfilter (Scheicher & Schuell BioScience, Dassel, Deutschland) filtriert und entgast. Medien und Agar, die zum Wuchs und Präparation von Bakterien genutzt werden sollten, wurden bei 120 °C, 20 min und 1,5 bar autoklaviert. Ebenso wurden fester und flüssiger Abfall aus dem S1-Labor entsorgt.

### 2.3. Größenmarker

Zur Identifikation der mittels „sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis“, SDS-PAGE, aufgetrennten Proteine wurde der Größenstandard „unstained molecular weight marker“ 26610 (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) mit den in Abbildung 5 gezeigten Proteinbanden verwendet.

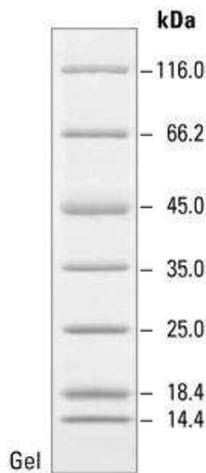


Abbildung 5. Der „Unstained Protein Molecular Weight Marker“ 26610.

Dieser Marker der Firma Thermo Scientific diente der Größenunterscheidung von Proteinen mittels SDS-PAGE. Entnommen aus <http://www.thermoscientificbio.com/protein-electrophoresis/unstained-protein-molecular-weight-marker>.

## 2.4. Bakterienstämme

Tabelle 2. Bakterienstämme mit Genotyp und Bezugsquelle

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) T1 <sup>R</sup>	<i>E. coli</i> B, F, <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> ( <sub>r<sub>B</sub></sub> , <sub>m<sub>B</sub></sub> ), <i>gal</i> , λ(DE3), <i>tonA</i>	Novagen, Darmstadt, Deutschland
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Codon Plus RIL T1 <sup>R</sup>	<i>E. coli</i> B, F, <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> ( <sub>r<sub>B</sub></sub> , <sub>m<sub>B</sub></sub> ), <i>gal</i> , λ(DE3), <i>endA</i> , <i>Hte</i> , [ <i>argU</i> , <i>ileY</i> , <i>leuW</i> , <i>Cam<sub>r</sub></i> ], <i>tonA</i>	Stratagene Europa, Amsterdam, Niederlande

## 2.5. Antibiotikastammlösungen

Stammlösungen für Antibiotika wurden sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert. Ampicillin wurde in einer Konzentration von 100 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O und Kanamycin in 50 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O angesetzt.

## 2.6. Peptide

Folgende Peptide wurden synthetisch als umkehrphasenhochleistungsflüssigkeitschromatographierte und massenspektrometrisch bestätigte Produkte bestellt. Dabei hat das NS5A(341-361) anstelle eines Cysteins an Position 342 ein Serin.

Tabelle 3. Sequenzen der verwendeten Peptide

Peptidname [Reinheit]	Sequenz	Bezugsquelle
NS5A(347-361) [98 %]	Ac-T <sub>347</sub> KAPPIPPRRKRTV <sub>361</sub> -NH <sub>2</sub>	GeneScript, Piscataway, USA
NS5A(341-361) [95 %]	Ac-G <sub>341</sub> SPLPPTKAPPIPPRRKRTV <sub>361</sub> -NH <sub>2</sub>	Caslo, Lyngby, Dänemark

## 2.7. Plasmide

Tabelle 4. Plasmide mit Antibiotikaresistenz und dem dazu verwendeten *E. coli*-Stamm, Art des Plasmids und Bezugsquellen

Plasmidname	Resistenz	Art des Plasmids	Quelle
pGEX-6P_2_GST-Bin1 SH3	Ampicillin	Expressionsvektor des GST-Bin1 SH3-Fusionsproteins mit PreScission-Protease-Schnittstelle	ICS-6 AG Willbold
pGEX-6P_2_GST-Bin1 Tandem-SH3	Ampicillin	Expressionsvektor des GST-Bin1 Tandem-SH3-Fusionsproteins mit PreScission-Schnittstelle	GeneArt, Darmstadt, Deutschland
pTTK19xUb-NS5A(333-369)	Kanamycin	Expressionsvektor des His-Ubiquitin-NS5A(333-369)-Fusionsproteins mit Yeast Ubiquitin Hydrolase (YUH1)-Schnittstelle	ICS-6 AG Willbold
pTTK19xUb	Kanamycin	Expressionsvektor des His-Ubiquitins	(Kohno <i>et al.</i> 1998)
pGEX-6P_2_GST-NS5A(191-340)	Ampicillin	Expressionsvektor des GST-NS5A(191-340)-Fusionsproteins mit PreScission-Schnittstelle	ICS-6 AG Willbold
pET28a-His-NS5A(191-477)	Kanamycin	Expressionsvektor des His-NS5A(191-477) mit TEV-Schnittstelle	Macrogen, Amsterdam, Niederlande
pRK793_TEV_S219V	Kanamycin	Expressionsvektor der His-TEV-Protease (Tobacco Etch Virus Protease S219V)	AG Waugh, Center for Cancer Research, Bethesda, USA bezogen von Addgene, Cambridge, USA

## 2.8. Enzyme und Proteine

Die in dieser Arbeit verwendeten faktoriellen Enzyme und Proteine sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5. Verwendete Enzyme

Enzyme/Proteine	Bezugsquelle
Aprotinin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Carboanhydrase aus Rindererythrozyten	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DNAse A	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
GST-PreScission-Protease	GE Healthcare, München, Deutschland
Lysozym	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ribonuklease A	GE, Little Chalfort Buckinghamshire, UK
RNAse A	Macherei und Nagel, Düren, Deutschland

- **GST-PreScission-Protease**

GST-PreScission-Protease (GE Healthcare, München, Deutschland) ist ein Fusionsprotein aus GST und der humanen Rhinovirus 3C Protease mit einer molekularen Masse von M=46 kDa. Spezifisch wird die Erkennungssequenz LEVLFQGP zwischen QG hydrolysiert.

- **His-TEV S219V**

Die His-getaggte Cystein-Protease vom „Tabaco Etch Virus“, TEV, ist eine Protease, die die Konsensussequenz ENLYFQS zwischen QS schneidet. Durch die Mutation S219V wurde die interne Schnittstelle aus dem Protein entfernt (Kapust *et al.* 2001). Die Protease hat eine Masse von M=29 kDa und wurde im Institut gereinigt (Glück *et al.* 2009).

Die Sequenzen, der in dieser Arbeit verwendeten Proteine, wurden mit den Sequenznummern versehen und die Sequenzen nach enzymatischer Hydrolyse fett markiert.

- **Bin1 SH3**

Bin1 ist ein humanes Protein, aus dem die Domäne Bin1 SH3 stammt. Das Protein besitzt die Uni-Prot-Nummer O00499. Das GST-Fusionsprotein besteht aus 308 Aminosäuren mit einer Masse von M=35 kDa und kann durch Hydrolyse mit PreScission-Protease auf 82 Aminosäuren, M=9 kDa, verkürzt werden.

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTS  
MAIIRYIADKHNMLGGCPKERAETSMLEGAVLDIRYGVSRISYKDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDR  
LCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIAWPLQ  
GWQATFGGGDHPPKSDLEVL FQ**GPLGSL**<sub>515</sub>**PPGFMFKVQAQHDYTATDTDELQLKAGDVVLPVIFQNP**  
**EEQDEGWLMGVKESDWNQHKELEKCRGVFPENFTERV**<sub>593</sub>

- **Bin1 Tandem-SH3**

Das Bin1 Tandem-SH3 ist ebenso wie Bin1 SH3 ein GST-Fusionsprotein (400 Aminosäuren, M=46 kDa) mit der Möglichkeit zur Abspaltung des GST-Tags (174 Aminosäuren, M=20 kDa verbleiben). Dieses Protein besteht aus zwei sequenzgleichen SH3-Domänen, die durch einen neun-Aminosäuren-langen Linker verbunden sind. Die Nummerierung des Konstrukts erfolgte in der vorliegenden Arbeit nicht fortlaufend, sodass die Nummerierung am Beginn der C-terminalen Domäne erneut bei 513' begann, jedoch ein Hochkomma für die Bezeichnung der C-terminalen Domäne zugefügt wurde.

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTS  
MAIIRYIADKHNMLGGCPKERAETSMLEGAVLDIRYGVSRISYKDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDR  
LCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIAWPLQ  
GWQATFGGGDHPPKSDLEVL FQ**GPLGSG**<sub>513</sub>**RLDLPPGFMFKVQAQHDYTATDTDELQLRAGDVVLPVIF**  
**FQNP****EEQDEGWLMGVKESDWNQHKELEKCRGVFPENFTERV**<sub>592</sub>**GLYSERASNG**<sub>513</sub>**RLDLPPGFMFKVQ**  
**AQHDYTATDTDELQLRAGDVVLPVIFQNP****EEQDEGWLMGVKESDWNQHKELEKCRGVFPENFTERV**<sub>592</sub>



Abbildung 6. Schematische Darstellung der Fusionsproteine GST-Bin1 SH3 und GST-Bin1 Tandem-SH3.

Die Fusionsproteine enthalten eine PreScission-Protease-Schnittstelle zur enzymatischen Spaltung zwischen GST und SH3-Domäne.

- **His-Ubiquitin**

His-Ubiquitin besteht aus 98 Aminosäuren, das entspricht M=11 kDa.

MGHHHHHHHHHSSGHIDDDKHMQIFVKTLTGKTITLEVESSTIDNVKSKIQDKEGIPPDQORLIF  
AGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRGG

- **His-Ubiquitin-NS5A(333-369) C2314S**

Die verwendeten NS5A-Konstrukte entsprechen dem Genotyp 1b Stamm HC-J4 und sind in der Uni-Prot-Datenbank unter der Nummer O92972 zu finden. Das Cystein an der Sequenzposition 342 wurde zu einem Serin mutiert. Dieses Protein besteht aus 136 Aminosäuren, M=15 kDa, und kann mit YUH1-Protease, einer Ubiquitin carboxylterminaler Hydrolase, auf ein Protein mit 37 Aminosäuren verkürzt werden.

MGHHHHHHHHSSGHIDDDDKHMQIFVKTLTGKTTITLEVESSDTIDNVKSKIQDKEGIPPDQORLIF  
AGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGGD<sub>333</sub>**YVPPVVHGSPLPPTKAPPIPPPRRKRTVVLTEST**  
**VS**<sub>369</sub>

- **GST-NS5A(191-340)**

Das Fusionsprotein hat eine Länge von 414 Aminosäuren, M=47 kDa, und wird durch enzymatische Hydrolyse der PreScission-Protease auf 188 Aminosäuren, M=20 kDa, verkürzt.

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQS  
MAIIRYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDR  
LCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPOIDKYLKSSKYIAWPLQ  
GWQATFGGGDHPPKSDLEVLVFG**PLGSLRGGE**<sub>191</sub>**PEPDVTVLTSMLTDP SHITAE TAKRRLARGSPPS**  
**LASSASQLSAPSLKATCTTHHDS PADLIEANLLWRQEMGGNITRVESENKVVILDSFEPLHADGDE**  
**REISVAAEILRKS RKFPSALPIWARPDYNPPLLESWKDPDYVPPVVH**<sub>340</sub>

- **His-NS5A(191-447)**

His-NS5A(191-447) hat 287 Aminosäuren, M=31 kDa, und kann durch His-TEV Protease-Hydrolyse auf 268 Aminosäuren, M=28 kDa, verkürzt werden.

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMASGSLRGGE<sub>191</sub>**PEPDVTVLTSMLTDP SHITAE TAKRRLARGSPPSL**  
**ASSASQLSAPSLKATCTTHHDS PADLIEANLLWRQEMGGNITRVESENKVVILDSFEPLHADGDER**  
**EISVAAEILRKS RKFPSALPIWARPDYNPPLLESWKDPDYVPPVVHGCPLPPTKAPPIPPPRRKRTVV**  
**LTESNVSSALAE LAKTFGSSGSSAVDSGTATALPDQASDDGDKGSDVESYSSMPPLEGEPGDPDLSD**  
**GSWSTVSEEASEDVCC**<sub>447</sub>

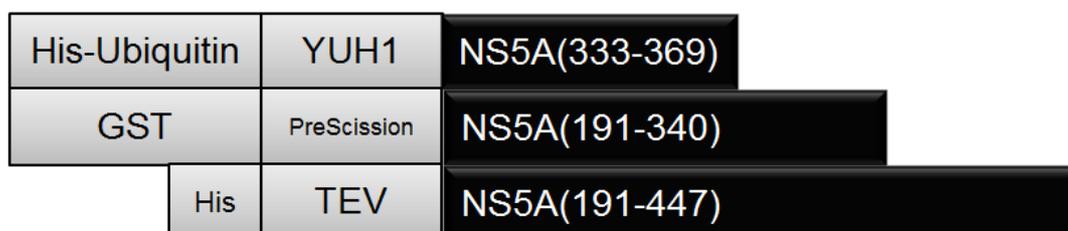


Abbildung 7. Schematische Darstellungen der verwendeten NS5A-Konstrukte zur rekombinanten Expression.

Zu oberst das His-Ubiquitin-NS5A(333-369), das durch YUH1 in His-Ubiquitin und NS5A(333-369) hydrolysiert wird, mittig GST-NS5A(191-340) mit einer internen PreScission-Protease-Schnittstelle und zu unterst das His-NS5A(191-447), das mit TEV-Protease hydrolysiert werden kann.

## 2.9. Chromatographien

Tabelle 6. Verwendete Gravitationschromatographie- und Größenausschlusschromatographiesäulenmaterialien

Material	Bezugsquelle
Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose	Qiagen, Hilden, Deutschland
Glutathion-Sepharose 4B	GE Healthcare, München, Deutschland

Säule	Bezugsquelle
HiLoad Superdex 75 XK 16/600 pg	GE Life Sciences, Freiburg, Deutschland

## 2.10. Geräte

Tabelle 7. Verwendete Geräte

Gerät	Bezugsquelle
24-Wellplatten	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
5417R und 5804R (Tischzentrifuge)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Avanti J-20XP (Zentrifuge)	Beckmann-Coulter, Palo Alto, USA
Biacore Sensorchip S Series NTA	GE Healthcare, München, Deutschland
Biacore T200 (SPR)	GE Healthcare, München, Deutschland
Branson sonifier 250 (Ultraschallgerät)	Branson Ultrasonics, Danbury, USA
ChemiDoc MP (Geldokumentation)	BioRad, München, Deutschland
“crystal quick plate 96 well ps square, U-bottom, low profile” (96-Lochkristallisationsplatten)	Greiner Bioone, Frickenhausen, Deutschland
Direct Detect (FT-IR)	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Eppendorf UVette (Quartz-Küvetten)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Freedom evo (Pipettierroboter)	Tecan, Männedorf, Schweiz
Imaging Plate mar345 (Speicherfolien-Detektor)	MARRESEARCH, Norderstedt, Deutschland
Lambda 25 (UV/Vis-Spekrometer)	Perkin Elmer, Skelton, USA
LS55 luminescence (Fluoreszenzspektrometer)	Perkin Elmer, Skelton, USA
M-110P (Microfluidizer)	Microfluidics, Westwood, USA
MicroCal iTC 200 (ITC)	GE Healthcare, München, Deutschland
Mighty small SE 260 (Elektrophoresekammer)	Hoefler Scientific Instruments, San Francisco, USA
Milli-Q-Biocell system	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Octet RED96 (BLI)	Pall, FortéBio, Menlo Park, USA
pH-Meter und pH-Elektrode	Mettler Toledo, Steinbach, Deutschland
Power supply EPS 1001 (Elektrophoresegerät)	Amersham, San Francisco, USA
Rotilabo Spritzenfilter	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Röntgengenerator	Bruker-Nonius FR591, Delft, Niederlande
Semi-mirco balance CP225D	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Shigemi 5 mm symmetric NMR micro tubes matched with <sup>2</sup> D <sub>2</sub> O (NMR-Röhrchen)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Spectra/Por 3500 Da MWCO (Dialysemembran)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Unitron (Inkubationsschüttler)	Infors-HT, Einsbach, Deutschland
VivaSpin 20 (Zentrifugalkonzentrator)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
ÄKTApure (Chromatographiesystem)	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland

## 2.11. Datenbanken und Software

Tabelle 8. Verwendete Datenbanken und Software

Datenbank/Programm	Version	Verwendungszweck
Aria2 (Rieping <i>et al.</i> 2007)	2.4.0	NMR-Strukturrechnung
BMRB-Datenbank ( <a href="http://bmrw.wisc.edu">http://bmrw.wisc.edu</a> )		Datenbank NMR-basierter Strukturen
CCP4 interface	2.2.1	Graphische Oberfläche von CCP4
CCP4 programm suite (Winn <i>et al.</i> 2011)	6.4.0	Auswertung von Diffraktionsbildern
CcpNmr analysis (Vranken <i>et al.</i> 2005)	2.4.0	Visualisierung, Zuordnung von NMR-Spektren
CING ( <a href="http://nmr.cmbi.ru.nl/cing">nmr.cmbi.ru.nl/cing</a> )		Interface für NMR-Strukturgenerierung
ClustalW-Alignment ( <a href="http://ebi.ac.uk">http://ebi.ac.uk</a> )	2.1	Vergleich von Aminosäuresequenzen
Coot (Emsley <i>et al.</i> 2004, Emsley <i>et al.</i> 2010)	0.7.2	Darstellung von PBD-Dateien und Elektronendichtekarten
ExpASy-ProtParam ( <a href="http://web.expasy.org">http://web.expasy.org</a> )		Analyse von Proteinsequenzen
iMosflm (Leslie <i>et al.</i> 2007)	7.1.1	Prozessierung von Diffraktionsdaten
KSDSSP (Kabsch <i>et al.</i> 1983)		Algorithmus zur Sekundärstrukturbestimmung
MolProbity (Davis <i>et al.</i> 2007)	4	Strukturvalidierung
nmrDraw (Delaglio <i>et al.</i> 1995)	8.1	Visualisierung von NMR-Spektren
nmrPipe (Delaglio <i>et al.</i> 1995)	8.1	Prozessierung von NMR-Daten
PDB-Datenbank ( <a href="http://rcsb.org">http://rcsb.org</a> )		Datenbank molekularer Strukturen
Phenix (Adams <i>et al.</i> 2010)	1.8.4	Strukturgenerierung von Diffraktionsbildern
Pymol (Schrödinger 2010)	1.7.2.0	Visualisierung von Protein-Strukturen
Swiss-Model (Biasini <i>et al.</i> 2014)		Sequenzüberlagerung und Modelgenerierung
TALOS-N (Shen <i>et al.</i> 2013)	4.01	Bestimmung von Torsionswinkeln
Theseus (Theobald <i>et al.</i> 2006)	2.0.6	NMR-Ensemble-Überlagerung
Uniprot-Datenbank ( <a href="http://uniprot.org">http://uniprot.org</a> )		Informationen zu Proteinsequenzen und -funktionen

## 3. Methoden

### 3.1. Klonierung

#### 3.1.1. Produktion kompetenter Bakterienzellen

Nur kompetente Bakterienzellen nehmen Plasmid-DNA durch Transformation auf. Zur Transformation wurde die Calciumchlorid-Methode (Cohen *et al.* 1972) verwendet, um circa  $10^5$  bis  $10^6$  Transformanden pro  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA zu erhalten. Eine *E. coli*-Übernachtskultur in „lysogeny broth“, LB, -Medium wurde in einem Rotationsschüttler (Infors-HT, Einsbach, Deutschland) bei 160 rpm und 37 °C kultiviert. In einem Verhältnis von 1:100 wurde die Übernachtskultur genutzt, um 50 ml LB-Medium zu inokulieren und bis zu einer optischen Dichte, OD, von 0,5 inkubiert. Die Suspension wurde bei 5000 xg bei 11 °C 10 min zentrifugiert und das Pellet in 40 ml eiskalter 0,1 M  $\text{MgCl}_2$ -Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 20 ml eiskalter 50 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 2 ml 50 mM  $\text{CaCl}_2$ , 15 % (v/v) Glycerin-Lösung resuspendiert. Die erhaltenen Suspensionen wurden zu 200  $\mu\text{l}$  aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

#### 3.1.2. Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen wurde die Zellsuspension auf Eis aufgetaut und mit 100 ng des Ziel-Plasmids versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Zellen bei 42 °C für 45 s hitzegeschockt und weitere 3 min auf Eis inkubiert. 300  $\mu\text{l}$  LB-Medium wurde zugegeben und für 45 min bei 37 °C geschüttelt. Je 50  $\mu\text{l}$  und 200  $\mu\text{l}$  wurden auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 3.1.3. Kultivierung und Lagerung von *E. coli*-Stämmen

Die frisch-transformierten *E. coli*-Zellen wurden als Glyzeringefrierkultur herangezogen. Dazu wurde 5 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium mit einer Transformandenkolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei einer Endkonzentration von 1 % Glukose und 25 % Glycerin in 1 ml Aliquots schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.2. Proteinexpression

Zur heterologen Expression von Proteinen in *E. coli*-Zellen wurden die *E. coli*-Zellen mit der DNA laut Kapitel 3.1.2 transformiert. Die daraus hergestellten Glyzeringefrierkulturen, 3.1.3, wurden genutzt um 50 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium zu inokulieren und über Nacht bei 37 °C und 160 rpm im Rotationsschüttler zu inkubieren.

- Zur Isotopen-unmarkierten Proteinexpression wurden 1 l Antibiotika-haltiges LB-Medium in einem 2 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen zu OD=0,1 mit dieser Vorkultur inokuliert und bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Bei einer OD von 0,6-0,8 wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid (IPTG) induziert. Zur heterologen Expression von Bin1 SH3, Bin1 Tandem-SH3, His-Ubiquitin und His-Ubiquitin-NS5A(333-369) wurden die Zellen 4 h bei 37 °C 130 rpm inkubiert, während NS5A(191-340) und NS5A(191-447) nach Induktion bei 25 °C 130 rpm inkubiert wurden.
- Zur Isotopen-angereicherter Proteinexpression wurden 500 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium in einem 2 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen zu OD=0,1 durch die Vorkultur inokuliert und bei 37 °C bei 130 rpm inkubiert. Die Zellen wurden bei OD=0,6-0,8 mit 2000 xg zentrifugiert (Beckmann-Coulter, Palo-Alto, USA) und in 1 l vorgewärmtem, Antibiotika-haltigem M9-Minimalmedium resuspendiert. Das Minimalmedium erhielt nach Bedarf <sup>15</sup>N-Ammoniumchlorid oder <sup>15</sup>N-Ammoniumchlorid und <sup>13</sup>C-Glukose als Stickstoff- bzw. Kohlenstoffquellen. Die Induktion erfolgte bei OD=0,6-0,8 mit 1 mM IPTG für 4 h. Die Proteinexpression der unterschiedlichen Konstrukte erfolgte bei den im letzten Abschnitt angegebenen Temperaturen.

Anschließend wurden die Zellen bei 5000 xg und 11 °C 25 min zentrifugiert und einmalig in phosphatgepufferter Salzlösung, PBS-Puffer, gewaschen. Die Kontrolle der Proteinexpression erfolgte durch Probennahme vor und nach vierstündiger Induktion mittels SDS-PAGE, s. Kapitel 3.4. Die Zellpellets wurden bei -80 °C gelagert.

<b>LB-Medium</b>	<b>M9-Minimalmedium</b>
10 g/l Trypton	9,1 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O
5 g/l Hefeextrakt	3 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O
5 g/l NaCl	0,5 g/l NaCl
	0,5 g/l [ <sup>15</sup> N]H <sub>4</sub> Cl
	100 μM CaCl <sub>2</sub>
	2 mM MgSO <sub>4</sub>
	10 μM Fe(III)Cl
	4 g/l Glukose bzw. 2 g/l [ <sup>13</sup> C]-Glukose
	0,2 % (v/v) Spurenelemente
	5 mg/l Thiaminhydrochlorid
	0,1 % (v/v) Vitamincocktail
<b>Spurenelemente</b>	<b>Vitaminlösung</b>
30 mg/l MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	1 g/l Biotin
58,8 mg/l ZnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	1 g/l Cholinchlorid
300 mg/l H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1 g/l Folsäure
200 mg/l CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	1 g/l Nicotinamid
20 mg/l NiCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	1 g/l Natrium-D-panthothenat
900 mg/l Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	1 g/l Pyridoxalhydrochlorid
20 mg/l Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,1 mg/l Riboflavin
<b>PBS-Puffer pH 7,4</b>	
2,7 mM KCl	
10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
140 mM NaCl	

### 3.3. Reinigung von rekombinant exprimierten Proteinen

#### 3.3.1. Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose

Die Reinigung von GST-Bin1 SH3, GST-Bin1 Tandem-SH3 und GST-NS5A(191-340) erfolgte an Glutathion-Sepharose (GE, Freiburg, Deutschland). Glutathion-S-Transferasen, GST, sind Enzyme, die bei der Entgiftung von Xenobiotika eine wichtige Rolle spielen. Sie katalysieren die Bindung von Glutathion an diese Xenobiotika nach Oxidation des zentralen Cysteins des Glutathions. Das Prinzip dieser Affinitätschromatographie beruht auf der Bindung des GST-Proteins an das Tripeptid Glutathion, das an der stationäre Phase, der Sepharose, gebunden ist. Aufgrund ihrer hohen Affinität werden GST-getaggte Proteine an die Sepharose gebunden und konzentriert, während *E. coli*-Proteine eluiert werden. Die Elution des GST-getaggten Proteins erfolgt mit reduziertem Glutathion.

#### 3.3.2. Affinitätschromatographie an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose

An Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurden die Reinigungen von His-Ubiquitin, His-Ubiquitin-NS5A(333-369) und His-NS5A(191-447) durchgeführt. Diese Art der Chromatographie wird auch als „immobilized metal affinity chromatography“, IMAC (Porath *et al.* 1975) bezeichnet. Ziel dieser Reinigungsmethode ist, dass der Polyhistidin-Tag des Proteins an den mit Metallionen beladenen, chelatbildenden Liganden bindet. Bei der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose handelt es sich um Nitrilotriessigsäure, NTA, das mit vier von sechs Ligandenbindestellen des Nickelions belegt ist. Die weiteren beiden Ligandenbindestellen des Nickelions werden vom Polyhistidin-Tag des Proteins chelatisiert. Um unspezifische Wechselwirkungen von Proteinen mit Nickel zu vermeiden, wird dem Bindungspuffer wenige millimolar Imidazol zugefügt. Die Imidazolkonzentration wird schrittweise erhöht, sodass eine Verdrängung des Polyhistidins durch Imidazol stattfindet und das Fusionsprotein eluiert.

#### 3.3.3. Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie, „size exclusion chromatography“, SEC, werden Proteine nach ihrem hydrodynamischen Radius getrennt. Das Säulenmaterial aus quervernetzter Agarose und Dextran bildet Poren und ermöglicht, dass Proteine verschiedener Größe unterschiedlich weit in die Poren hinein diffundieren können. Dabei soll die Flussrate des Puffers nur wenig schneller als die Diffusionsrate der Proteine sein. Kleinere Proteine verweilen länger in den Poren und somit auf der Säule und eluieren später als größere Moleküle. Dies ist in der Regel der abschließende Reinigungsschritt eines Proteins, um alle Verunreinigungen unterschiedlicher Größe vom gewünschten Protein zu entfernen.

### 3.3.4. Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3

Zur Reinigung der Fusionsproteine GST-Bin1 SH3 und GST-Bin1 Tandem-SH3 wurden 4 ml SH3-Lysepuffer pro g Pellet verwendet. Die Zellen wurden auf Eis resuspendiert, 30 min rollend inkubiert und anschließend bei 25000 psi mit dem Microfluidizer (Microfluidics, Westwood, USA) aufgeschlossen. Das Lysat wurde bei 50000 xg und 11 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf 4 ml mit SH3-Bindepuffer äquilibrierte Glutathion-Sepharose aufgetragen und mit 30 Säulenvolumen SH3-Bindepuffer gewaschen. Zur Hydrolyse des Fusionsproteins wurde GST-PreScission-Protease (GE Healthcare, München, Deutschland) hinzugegeben und bei Raumtemperatur 4 h inkubiert. Nach der Hydrolyse wurde das gewünschte Protein mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0 in drei Säulenvolumen eluiert. Wenn das Fusionsprotein erhalten werden soll, wurde die enzymatische Spaltung mittels GST-PreScission-Protease nicht durchgeführt, sondern das Fusionsprotein mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0 mit 10 mM reduziertem Glutathion eluiert. Sowohl hydrolysiertes als auch das Fusionsprotein wurde mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie an der Superdex 75 16/600 pg (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) in SH3-SEC-Puffer gereinigt, in SH3-Dialysepuffer in einem Dialyseschlauch (Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit 3500 Da „molecular weight cut-off“, MWCO, dialysiert und abschließend in Vivaspin20-Konzentratoren (Sartorius, Göttingen, Deutschland) ultrafiltriert.

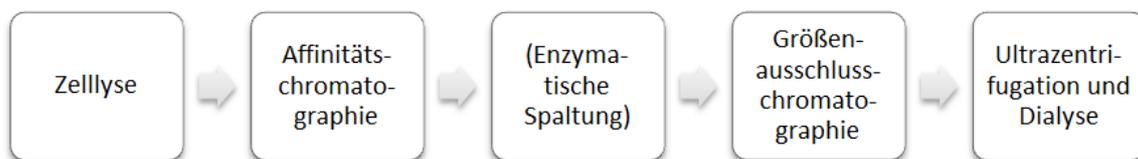


Abbildung 8. Schematischer Reinigungsprozess der Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3-Proteine. Der Prozess umfasst folgende Teile: Zellyse, Affinitätschromatographie, mögliche enzymatische Spaltung, Größenausschlusschromatographie, Ultrafiltration und Dialyse.

<b>SH3-Lysepuffer</b>	<b>SH3-Bindepuffer</b>
1x PSB pH 7,4	1x PBS pH 7,4
1 mM DTT	1 mM DTT
1 Proteaseinhibitortablette (Roche, Freiburg, Deutschland)	0,1 % Triton X-100
20 µg/ml Lysozym	
10 µg/ml DNase	

<b>SH3-SEC-Puffer</b>	<b>SH3-Dialysepuffer</b>
50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 6,5	50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 6,5
200 mM NaCl	20 mM NaCl
2 mM β-Mercaptoethanol	2 mM β-Mercaptoethanol
1 mM EDTA	0,1 mM EDTA

### 3.3.5. NS5A(333-369) und His-Ubiquitin

Zur Reinigung von His-Ubiquitin und des His-Ubiquitin-NS5A(333-369)-Fusionsproteins wurde dasselbe Protokoll verwendet (Glück *et al.* 2011). Die Zellpellets aus 1 l-Kulturen wurden mit 25 ml His-Ubiquitin-Lysepuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen zweimalig 3 x 40 s sonifiziert, mit einer weiteren 30-minütigen Inkubation dazwischen. Nach der Zentrifugation bei 50000 xg für 30 min bei 11 °C wurde der Überstand auf 3 ml einer mit His-Ubiquitin-Waschpuffer äquilibrierte Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose gegeben und mit 10-15 Säulenvolumen dieses Waschpuffers von unspezifisch gebundenen Proteinen befreit. Die Imidazolkonzentration des zweiten Waschschritts wurde auf 30 mM Imidazol im Waschpuffer bei 10-15 Säulenvolumina erhöht. Die Elution erfolgte mit dem His-Ubiquitin-Elutionspuffer in sieben Fraktionen à 4 ml. Die Protein-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und gegen 40 mM Tris/HCl pH 8,0 und 300 mM NaCl dialysiert und mittels Größenausschlusschromatographie an der Superdex 75 16/600 im His-Ubiquitin-SEC-Puffer aufgetrennt. Zum Abschluss wurde das Protein gegen 1x PBS pH 7,4 dialysiert und ultrafiltriert.

<b>His-Ubiquitin-Lysepuffer</b>	<b>His-Ubiquitin-Waschpuffer</b>
40 mM Tris/HCl pH 8,0	40 mM Tris/HCl pH 8,0
300 mM NaCl	300 mM NaCl
20 mM Imidazol	20 mM Imidazol
1 EDTA-freie Proteaseinhibitortablette	

<b>His-Ubiquitin-Elutionspuffer</b>	<b>His-Ubiquitin-SEC-Puffer</b>
40 mM Tris/HCl pH 8,0	40 mM Tris/HCl pH 8,0
300 mM NaCl	300 mM NaCl
200 mM Imidazol	

### 3.3.6. NS5A(191-340)

Die Zellen mit heterolog exprimiertem GST-NS5A(191-340) wurden mit 30 ml pro Pellet aus einer 1 l-Kultur in SH3-Lysepuffer mit zusätzlich 10 µg/ml RNAse resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch einminütige Sonifikation, (Branson Ultrasonics, Danbury, USA), einer Inkubation von 60 min auf Eis und einer weiteren einminütigen Sonifikation. Das Lysat wurde 40 min bei 50000 xg und 11 °C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde auf 3 ml einer mit SH3-Bindepuffer äquilibrierten GSH-Sepharose aufgetragen und mit jeweils zehn Säulenvolumen SH3-Bindepuffer, SH3-Bindepuffer mit zusätzlich 100 mM NaCl und anschließend mit 250 mM NaCl im SH3-Bindepuffer gewaschen. Wenn enzymatisch hydrolysiertes Protein erwünscht wurde, wurde GST-PreScission-Protease hinzugegeben und 2 h bei 4 °C hydrolysiert und in 50 mM Tris/HCl pH 8,0 mit drei Säulenvolumen eluiert. Sollte das Fusionsprotein erhalten werden, wurde mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0 mit 10 mM reduziertem Glutathion eluiert. Die Fraktionen wurden abschließend an der Superdex 75 16/600 gereinigt, gegen SH3-Dialysepuffer mit 3500 Da MWCO dialysiert und ultrafiltriert.

### 3.3.7. NS5A(191-447)

Die Zellen mit heterolog exprimiertem His-NS5A(191-447) wurden mit 5 ml pro g Pellet aus 1 l-Kultur in NS5A(191-447)-Lysepuffer resuspendiert und für 1 min auf Eis sonifiziert. Anschließend wurden die Zellen für 15 min bei 10000 xg zentrifugiert und erneut bei den obigen Bedingungen sonifiziert. Dann wurde das Lysat bei 50000 xg für 45 min bei 11 °C zentrifugiert. Alle Überstände wurden auf 3 ml einer mit Lysepuffer äquilibrierter Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose gegeben, der Durchfluss aufgefangen und erneut über die Agarose gegeben. Das Protein wurde mit jeweils zwei Säulenvolumen Lysepuffer aufsteigender Imidazolkonzentrationen von 20 mM, 50 mM, 100 mM, 250 mM und 500 mM gewaschen und die NS5A(191-447) enthaltenen Fraktionen wurden vereinigt. Anschließend erfolgte eine Dialyse gegen NS5A(191-447)-Spaltungspuffer und die Hydrolyse mit 1 mg His-TEV-Protease pro 10-20 mg Protein für 2 h bei Raumtemperatur. Die verwendete Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose wurde reäquilibriert und die erhaltene Spaltnischung für 30 min bei Raumtemperatur darin inkubiert. Nach Waschen mit drei Säulenvolumen des Spaltungspuffers wurde mit jeweils zwei Säulenvolumen Spaltungspuffer mit zusätzlich 20 mM, 50 mM, 100 mM und 500 mM Imidazol eluiert. Erneut wurden die Fraktionen vereinigt, die das Spaltprodukt NS5A(191-447) enthielten, und nach Zentrifugation bei 4000 xg für 20 min eine Größenausschlusschromatographie an der Superdex 75 16/600 in NS5A(191-447)-SEC-Puffer durchgeführt. Das zusammengeführte Protein wurde in SH3-Dialysepuffer dialysiert, ultrafiltriert und abschließend für 20 min bei 95 °C erhitzt.

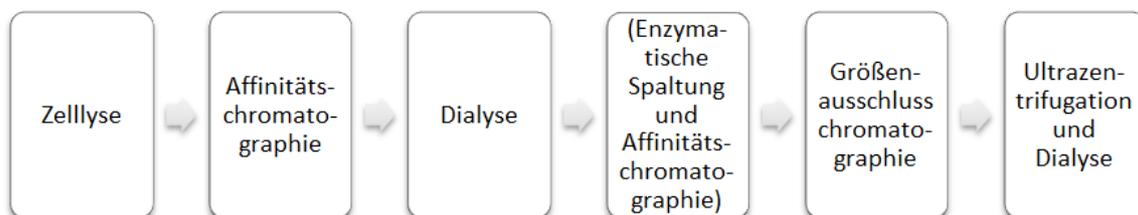


Abbildung 9. Die schematische Reinigung des His-NS5A(191-447).

Der Prozess besteht aus Zellyse, Affinitätschromatographie, Dialyse, möglicher enzymatischer Hydrolyse und erneuter Affinitätschromatographie, Größenausschlusschromatographie, Ultra-zentrifugation und Dialyse.

<b>NS5A(191-447)-Lysepuffer</b>	<b>NS5A(191-447)-Spaltungspuffer</b>	<b>NS5A(191-447)-SEC-Puffer</b>
100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8,0	50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 8,0	50 mM Tris pH 8,0
10 mM Tris/HCl	200 mM NaCl	300 mM NaCl
8 M Harnstoff	10 mM β-Mercaptoethanol	10 mM β-Mercaptoethanol
20 mM Imidazol	10 µg/ml DNase	
10 mM β-Mercaptoethanol	20 µg/ml RNase	
	1 Proteaseinhibitortablette	

### 3.4. SDS-PAGE nach Laemmli

Proteine wurden mittels der denaturierenden, diskontinuierlichen SDS-PAGE (Laemmli 1970) analytisch aufgetrennt. Dazu wurden die Proben 5 min bei 95 °C in vierfachem Probenpuffer aufgeköcht. Dadurch denaturieren die Proteine und SDS lagert sich in einem empirischen Verhältnis von 1,4 g SDS pro 1 g Protein an, um die Eigenladung der Proteine zu überdecken und eine Auftrennung nach Ladung pro Masse im elektrischen Feld zu ermöglichen. Zusätzlich wurden durch  $\beta$ -Mercaptoethanol im Probenpuffer intra- und intermolekulare Disulfidbrücken aufgebrochen. Zum Größenvergleich durch Proteine wurde der Größenstandard „protein molecular weight marker“ 26610 verwendet.

Die Gelelektrophoresen wurden in vertikalen Plattenelektrophoresekammern (Mighty Small II, Hoefer, San Francisco, USA) mit einer konstanten Stromstärke von 40 mA pro Gel für 45 min durchgeführt. Das verwendete Gel bestand aus einem Trenngel, das von einem Sammelgel überschichtet war. Nach dem Probenauftrag und Anlegen des Stroms wurden die Proteine im Sammelgel konzentriert. Durch die schnelllaufenden Chloridionen (Leitonen) und die langsamen Glyzinmoleküle (Folgeionen) diffundieren Proteine zwischen Leit- und Folgeionen hochkonzentriert zur Anode. Im engporigen Trenngel (15 % Acrylamid) wurde der pH-Wert basisch (pH 8,8), und somit erhielten die Glyzinmoleküle eine negative Nettoladung. Das hatte zur Folge, dass das Folgeion die Proteine überholte und die Trennung der Proteine stattfinden konnte. Dabei wandern kleinere Protein schneller durch das Gel als größere Proteine.

Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele aus den Kammern genommen und in Coomassie-Färbelösung gelegt, wobei der Farbstoff mit positiv geladenen Aminosäuren interagiert. Nach halbstündiger Inkubation bei 60 °C wurden die Gele in heißem Wasser entfärbt. Der Farbstoff, der nicht an Protein gebunden hat, wurde aus dem Gel herausgewaschen. Zur Dokumentation wurde das Geldokumentationsgerät (ChemiDoc MP, BioRad, München, Deutschland) verwendet.

<b>5 % Sammelgel</b>		<b>15 % Trenngel</b>
16,8 % (v/v) Acrylamid 30 %ige Lösung		50 % (v/v) Acrylamid 30 %ige Lösung
125 mM Tris/HCl pH 6,8		375 mM Tris/HCl pH 8,8
0,1 % (w/v) SDS		0,1 % (w/v) SDS
0,01 % (v/v) APS		0,01 % (v/v) APS
0,1 % (v/v) TEMED		0,04 % (v/v) TEMED

<b>1-fach SDS-Laufpuffer</b>	<b>4-fach Probenpuffer</b>	<b>Coomassie-Färbelösung</b>
50 mM Tris/HCl	20 mM Tris/HCl pH 6,8	25 % Isopropanol
385 mM Glycin	8 % (w/v) SDS	10 % Essigsäure
0,1 % (w/v) SDS	8 % (v/v) $\beta$ -ME	0,5 g/l Coomassie Brilliant Blue R250
	40 % (v/v) Glycerin	
	3 g/l Bromphenolblau	

### 3.5. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte kolorimetrisch durch Bradford- (Bradford 1976) oder Bicinchoninsäure, BCA,-Assays (Smith *et al.* 1985) oder beruhte auf den intrinsischen Eigenschaften der Aminosäuren bei UV/Vis- oder Infrarotspektroskopie.

Eine gängige Methode zur Ermittlung der Proteinkonzentration ist die UV/Vis-Spektroskopie. In Proteinen vorhandene Aminosäuren absorbieren im UV-Wellenlängenbereich. Anhand der Absorption  $A$  der Peptidbindungen bei  $\lambda=220$  nm, Phenylalanins bei  $\lambda=260$  nm, Tyrosins bei  $\lambda=274$  nm und Tryptophans bei  $\lambda=280$  nm und der Schichtdicke  $d$  wurden Proteinkonzentrationen  $c$  bestimmt. Dabei hat Tryptophan die stärkste Absorption mit einem molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  von  $\epsilon_{280}=5000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  neben Tyrosin mit  $\epsilon_{280}=1490 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Gasteiger *et al.* 2005). Aus dem Lambert-Beerschen-Gesetz  $A=\epsilon c d$  wurde die Absorption in Proteinkonzentration umgerechnet. Der Proteinprobe vorangehend wurde ein Pufferspektrum mit dem Lambda 25 UV/VIS-Spektrometer (Perkin Elmer, Waltham, USA) aufgenommen, welches vom Proteinspektrum abgezogen wurde. Die molaren Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine wurden mit dem Programm ExPASy-ProtParam berechnet.

Bei der Infrarotspektroskopie werden die Absorptionseigenschaften der Amidbindungen der Peptide oder Proteine genutzt. Am FT-IR (Millipore, Schwalbach, Deutschland) wurden jeweils 2  $\mu\text{l}$  Proben auf die Messmembranen aufgetragen, die Tropfen bei Raumtemperatur getrocknet und im Gerät gemessen. Vor jeder Messung wurde die gerätinterne Trocknung wiederholt, um ein vollständiges Austrocknen der Membran zu gewährleisten. Infrarotspektren von  $\tilde{\nu}=1750\text{-}1450 \text{ cm}^{-1}$  wurden aufgenommen und das Amid I-Maximum, die hauptsächlich der Carbonyl-CO-Streckschwingung und zu einem geringeren Anteil der C-N-Streckschwingung der Peptidbindung zugeordnet ist, der Proteinprobe von einem Pufferspektrum subtrahiert. Die Auswertung erfolgte durch eine Proteinstandardreihe mit Rinderserumalbumin im Messpuffer.

### 3.6. Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR)

Oberflächenplasmonenresonanz ist eine markierungsfreie Spektroskopietechnik von Biomolekülen, bei der ein Interaktionspartner, der Ligand, an eine stationäre Phase immobilisiert und ein zweiter in Lösung als Analyt verwendet wird. Die Technik beruht auf den physikalischen Eigenschaften der Laser-induzierten Oberflächenplasmonen an Metall-Lösungsmitteloberflächen über einem Prisma (Piliarik *et al.* 2009). Ein Laserstrahl ist auf die Metall-Oberfläche – meistens bestehend aus Gold-Partikeln – gerichtet und wird in einem bestimmten Winkel reflektiert, es herrscht totale, interne Reflexion am sogenannten SPR-Winkel. Durch die Reflexion wird ein evaneszentes Feld aufgebaut, welches mit Oberflächenplasmonen an der Grenzschicht in Wechselwirkung tritt. Durch die Anregung der Oberflächenplasmonen wird die Intensität des reflektierten Lichts im SPR-Winkel reduziert. Dieser Winkel ist u. a. abhängig vom Refraktionsindex des absorbierenden Materials. Ein durch verschiedene Substanzen beladenes Material führt zu einer Änderung des Refraktionsindizes und zu einer der Größe des gekoppelten Materials proportionalen

Verschiebung des Winkels. Angezeigt wird im Sensorgramm die Änderung des Winkels in sogenannten „response units“, RU.

Die Sensorchips bestehen aus einer mit Gold überzogenen Glasoberfläche, auf der sich eine Dextran-Matrix befindet, die chemisch modifiziert werden kann. Es stehen verschieden dicke Matrixen mit hydrophober Oberfläche und für Streptavidin-, GST- und Polyhistidin-getaggte Proteine zur Verfügung. An diese chemisch modifizierten Gruppen können Biomoleküle immobilisiert, die Liganden, und die Bindung von Analyten in Echtzeit analysiert werden. Dazu laufen drei Phasen ab: erstens die Assoziation des Analyten an den Liganden, wobei der RU-Wert ansteigt, zweitens die stationäre Phase und drittens die Dissoziation des Analyten, bei dem im Idealfall der Ausgangs-RU-Wert vor Applikation wiedererreicht wird. Aus den ermittelten Bindekurven lassen sich Assoziations-, Gleichgewichts- und Dissoziationskonstanten ableiten.

### 3.6.1. Kopplung von His-getaggttem Protein

In dieser Arbeit wurde das Biacore T200 (GE Healthcare, München, Deutschland) mit einem GE Series S NTA-Sensorchip (ebenfalls GE) genutzt. Die Messungen erfolgten, indem der Sensorchip mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen beladen, das His-getaggte Protein an die Nickelionen gebunden und der Chip nach der Messung mit EDTA regeneriert wird (Nieba *et al.* 1997). Die Messbedingungen waren T=25 °C, Datenaufnahmerate 10 Hz bei dualer Detektion beider Flusskammern. Die Vorgehensweise zweier paralleler Flusszellen und Aufnahme von Puffermessungen diente der doppelten Referenzierung. Vor der Beladung mit Protein wurde das Biacore-Gerät systematisch durchgeprüft und der Chip im SPR-Laufpuffer gepriimt, um Detektorschwankungen der einzelnen Flusszellen auszugleichen. Zusätzlich ist der Refraktionsindex lediglich linear zur Anzahl gebundener Analyten, wenn die SPR-Antwort durch 70 % Glyzerin normalisiert wurde.

Der Chip wurde dreimal mit 0,35 M EDTA für 60 s, 20 µl/min regeneriert und dreimal im SPR-Laufpuffer gewaschen. Nicht-spezifische Bindung wurde durch Zugabe von 0,005 % Tween-20 zum SPR-Laufpuffer reduziert. Dann wurde die Oberfläche mit 0,5 mM NiCl<sub>2</sub> für 60 s bei 10 µl/min beladen und erneut gewaschen. Jeweils zwei der vier Flusskammern wurden parallel verwendet, indem eine Flusskammer mit His-Ubiquitin als Referenz und die zweite mit dem Liganden His-Ubiquitin-NS5A(333-369) beladen wurden. Beide Kammern wurden nach 60 s bei 30 µl/min Waschen und Stabilisieren zeitgleich für den Analyten Bin1 SH3 bzw. Bin1 Tandem-SH3 im SPR-Laufpuffer geöffnet. Die Einzelzykluskinetiken (Karlsson *et al.* 2006) wurden jeweils bei fünf verschiedenen Konzentrationen mit 90 s Kontaktzeit und 1800 s Dissoziationszeit in beiden Flusskammern aufgenommen.

---

**SPR-Laufpuffer (HBS-N)**

10 mM HEPES pH 7,4

150 mM NaCl

0,005 % Tween-20

5 mM β-Mercaptoethanol

---

### 3.6.2. Bindungsstudien von Bin1 SH3 und NS5A(333-369)

Für die Einzelzykluskinetiken wurden der Chip wie im vorigen Kapitel beschrieben vorbereitet und dann mit zwei unterschiedlichen Mengen His-getagtem Protein gekoppelt. Es wurden 0,03  $\mu\text{M}$  His-Ubiquitin und 0,03  $\mu\text{M}$  His-Ubiquitin-NS5A(333-369) für jeweils 210 s oder 420 s bei 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  immobilisiert. Vor der Messung wurden die beiden Analyten Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3 exzessiv im SPR-Laufpuffer dialysiert. Bin1 SH3 wurde bis zu einer maximalen Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  eingesetzt und im SPR-Laufpuffer fünf Mal 1/3 verdünnt. Bin1 Tandem-SH3 wurde bis zu einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  eingesetzt und in gleicher Weise wie Bin1 SH3 verdünnt. Damit betragen die Konzentrationen im Falle des Bin1 SH3 12 nM; 37 nM; 110 nM; 330 nM und 1000 nM und des Bin1 Tandem-SH3 6 nM; 18,5 nM; 55,6 nM; 162 nM und 500 nM. Die Flussrate betrug 30  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

Zur nahezu lückenlosen Bestimmung der Einzelzykluskinetiken wurde für jeweils 420 s bei 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  0,01  $\mu\text{M}$  His-Ubiquitin in der ersten Flusskammer und 0,01  $\mu\text{M}$  His-Ubiquitin-NS5A(333-369) in der zweiten Flusskammer eingesetzt. Dann wurden drei Verdünnungsreihen mit jeweils fünf Schritten angelegt: für Bin1 SH3 mit einer maximalen Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  wurde der Verdünnungsfaktor 5 gewählt, bei 2,5  $\mu\text{M}$  der Faktor 3 und mit 1  $\mu\text{M}$  der Faktor 2, sowie für Bin1 Tandem-SH3 bei 1  $\mu\text{M}$  der Faktor 5, bei 0,83  $\mu\text{M}$  der Faktor 3 und bei 0,5  $\mu\text{M}$  der Faktor 2. Von Bin1 SH3 wurden die Konzentrationen 0,01  $\mu\text{M}$ ; 0,03  $\mu\text{M}$ ; 0,04  $\mu\text{M}$ ; 0,06  $\mu\text{M}$ ; 0,09  $\mu\text{M}$ ; 0,13  $\mu\text{M}$ ; 0,2  $\mu\text{M}$ ; 0,25  $\mu\text{M}$ ; 0,28  $\mu\text{M}$ ; 0,5  $\mu\text{M}$ ; 0,83  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  und von Bin1 Tandem-SH3 die Konzentrationen 0,002  $\mu\text{M}$ ; 0,008  $\mu\text{M}$ ; 0,01  $\mu\text{M}$ ; 0,031  $\mu\text{M}$ ; 0,04  $\mu\text{M}$ ; 0,063  $\mu\text{M}$ ; 0,093  $\mu\text{M}$ ; 0,125  $\mu\text{M}$ ; 0,2  $\mu\text{M}$ ; 0,25  $\mu\text{M}$ ; 0,278  $\mu\text{M}$ ; 0,5  $\mu\text{M}$ ; 0,833  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  injiziert. Die Flussrate während der Analytmessungen betrug 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ , um Massentransporteffekte zu minimieren.

### 3.6.3. Datenprozessierung und –analyse

Zur Auswertung der SPR-Daten wurde das Programm Evaluation Software des Biacore T200 (GE Healthcare, München, Deutschland) genutzt. Alle Daten wurden doppelt referenziert (Myszka 1999), in dem erstens das Signal der Referenzzelle von der Messzelle und zweitens eine Messung in Puffer von der Messung mit Proben subtrahiert wurde. Folgende Interaktionsmodelle standen zur Verfügung, s. Tabelle 9.

- 1:1-Langmuir. 1:1-Bindung mit monovalenten Analyten und Liganden
- Bivalenter Analyt. Wenn ein Analyt zwei identische Bindestellen hat und eine bereits von einem Liganden belegt ist, kann ein zweiter Ligand die andere Bindestelle belegen und den Ligand-Analyt-Komplex stabilisieren, ohne dass es zu einer weiteren Erhöhung des RU-Werts kommt. Das wird, wenn beide Ratenkonstanten gleich sind und keine kooperativen Effekte auftreten, als Avidität bezeichnet.
- Heterogener Analyt. Für Interaktionen zweier Analyten, die um die gleiche Ligandenbindestelle konkurrieren, werden Konzentrationen und molekulare Massen beider Analyten benötigt. Der Analyt mit der größeren Masse dominiert die Antwort im Sensorgramm.

- Zwei Konformationen des Analyten. Dieses Modell beschreibt eine 1:1-Bindung unter konformationeller Änderung zur Stabilisierung des Komplexes, der zu keiner weiteren SPR-Antwort führt. Dieser Komplex kann lediglich dissoziieren nach inverser, reversibler Konformationsänderung.
- Heterogener Ligand. Die Bindekurve ist die Summe der Interaktionen eines Analyten an zwei unabhängige Liganden.

Das Gesamtsignal, „bulk signal“, wird hervorgerufen durch Änderungen des Refraktionsindices, RI, zwischen dem Laufpuffer und dem Puffer des Analyt durch die Proteinkonzentration, die Verdünnung oder andere Pufferkomponenten. Mit Einführung des RI werden, obwohl die Komponente klein ist und keine Sprünge in den Kurven hervorrufen sollte, die Kurven besser beschrieben, da diese den Analytkonzentrationen angepasst werden. Jedoch werden durch RI noch weitere lokal angepasbare Parameter hinzugefügt.

Für die Gleichgewichtsanalyse wurde die Sättigungsantwort gegen die Analytkonzentration aufgetragen und das Programm Origin Version 8 zur Auswertung verwendet.

Bei einer Bindestelle wurde nach

$$R_{eq} = \frac{R_{max} [A]}{K_A + [A]}$$

Gleichgewichtsantwort einer spezifischen Analytkonzentration  $R_{eq}$   
Theoretische Bindekapazität  $R_{max}$   
Assoziationskonstante  $K_A$   
gefittet.

Die maximale Antwort  $R_{max}$  und die Dissoziationskonstante  $K_D$  wurden durch nicht-lineares Fitten erhalten.

Die Aktivität wurde aus der Gleichung

$$\text{Aktivität [\%]} = \frac{R_{max} [L] * 100}{R_{ligand} [A]}$$

berechnet.

Tabelle 9. Übersicht der verwendeten Interaktionsmodelle zur kinetischen Auswertung von SPR- und BLI-Daten.

Name	Reaktionsschema	Gleichungen und Parameter
<b>1:1-Langmuir</b>	$A + L \xrightleftharpoons[k_d]{k_a} AL$	$\frac{d[L]}{dt} = -(k_a[A][L] - k_d[AL])$ $\frac{d[AL]}{dt} = k_a[A][L] - k_d[AL]$ <p>           Analytkonzentration [A] in M            Ligandkonzentration [L] in M            Konzentration des Liganden:Analyt-Kompex [AL] in M            Assoziationsratenkonstante <math>k_a</math> in <math>M^{-1} s^{-1}</math>            Dissoziationsratenkonstante <math>k_d</math> in <math>s^{-1}</math> </p>
<b>Bivalenter Analyt</b>	$A + L \xrightleftharpoons[k_{d1}]{k_{a1}} AL$ $AL + L \xrightleftharpoons[k_{d2}]{k_{a2}} ALL$	$\frac{d[L]}{dt} = -(k_{a1}[A][L] - k_{d1}[AL]) - (k_{a2}[AL][L] - k_{d2}[ALL])$ $\frac{d[AL]}{dt} = (k_{a1}[A][L] - k_{d1}[AL]) - (k_{a2}[AL][L] - k_{d2}[ALL])$ $\frac{d[ALL]}{dt} = (k_{a2}[AL][L] - k_{d2}[ALL])$ <p>           Assoziationsratenkonstante <math>k_{a1}</math> in <math>M^{-1} s^{-1}</math>            Dissoziationsratenkonstanten <math>k_{d1}</math> und <math>k_{d2}</math> in <math>s^{-1}</math>            Assoziationsratenkonstante <math>k_{a2}</math> in <math>M^{-1} s^{-1}</math>            Konzentration des Analyt-2Liganden-Komplexes [ALL] in M         </p>
<b>Heterogener Analyt</b>	$A_1 + L \xrightleftharpoons[k_{d1}]{k_{a1}} A_1L$ $A_2 + L \xrightleftharpoons[k_{d2}]{k_{a2}} A_2L$	$\frac{d[L]}{dt} = -\frac{(k_{a1}[A_1]M_1[L] - k_{d1}[A_1L])}{M_1N_1} - \frac{(k_{a2}[A_2]M_2[L] - k_{d2}[A_2L])}{M_2N_2}$ $\frac{d[A_1L]}{dt} = (k_{a1}[A_1]M_1[L] - k_{d1}[A_1L])$ $\frac{d[A_2L]}{dt} = (k_{a2}[A_2]M_2[L] - k_{d2}[A_2L])$ <p>           Assoziationsratenkonstanten <math>k_{a1}</math> und <math>k_{a2}</math> in <math>M^{-1} s^{-1}</math>            Dissoziationsratenkonstanten <math>k_{d1}</math> und <math>k_{d2}</math> in <math>s^{-1}</math>            Konzentrationen der Analyten <math>[A_1]</math> und <math>[A_2]</math> in M            Konzentrationen der Liganden:Analyt-Komplexe <math>[A_1L]</math> und <math>[A_2L]</math> in M            Molekulare Massen der Analyten <math>M_1</math> und <math>M_2</math>            Stöchiometrien <math>N_1</math> und <math>N_2</math> </p>
<b>Zwei-Konformationen</b>	$A + L \xrightleftharpoons[k_d]{k_a} AL$ $AL \xrightleftharpoons[k_{-konf}]{k_{konf}} AL^*$	$\frac{d[L]}{dt} = -(k_a[A][L] - k_d[AL])$ $\frac{d[AL]}{dt} = (k_a[A][L] - k_d[AL]) - (k_{konf}[AL] - k_{-konf}[AL^*])$ $\frac{d[AL^*]}{dt} = (k_{konf}[AL] - k_{-konf}[AL^*])$ <p>           Konformationelle Änderung <math>k_{konf}</math> und <math>k_{-konf}</math> in <math>s^{-1}</math>            Konzentration des Ligand:Analyt-Komplex mit geänderter Konformation <math>[AL^*]</math> in M         </p>
<b>Heterogener Ligand</b>	$A + L_1 \xrightleftharpoons[k_{d1}]{k_{a1}} AL_1$ $A + L_2 \xrightleftharpoons[k_{d2}]{k_{a2}} AL_2$	$\frac{d[L_1]}{dt} = -(k_{a1}[A][L_1] - k_{d1}[AL_1])$ $\frac{d[L_2]}{dt} = -(k_{a2}[A][L_2] - k_{d2}[AL_2])$ $\frac{d[AL_1]}{dt} = k_{a1}[A][L_1] - k_{d1}[AL_1]$ $\frac{d[AL_2]}{dt} = k_{a2}[A][L_2] - k_{d2}[AL_2]$ <p>           Konzentrationen der Liganden <math>[L_1]</math> und <math>[L_2]</math> in M            Konzentrationen der Liganden:Analyte-Komplexe <math>[AL_1]</math> und <math>[AL_2]</math> in M         </p>

### 3.7. Bio-Layer Interferometrie (BLI)

Eine weitere markierungsfreie Methode zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Biomolekülen in Echtzeit bietet die Bio-Layer Interferometrie. Vorteil dieser Methode in Bezug zur SPR ist, dass biologische Proben wie Zellkulturmedien und Zellysate untersucht werden können. Die Firma FortéBIO (Pall, Menlo Park, USA) bietet mit ihrem Octet-System ein Gerät zur BLI-Messung an. Die Sensoren sind Spitzen, die mit einem optischen Oberflächenmaterial ausgestattet sind, auf der eine inerte Matrix mit modifizierbaren, chemischen Gruppen lokalisiert ist. Wie bei SPR-Sensorchips stehen auch für diese Technik unterschiedliche oberflächenbehandelte Sensorspitzen bereit, auf denen Biomoleküle immobilisiert werden können. Die immobilisierten Biomoleküle auf den Spitzen werden durch einen Roboter in 96 „well plate“ mit den zur Analyse benötigten Puffern und Interaktionspartnern getaucht. Die Messung erfolgt durch weißes Licht, das durch die Spitzen gestrahlt wird und das an den Oberflächen zur Matrix, an den immobilisierten Biomolekülen und deren Interaktionspartnern, an der Grenzschicht zum Lösungsmittel reflektiert wird. Das reflektierte Licht, das mit den Grenzschichten interagiert hat, zeigt eine andere Interferenz als das eingestrahelte Licht, so wird eine konstruktive oder destruktive Interferenz erhalten. Die Änderung der Wellenlängen, bei denen Maxima auftreten, ist proportional zur Schichtdicke der Spitzen, wodurch Assoziation und Dissoziation von Analyten verfolgt werden können. In den verwendeten 96 „well plate“ werden der Breite nach acht Messungen parallel durchgeführt, sodass zeitgleich acht verschiedene Konditionen beobachtet werden können. Mit der Messung können Assoziations- und Dissoziationsraten bis in den subnanomolaren Bereich, Konzentrationen und Bindespezifität erhalten werden.

#### 3.7.1. Bindungsstudien von Bin1 SH3 und NS5A(333-369)

Es wurden mit  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-beladene Spitzen verwendet, um das Protein His-Ubiquitin-NS5A(333-369) zu immobilisieren. Die Messbedingungen betragen  $T=30\text{ °C}$  mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 1000 rpm und einer Datenaufnahmerate von 5 Hz. Eine Messung bei  $25\text{ °C}$  zur besseren Vergleichbarkeit zu SPR-Messungen war nicht gegeben, da dieses Gerät bei Umgebungstemperatur stand und lediglich eine Heizfunktion besaß, darum musste eine Messung stets oberhalb der Raumtemperatur durchgeführt werden. Die zur Messung verwendeten Volumina betragen jeweils  $200\text{ }\mu\text{l}$ . Die  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Spitzen wurden mit  $2\text{ }\mu\text{g/ml}$  His-Ubiquitin-NS5A(333-369) beladen und sieben unterschiedliche Konzentrationen von Bin1 SH3 startend ab  $1\text{ }\mu\text{M}$  mit einer Verdünnungsrate von zwei untersucht. Die Basislinie wurde über 60 s ermittelt, dann 100 s His-Ubiquitin-NS5A(333-369) immobilisiert und eine weitere Basislinie über 300 s aufgenommen. Die Assoziation von Bin1 SH3 erfolgte über 120 s und die Dissoziation über 180 s.

Die Spitzen mit dieser His-Ubiquitin-NS5A(333-369)-Beladung wurden auch für die Interaktionsstudie mit Bin1 Tandem-SH3 genutzt, wobei die Bin1 Tandem-SH3-Konzentration mit  $0,5\text{ }\mu\text{M}$  um die Hälfte im Vergleich zu Bin1 SH3 reduziert wurde. Die Basislinie wurde über 120 s, die Assoziation über 300 s und die Dissoziation über 383 s aufgenommen.

### 3.7.2. Datenprozessierung und –analyse

Die Datenprozessierung erfolgte mit dem von FortéBIO Octet beigefügten Programm. Hiermit wurde auch die Datenanalyse durchgeführt und ergänzt mit Origin für die Gleichgewichtsanalyse. Dabei wurden dieselben Gleichungen zugrunde gelegt wie bei der SPR-Datenanalyse laut Kapitel 3.6.3.

## 3.8. Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Neben SPR und BLI ist auch die isotherme Titrationskalorimetrie eine markierungsfreie Methode zur kinetischen Bestimmung von Interaktionen zwischen Biomolekülen. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Techniken, SPR und BLI, werden bei der ITC keine stationären Phasen verwendet, auf die Biomoleküle aufgebracht werden. Aus SPR und BLI-Daten lassen sich weder kinetische und thermodynamische Daten von frei in Lösung vorliegenden Liganden und Analyten erhalten noch intermediären Zustände erfassen, dazu kann ITC verwendet werden. Tritt während der Zugabe eines Interaktionspartners zu einem vorgelegten Liganden eine Temperaturänderung auf, so ist die ITC in der Lage, diese Temperaturänderung zu detektieren. SPR ist außerdem insensitive bezüglich der durch die Assoziation verdrängten oder der in den Komplex eingebrachten Wassermoleküle. Anhand der Differenz zwischen minimaler und maximaler Heizleistung lässt sich aus ITC-Experimenten die Bindungsenthalpie  $\Delta H$ , aus der inversen Steigung die Assoziationskonstante  $K_a$  und aus dem Wendepunkt die Stöchiometrie  $N$  ablesen. Außerdem erfolgt eine thermodynamische Analyse unter Bestimmung der Entropieänderung  $\Delta S$ .

Das Kalorimeter ist aus zwei Kammern aufgebaut, einer Referenzzelle und einer Probenzelle, die beide aus einem extrem temperaturleitfähigen Material bestehen, um auch kleinste Temperaturänderungen zwischen beiden Zellen wahrzunehmen. Während die Referenzzelle typischerweise mit Wasser gefüllt ist, enthält die Probenzelle Biomoleküle, zu denen durch eine Spritze in Intervallen der Interaktionspartner injiziert wird. Durch die Zugabe des Analyten wird entweder eine exotherme oder endotherme Reaktion beobachtet. Die Messung erfolgt durch eine konstante Anpassung der Temperaturen beider Zellen mit einer Heizung. So tritt bei z. B. exothermen Reaktionen, bei der Reaktionswärme freigesetzt wird, ein Wärmeüberschuss in der Messzelle auf. Der Heizstrom der Messzelle wird verringert und das Messsignal ist negativ. Die dazu benötigte Stromstärke wird zeitlich ermittelt, dabei treten große Änderungen der Stromstärke direkt bei der Zugabe der Ligandlösung, sogenannte Spitzen, auf. Die Messwerte werden integriert und gegen die Ligand:Analyt-Konzentrationsverhältnisse aufgetragen.

### 3.8.1. Bindungsstudien von Bin1 SH3 und NS5A-Konstrukten

Die Bindungsstudien von Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3 mit NS5A wurden an dem ITC Gerät MicroCal iTC 200 (GE Healthcare, München, Deutschland) durchgeführt. Bei der Wahl des Puffers ist zu beachten, dass unter Bildung des Komplexes Protonen aufgenommen oder abgegeben werden, daher muss eine äquivalente Anzahl an Protonen vom Puffer

aufgenommen oder abgegeben werden. Wenn der Puffer eine hohe Ionisationsenthalpie hat, enthält die gemessene Enthalpie Anteile von der Bildung des Komplexes und auch welche von der Ionisation des Puffers. Der für die Messung verwendete Puffer bestand aus 1x PBS pH 7,4 mit 0,2 mM Tris(2-Carboxyethyl) Phosphine, TCEP. Es wurde mit PBS ein Puffer verwendet, der eine vernachlässigbare Enthalpieänderung aufweist, somit konnten Protonierungseffekte nicht beobachtet werden. Da die Bindestelle des Bin1 SH3 und ebenso der Ligand aus überwiegend hydrophoben Aminosäuren bestehen, wurden jedoch diese Effekte vernachlässigt. Eine Änderung der Temperatur zwischen Mess- und Referenzzelle lässt auf eine Interaktion oder Verdünnungswärme schließen. Da somit der Puffer große Auswirkungen auf die Enthalpie hat, wurden die Reaktionsteilnehmer exzessiv gegen Puffer dialysiert. Ansonsten wäre die Mischenthalpie der verschiedenen Lösungen in der Messzelle größer als die Bindungsenthalpie. Bevor eine Protein-Protein-Interaktionsmessung gestartet wurde, wurde zunächst Wasser in Wasser titriert, um Gerätefehler auszuschließen, und dann eine Peptid-in-Puffer-Messung durchgeführt, um diese von den Interaktionsmessungen subtrahieren zu können. Anschließend erfolgte die Einstellung der optimalen Protein- und Peptidkonzentration, um eine vollständige Bindekurve mit klar erkennbaren Asymptoten zu erhalten, folglich wurden zur Qualitätskontrolle entweder Replikate oder um 20-40 % leicht veränderte Proteinkonzentrationen eingesetzt.

Es war notwendig die Peptidkonzentration als variabler Parameter bei der ITC-Auswertung zu nutzen, da Abhängigkeiten zwischen  $N$ ,  $\Delta H$ ,  $K_D$  und den eingesetzten Konzentrationen bestehen. Fehler in der Peptidkonzentration tragen zu systematischen Abweichungen in der temperaturabhängigen Bestimmung der  $\Delta H_0$ ,  $\Delta S_0$  und  $\Delta C_p$  bei. Da die Konzentrationsbestimmung der Peptide wegen mangelnder Tryptophan-Fluoreszenz nicht eindeutig mit UV-VIS-Spektrometrie bestimmt werden konnten, wurden die Konzentrationen aus Messungen von Bradford-, BCA-„Assay“ und Infrarotspektroskopie gemittelt. Die Abweichungen der Konzentrationsbestimmungen für die einzelnen Peptide lagen bei 6 % für NS5A(347-361), 9 % für NS5A(341-361) und für His-Ubiquitin-NS5A(333-369).

- NS5A(347-361)

Für die Messungen mit dem Peptid NS5A(347-361) wurden 19 Injektionen à 2  $\mu$ l mit 180 s Wartezeit zwischen den einzelnen Injektionen bei einer Mischgeschwindigkeit von 1000 rpm durchgeführt. Es wurden 0,7 mM NS5A(347-361) für die Spritze und 50  $\mu$ M Bin1 Tandem-SH3 in der Messzelle bei  $T=25$  °C eingesetzt. Es wurden 0,7 mM NS5A(347-361) mit 100  $\mu$ M Bin1 SH3 für  $T=30$  °C und  $T=37$  °C eingesetzt, wobei bei  $T=30$  °C lediglich 100 s und bei  $T=37$  °C 120 s zwischen den Injektionen gewartet wurde. Für Messungen bei  $T=30$  °C und  $T=37$  °C wurden 350  $\mu$ M NS5A(347-361) und 25  $\mu$ M Bin1 Tandem-SH3 eingesetzt und 120 s zwischen den Injektionen gewartet. Die Messung von Bin1 SH3 und NS5A(347-361) bei  $T=25$  °C wurde bereits veröffentlicht (Aladag *et al.* 2014).

- NS5A(341-361)

Zur Messung von Bindungskinetiken zwischen NS5A(341-361) und Bin1 SH3 sowie Bin1 Tandem-SH3 wurden wie bei NS5A(347-361) 19 Injektionen à 2  $\mu$ l mit 180 s Wartezeit zwischen den einzelnen Injektionen bei einer Mischgeschwindigkeit von 1000 rpm

durchgeführt. Es wurden bei jeweils  $T=25\text{ °C}$  und  $T=37\text{ °C}$   $0,8\text{ mM}$  NS5A(341-361) und  $80\text{ }\mu\text{M}$  Bin1 SH3 bzw.  $40\text{ }\mu\text{M}$  Bin1 Tandem-SH3 eingesetzt.

- NS5A(333-369)

Außerdem wurde His-Ubiquitin-NS5A(333-369) mit Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3 mittels ITC untersucht. Wiederum wurden 19 Injektionen à  $2\text{ }\mu\text{l}$  und  $140\text{ s}$  Wartezeit bei einer Mischgeschwindigkeit von  $1000\text{ rpm}$  verwendet. Die eingesetzten Konzentrationen waren  $250\text{ }\mu\text{M}$  His-Ubiquitin-NS5A(333-369) und  $25\text{ }\mu\text{M}$  Bin1 SH3 bzw.  $12\text{ }\mu\text{M}$  Bin1 Tandem-SH3.

### 3.8.2. Datenprozessierung und –analyse

Die Datenprozessierung and –analyse von ITC-Messungen erfolgte mit dem vom Hersteller bereitgestellten Programm Origin 7 für MicroCal iTC 200 (GE Healthcare, München, Deutschland). Die Messwerte stellen die Stromstärkeänderungen bei Ligandzugabe dar, die durch die Software integriert werden. Die Peptid-in-Puffer-Messungen wurden von den Protein-Protein-Interaktionsmessungen subtrahiert und mit den installierten 1:1-Bindemodellen gefittet. Der Ligand ist als die Spezies definiert, der lediglich eine Bindestelle aufweist.

Für eine reversible Interaktion beschreibt die Enthalpieänderung die Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstante  $K$  durch die van't Hoff-Beziehung

$$\Delta H^\circ = -R \left( \frac{\partial \ln K}{\partial 1/T} \right)$$

Die instantane Steigung im Diagramm  $\ln K$  gegen  $1/T$  multipliziert mit inverser Gaskonstante  $R$  definiert  $\Delta H^\circ$ . Die van't Hoff-Methode wird als intrinsische Methode ausgewiesen, während die kalorimetrische Enthalpie auch andere begleitende Reaktionen anzeigt (Horn *et al.* 2001). Die temperaturabhängigen Parameter werden beeinflusst von der Änderung der Heizkapazität zwischen freier und gebundener Form,  $\Delta C_p$ , nach

$$\Delta H_D = \Delta H_0 + \Delta C_p (T - T_0)$$

$$\Delta S_D = \Delta S_0 + \Delta C_p \ln \left( \frac{T}{T_0} \right)$$

$$K_D = e^{\frac{-\Delta H_D + T \Delta S_D}{RT}}$$

Dissoziationsenthalpie und -entropie bei gegebener Temperatur  $\Delta H_0$  und  $\Delta S_0$   
Referenztemperatur  $T_0$

Die Durchführung von Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen lässt die Bestimmung der Änderung der Wärmekapazität  $\Delta C_p$  zu. Da Messungen in wässrigem Lösungsmittel eine hohe Änderung der Heizkapazität  $\Delta C_p$  zeigen, wird die instantane Steigung zur Auswertung gewählt.

### 3.9. Analytische Größenausschlusschromatographie

Zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius eines Proteins oder eines Proteinkomplexes kann die Größenausschlusschromatographie, Einleitung s. Kapitel 3.3.3, verwendet werden. Unter gleichen Experimentbedingungen – wie Verwendung einer Chromatographiesäule, eines Puffers und gleicher Flussrate – können hydrodynamische Radien verglichen werden. Dazu werden mehrere globuläre Proteine bekannter Masse aufgetragen und zur Erstellung einer Kalibrierungsgeraden separiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Superdex 75 16/600 mit einer Flussrate von 1 ml/min und dem SH3-Dialysepuffer, s. Kapitel 3.3.4, verwendet. Je 0,5 g der Kalibrierungsproteine Ribonuklease A (M=13700 Da), Carboanhydrase (M=29000 Da) und Aprotinin (M=6512 Da) wurden abgewogen und in 0,5 ml SH3-Dialysepuffer suspendiert. Die Retentionsvolumina dieser drei Proteine wurden zur Erstellung einer Kalibrierungsgeraden in einem Diagramm, in dem Retentionsvolumen gegen molekulare Masse aufgetragen wurde, genutzt. Die Kalibrierung zur analytischen Größenausschlusschromatographie erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die Messungen von Bin1 Tandem-SH3 und vom Komplex Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361) im Verhältnis von 1:1. Von 100 µM Bin1 Tandem-SH3 und von 500 µM [ $U\text{-}^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ] Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361) im 1:1 Komplex wurden jeweils 100 µl appliziert. Dabei wurde das Protein bei  $\lambda=280$  nm und das Peptid NS5A(341-361) bei  $\lambda=214$  nm observiert. Die Auswertung erfolgt durch Berechnung der molekularen Masse der untersuchten Proteine aus der Kalibrierungsgeraden.

### 3.10. Röntgenstrukturanalyse

Die Proteinkristallographie ist die dominierende Methode zur Bestimmung dreidimensionaler Strukturen von biologischen Makromolekülen. Im Gegensatz zu NMR ist hinsichtlich der molekularen Masse keine Limitierung gesetzt, allerdings können hiermit keine dynamischen Prozesse analysiert werden. Die Kristallographie umfasst folgende chronologische Schritte: die Kristallisation des Proteins, die Aufnahme von Beugungsdaten, die Auswertung der Intensitäten, die Phasenbestimmung und die Interpretation der Elektronendichtekarten.

#### 3.10.1. Proteinkristalle

Die Verfügbarkeit von Proteinkristallen ist die Grundvoraussetzung für ein Röntgenbeugungsexperiment. Das Protein sollte eine hohe Reinheit aufweisen, um einen Einkristall, bestehend aus einem dreidimensionalen, periodisch angeordneten Gitter, zu generieren. Die verwendeten Lösungen wurden darum vorab mit einem 0,22 µm Porenfilter filtriert und die Proteinprobe bei 21000 g zentrifugiert. Nur Einkristalle erzeugen ein bevorzugtes Röntgenbeugungsmuster. Um geeignete Bedingungen zu finden, bei denen ein Protein kristallisiert, werden verschiedene Parameter beeinflusst. Dazu zählen Salze, z. B. zur Maskierung von Oberflächenladungen (Cohn *et al.* 1927), organische Lösungsmittel, die die Dielektrizitätskonstante des Mediums verringern, Polymere wie Polyethylenglycol, PEG, die

das effektive Lösungsvolumen verringern. Zusätzlich wird die Kristallbildung von der Temperatur und vom pH-Wert beeinflusst, da ein Protein die geringste Löslichkeit am isoelektrischen Punkt aufweist. Eine der weitverbreiteten Methoden zur Kristallisation ist die Dampfdiffusion (McPherson 1982). In einem nach außen abgetrennten Raum tauschen Reservoirlösung und ein Tropfen aus Protein und Reservoirlösung durch Dampfdiffusion Wasser über die Gasphase aus. Mittels Dampfdiffusion erhöht sich durch langsame Abnahme des Lösungsmittels im Proteintropfen sowohl die Protein- als auch die Fällungsmittelkonzentration. Ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen Lösung und kristalliner Phase als Funktion der Proteinkonzentration zum Fällungsmittel wird hergestellt. Die Kristallisation beginnt *de novo* bei einer Übersättigung in der sogenannten Nukleationszone, wodurch bevorzugt viele kleine Kristalle entstehen. Beim Durchlaufen der Nukleationszone und erhöhter Übersättigung bildet sich amorphes Präzipitat. Durch Abnahme der in Lösung befindlichen Proteinkonzentration nach der Keimbildung wird die metastabile Phase erreicht, in der Kristalle lediglich wachsen können. Für die Züchtung einzelner, großer Kristalle sollte die Lösung daher im metastabilen Bereich gehalten werden.

Eine Methode, um Kristallisationsbedingungen für Proteine, die zuvor noch nicht kristallisiert wurden wie Bin1 Tandem-SH3, zu finden, beruht auf schon bekannten Bedingungen anderer erfolgreicher Proteinkristallisationen. Mit diesem statistischen Ansatz nach dem Prinzip des „sparse matrix screens“ (Carter *et al.* 1979, Jancarik *et al.* 1991) wird eine große Vielfalt von Bedingungen parallel getestet. Der Kristallisationsroboter (freedom evo, Tecan, Männedorf, Schweiz) pipettierte 70 µl Reservoirlösung und mischte 0,7 µl Proteinlösung mit 0,7 µl Reservoirlösung im „sitting drop“-Verfahren in 96 „well plates“ (crystal quick plate 96 well ps square U-bottom lowprofile, Greiner Bioone, Frickenhausen, Deutschland). Die fertiggestellten Ansätze wurden mit selbstklebender Folie abgedichtet. Unter den faktoriellen Kristallisationsbedingungen wurden die Screens verwendet von

PEG Suite I/II (Qiagen, Hilden, Deutschland)  
PEG low ion (Sigma, Buchs, Schweiz)  
Wizard I/II (Rigaku, Bainbridge Island, USA)  
Crystal I/II (Hampton Research, Aliso Viejo, USA)

mit 20 mg/ml Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361) im Verhältnis 1:1, d. h. dem holo-Zustand des Bin1 Tandem-SH3. Unter diesen Bedingungen fanden sich mehr als 50 % klare Tropfen, da die Protein:Peptid-Konzentration nicht ausreichte, um die Nukleationszone zu erreichen. Folglich wurde die Protein:Peptid-Konzentration auf 60 mg/ml erhöht und unter einigen der meist favorisierten Bedingungen wiederholt. Die Screens mit 60 mg/ml Protein:Peptid im 1:1-Komplex wurden ebenfalls in 96 „well plate“ angesetzt mit

PEG Suite I/II (Qiagen, Hilden, Deutschland)  
JCSG core I (Qiagen, Hilden, Deutschland).

Gezielt wurden unter den geeigneten Bedingungen die Volumina vergrößert, damit veränderte sich die Methode der Dampfdiffusion vom „sitting drop“ der faktoriellen Bedingungen zur „hanging drop“-Methode. Der Tropfen aus Protein- und Reservoirlösung hängt dabei über dem Reservoir in einem nach außen hin versiegelten Milieu. Dazu wurden 24 „well plates“ (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) mit 600 µl

Reservoirlösung besetzt und mit Deckgläschen, auf denen Tropfen mit 2  $\mu$ l Proteinlösung und 2  $\mu$ l Reservoirlösung sitzen, abgedeckt. Hierbei wurden sowohl die apo-Form Bin1 Tandem-SH3 ohne Ligand als auch die holo-Form mit Ligand kristallisiert. Folgende Konditionen bei konstantem Puffer 0,1 M MES pH 6,5 wurden getestet, s. Tabelle 10.

Die Kristalle aus dem faktoriellen Ansatz wurden in ihren Kryobedingungen untersucht. Dies diente dem Schutz des Kristalls vor Eisbildung und Aufsprengen des Kristalls im 100 K kalten N<sub>2</sub>-Strom. Ohne Zugabe von Glycerin oder PEG 200 waren die Kristalle in einem Strom flüssigen Stickstoffs einzufrieren. Die Kryobedingungen der „hanging drop“-Methode unterschieden sich zwischen Ansätzen mit und ohne Ligand. Mit Ligand bildete sich eine ölige Phase aus, und die Kristalle waren ohne Zugabe von Kryomitteln einfrierbar, solche ohne Ligand hatten keine Öltröpfchen und wurden ohne Zugabe von Kryomittel im Stickstoffstrom trüb. Schon wenige  $\mu$ l einer Lösung der Kristallisationsbedingung mit 5 % PEG 200 führten zur Kryofähigkeit. Die Kristalle wurden in einer Kryoschleife aus dem Kristallisationstropfen entnommen, auf dem Goniometer montiert und möglichst schnell in den 100 K kalten N<sub>2</sub>-Strom eingebracht. Dieser laminare N<sub>2</sub>-Strom verhinderte Strahlenschäden wie Radikalbildung, die zu Kristallgitter- und Diffraktionsänderungen führen.

Tabelle 10. In Verfeinerungstest zur Kristallisation von Bin1 Tandem-SH3.

Die Produktion von Kristallen wurde unter folgenden Bedingungen überprüft. Neben den Bedingungen sind die verwendeten Konzentrationen aufgelistet

Bedingung	Konzentration
<b>Protein</b>	40 mg/ml, 60 mg/ml, 120 mg/ml
<b>Ammoniumsulfat</b>	0,1 M, 0,2 M, 0,3 M, 0,4 M
<b>PEG 6000</b>	25 %, 30 %, 35 %, 40 %
<b>PEG 2000MME</b>	25 %, 28 %, 30 %, 32 %, 35 %, 36 %, 38 %, 40 %, 42 %, 44 %, 46 %, 48 %
<b>Peptidverhältnis</b>	0, 1, 2, 4

### 3.10.2. Diffraktionsaufnahme

Von diesem Einkristall wurden Röntgenbeugungsaufnahmen aufgenommen. Dazu wurde in dieser Arbeit statt dem üblicherweise verwendeten Synchrotron eine Röntgendrehanode (Bruker-Nonius FR591, Delft, Niederlande) mit 40 kV, 70 mA genutzt. Der monochromatische Röntgenstrahl mit einer Wellenlänge von  $K_{\alpha}:\lambda=1,5418 \text{ \AA}$  traf auf den Kristall, der in einer Schleife in der Mitte eines Goniometers ausgerichtet war, dabei wurde er permanent mit einem laminaren Stickstoffgasstrom gekühlt. Für die Beugungsaufnahmen dienen u. a. CCD-Detektoren. Ein „image plate“-Detektor (MARRESEARCH Imaging Plate mar300, Norderstedt, Deutschland) nahm die Diffraktionsbilder auf, s. Tabelle 11.

Tabelle 11. Diffraktionsaufnahmebedingungen von Bin1 Tandem-SH3

Bedingung	apo-Form	holo-Form
<b>Kristall-Detektor-Abstand dx [cm]</b>	150	150
<b>Belichtungszeit [min]</b>	20	40
<b>Diffraktionsstartpunkt <math>\phi</math> [°]</b>	162	0
<b>Diffraktionsendpunkt <math>\phi</math> [°]</b>	254	88
<b>Rotation <math>\Delta\phi</math> [°]</b>	1	1

### 3.10.3. Auswertung der Diffraktionsdaten

Nach der Aufnahme der Diffraktionsdaten erfolgte die Integration der Daten zur Bestimmung der Reflektionsindizes, der Intensitäten und der Raumgruppe. In der vorliegenden Arbeit wurden die Diffraktionsbilder mit iMosflm (Leslie *et al.* 2007) indiziert und integriert. Die Diffraktionsbilder wurden sortiert und die Einzelbilder skaliert, um die Datenmenge zu reduzieren. Danach erfolgte die Berechnung der Strukturfaktoramplituden. Dazu wurden die Softwareprogramme pointless, aimless und C-truncate, die Teile von CCP4 (Winn *et al.* 2011) sind, verwandt. Die Proteinstruktur kann u. a. mit molekularem Ersatz bestimmt werden, hierbei wurde Molrep, ebenfalls Teil des CCP4, verwandt. Hierbei wurden zur Proteinsequenz des Bin1 Tandem-SH3 verwandte, bereits bekannte Röntgenkristallographiestrukturen mit Swiss-Model (Biasini *et al.* 2014) gesucht und die 90 %ige Sequenzübereinstimmung zu Bin1 SH3 in der Proteindatenbank mit der Nummer 1bb9.pdb genutzt. Die Sequenz wurde um die nicht identischen Aminosäuren korrigiert und die Elektronendichtekarte anhand der initiellen Phasen bestimmt. Während der Verfeinerung wurde der Reflexdatensatz in einen Testdatensatz  $R_{\text{frei}}$  und einen Arbeitsdatensatz  $R_{\text{Arbeit}}$  unterteilt. Die im Testdatensatz enthaltenen 5 % der Reflexe wurden zur Berechnung des sogenannten  $R_{\text{frei}}$ -Wertes herangezogen. Die Strukturverfeinerung wurde in einem iterativen Prozess mit Phenix (Adams *et al.* 2010) und dem Visualisierungsprogramm Coot (Emsley *et al.* 2004) erreicht. Die Verfeinerung brachte die Diffraktionsdaten in Einklang mit dem Modell und die Übereinstimmung wird mit dem R-Wert, unter Verwendung der beobachteten bzw. berechneten Strukturfaktoramplituden  $|\vec{F}_0|$  bzw.  $|\vec{F}_C|$  und des Skalierungsfaktors  $k$ , angegeben

$$R = \frac{\sum_{hkl} |\vec{F}_0| - k |\vec{F}_C|}{\sum_{hkl} |\vec{F}_0|}$$

Die Struktur wurde mit Molprobrity (Chen *et al.* 2010) validiert, indem das Wasserstoffnetzwerk, die Orientierung der Seitenketten von Asparagin, Glutamin und Histidin und sterische Überlagerung überprüft wurden. Außerdem wurde die Proteingeometrie anhand von Bindungslängen und -winkeln, Ramachandran-Diagrammen und Rotameren evaluiert.

Die Berechnung des Lösungsmittelgehalts wurde mit der Matthews-Formel  $V_M$  (Matthews 1968) für beide erhaltenen Datensätze durchgeführt. Dieser Parameter kann bei bekanntem Volumen der Elementarzelle  $V$ , Molekulargewichts des Proteins  $M$ , der Anzahl asymmetrischer Einheiten  $z$  in der Elementarzelle, sowie bekannter Raumgruppe die Anzahl der Proteinkopie  $n$  pro asymmetrische Einheit angeben.

$$V_M = \frac{V}{M z n}$$

Der  $V_M$ -Wert liegt bei Proteinkristallen im Bereich von  $V_M = 1,7 - 3,5 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ . Der Lösungsmittelgehalt berechnet sich dann aus  $S = (1 - 1.23/V_M)$ . Normalerweise nimmt etwa die Hälfte des Volumens eines Proteinkristalls das Lösungsmittel ein.

### 3.11. Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)

Zur Charakterisierung von Strukturen und Dynamiken von Proteinen wird die NMR-Spektroskopie verwendet. Entgegen anderer spektroskopischer Methoden wird der magnetische Anteil elektromagnetischer Wellen statt dem elektrischen Teil verwendet. Zur Messung sind Atomkerne mit einem magnetischen Dipolmoment  $\mu$  nötig, welcher über das gyromagnetische Verhältnis  $\gamma$  des Isotops mit dem quantenmechanischen Eigendrehimpuls  $I$ , dem Spin des Atomkerns, über  $\mu = I \gamma$  verknüpft ist. Kerne, die sowohl eine ungerade Anzahl an Protonen und Neutronen besitzen, haben einen von Null verschiedenen Spin und sind somit NMR-aktiv. Für die Spektroskopie von Biomolekülen sind  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  und  $^{31}\text{P}$  mit einem Spin  $I = 1/2$  wichtig. Von den bei Biomolekülen wichtigen Spin- $1/2$ -Kernen besitzt das Proton das größte gyromagnetische Verhältnis und weist die größte Sensitivität auf, darum wird es in der Flüssig-NMR zur Anregung und Detektion verwendet.

In einem äußeren Magnetfeld  $B_0$  spalten sich die Energieniveaus der Spin- $1/2$ -Kerne in die Spinzustände  $m = +1/2$  und  $m = -1/2$  auf. Das Besetzungsverhältnis dieser beiden Zustände kann durch die Boltzmann-Verteilung beschrieben werden

$$\frac{N_{\downarrow}}{N_{\uparrow}} = e^{\frac{-\hbar \gamma B_0}{k_B T}}$$

Reduziertes Planck'sches Wirkungsquantum  $\hbar = h/2\pi$

Boltzmann-Konstante  $k_B$

Temperatur  $T$

Die Energiedifferenz  $\Delta E$  zwischen den beiden Zuständen kann mit

$$\Delta E = \hbar \gamma B_0$$

ausgedrückt werden. Dabei richtet sich der energetisch günstigere Zustand  $m = +1/2$  parallel und der energetisch ungünstigere  $m = -1/2$  antiparallel zum äußeren Magnetfeld aus. Die Kerne präzedieren entlang der  $B_0$ -Achse mit ihren Larmorfrequenzen  $\omega_0$  abhängig von der Stärke des angelegten Magnetfeldes  $B_0$  und ihrem gyromagnetischen Verhältnis  $\gamma$  nach  $\omega_0 = \gamma B_0$ .

Aufgrund der nach der Boltzmann-Verteilung höheren Besetzung des Zustands  $m = +1/2$  und der Präzession um die  $B_0$ -Achse existiert eine makroskopische Magnetisierung entlang der Magnetfeldachse. Wird ein weiteres Magnetfeld  $B_1$  durch Einstrahlen von Radiowellen appliziert, erfolgt eine Störung der magnetischen Momente der Kernspins. Mittels eines  $90^\circ$ -Pulses entlang der  $x$ -Achse kommt es zur Gleichverteilung der energetischen Zustände und eine makroskopische, rotierende Magnetisierung entsteht entlang der  $y$ -Achse, die hierdurch entstandene Spannungsänderung kann detektiert werden. Durch Relaxationseffekte, Spin-Spin-Relaxation und Spin-Gitter-Relaxation, in denen die Ausgangszustände wiedererlangt werden, entsteht eine abnehmende Exponentialfunktion, sodass das detektierte Signal als freier Induktionsabfall, FID, bezeichnet wird. Mit der Prozessierung durch Fourier-Transformation wird das Signal von der Zeitdomäne in eine Frequenzdomäne umgewandelt und unabhängig von der Magnetfeldstärke  $B_0$  in „parts per million“, ppm, angegeben.

### 3.11.1. Die chemische Verschiebung

Die chemische Verschiebung  $\delta$  ist eine Abweichung von der Larmorfrequenz  $\omega_0$  bedingt durch ein weiteres Magnetfeld, das eine lokale Abschirmung/Entschirmung des Kerns in einem Molekül vom äußeren Magnetfeld durch Elektronenhüllen benachbarter Kerne mit sich bringt. Das Maß der Abschirmung wird mit der Abschirmungskonstante  $\sigma$  beziffert. Aufgrund der wiederkehrenden Anordnung von Kernen im Protein erfahren Kerne im ähnlichen chemischen Umfeld eine vergleichbare chemische Verschiebung. Allerdings ist die chemische Verschiebung abhängig von der Sekundär- und Tertiärstruktur eines Proteins, sowie der Temperatur und des pH-Werts. Als Referenzsubstanzen zur Festlegung von 0 ppm werden die Protonenfrequenzen der isolierten Methylgruppen von Tetramethylsilan, TMS, oder 2,2-Dimethyl-2-Silapentan-5-Sulfonsäure, DSS, verwendet.

$$\delta = \frac{\omega_{\text{Signal}} - \omega_{\text{Referenz}}}{\omega_{\text{Referenz}}} 10^6$$

Ein eindimensionales Protonenspektrum von globulär gefalteten Proteinen weist eine Dispersion von  $\delta = -1$  bis  $12$  ppm auf. Historisch bedingt liegt eine Tieffeldverschiebung bei  $\delta = 12$  ppm und eine Hochfeldverschiebung bei  $\delta = -1$  ppm vor. Resonanzsignale von Amidprotonen  $H^N$  liegen in der Regel bei  $\delta = 6$  bis  $10$  ppm, der  $H^a$ -Protonen zwischen  $\delta = 4$  bis  $6$  ppm. Aliphatische Protonen sind zwischen  $\delta = -1$  bis  $4$  ppm, Seitenketten-Amidprotonen bei  $\delta = 5$  bis  $7$  ppm zu finden. Besondere chemische Verschiebungen erfahren Protonen in Nachbarschaft zu aromatischen Ringen, sie zeichnen sich vermehrt durch extreme Tief- bzw. Hochfeldverschiebungen aus. Durch Signalüberlagerung in solchen 1D-Protonenspektren werden in der Praxis mehrdimensionale Spektren aufgenommen, die die Signale entzerren. Viele Spektrentypen basieren auf der Anreicherung von NMR-aktiven Kernen in Proteinen, sodass heteronukleare Experimente zur Strukturaufklärung und in Protein-Interaktionsstudien wertvoll sind.

### 3.11.2. Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie

Magnetisierung kann von einem Kern auf andere über skalare oder dipolare Kopplungen übertragen werden. Skalare Kopplungen sind Magnetisierungstransfers über die gemeinsame Bindung zweier Kerne, dabei ist die Reichweite aufgrund der zur Kopplung inversen Wartezeit auf drei Bindungen beschränkt. Dies wird bei der Zuordnung von Proteinrückgrad und -seitenketten genutzt, indem zum Beispiel bei dreidimensionalen [ $^1H$ ,  $^{15}N$ ,  $^{13}C$ ]-HNCO die Magnetisierung von Proton, über Stickstoff zum CO-Kohlenstoff und wieder zurück übertragen wird. Dem gegenüber steht die dipolare Kopplung über den Raum, die zum Beispiel beim Kern-Overhauser-Effekt, NOE, zwischen Protonen genutzt wird um Distanzeinschränkungen aufzustellen. Die Reichweite des NOEs ist auf  $6 \text{ \AA}$  beschränkt, bedingt durch die Abhängigkeit von der Intensität  $I$  und dem Abstand  $r$  durch  $I \propto r^{-6}$ . Generell gilt für mehrdimensionale Experimente, dass Protonen angeregt werden, die Magnetisierung übertragen werden kann, die chemische Verschiebung der Spins sich für eine inkrementierte Zeit entwickeln, die Magnetisierung auf Protonen zurückübertragen und detektiert wird.

### 3.11.3. Spektrentypen und ihre Aussagen

Eines der wichtigsten NMR-Experimente ist das heteronukleare Einzelquanten-Korrelationsspektrum, HSQC (Keeler 2005), sie gelten als ein Fingerabdruck eines Proteins, das für die Kernpaare Protonen-Stickstoff oder Protonen-Kohlenstoff verwendet werden kann. Im Fall des 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC werden nur Amidgruppen im Protein sichtbar. Proteine mit Sekundärstrukturelementen zeigen eine hohe Dispersion der Protonen-chemischen Verschiebungen, während intrinsisch ungefaltete Proteine eine schmale Dispersion aufweisen. Zu erwartende Signale stammen von Amidgruppen des Proteinrückgrats und Seitenketten von Tryptophan, Asparagin und Glutamin, ebenso wie Amidprotonen in den Seitenketten von Lysin, Arginin und Histidin, wenn diese sich in einer Salz- oder Wasserstoffbrückenbindung befinden. Nicht sichtbar sind Proline und schnell mit dem Lösungsmittel austauschende Amidprotonen des N-terminalen Amids. Im Gegensatz dazu sind alle Protonen, die an ein Kohlenstoff gebunden sind, im 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ]-HSQC detektierbar.

Zur Zuordnung von Resonanzsignalen zu entsprechenden Atomen im Protein werden dreidimensionale NMR-Experimente aufgenommen. Als Ausgangsspektrum dienen die HSQC-Experimente, die um eine dritte Dimension erweitert werden. Da ist das 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HNCACB (Wittekind *et al.* 1993) zu nennen, das eine sequenzielle Zuordnung der Rückgrad-Amidgruppen sowie der  $^{13}\text{C}^\alpha$ - und  $^{13}\text{C}^\beta$ -Resonanzsignale ermöglicht. Dabei werden Rückgrad-Amide mit den  $\text{C}^\alpha$  und  $\text{C}^\beta$  der eigenen und der vorhergehenden Aminosäure korreliert, wobei die der Vorgängeraminosäure aufgrund der kleineren Kopplungskonstante von 7 Hz  $\text{N}_i\text{-}^{13}\text{C}^\alpha_{i-1}$  zu 11 Hz bei  $\text{N}_i\text{-}^{13}\text{C}^\alpha_i$  meist schwächer sind. Eine vereinfachte Zuordnung wird durch ein 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-CBCAcoNH (Grzesiek *et al.* 1992) erreicht, da hier nur  $^{13}\text{C}^\alpha$  und  $^{13}\text{C}^\beta$  der Vorläuferaminosäure gekoppelt sind. Eine sequenzielle Zuordnung erfolgt über Aminosäuren mit besonderen Eigenschaften wie das Glycin mit nur einem  $^{13}\text{C}^\alpha$  und das bei  $\delta=15\text{-}20$  ppm im Vergleich zu anderen Aminosäuren Hochfeld-verschobene  $^{13}\text{C}^\beta$  des Alanins, sowie die stärker Tieffeld-verschobenen  $^{13}\text{C}^\beta$ -Resonanzsignale von Serin und Threonin.

Weitere Experimente umfassen das 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HNCO (Kay *et al.* 1990), welches Rückgrad-Amidprotonen mit den  $^{13}\text{C}$ -Carbonyl-Kohlenstoffen der Vorgängeraminosäure korreliert und das 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ ]-HNHA (Vuister *et al.* 1993), welches  $\text{H}^\alpha$ -Protonen an die eigenen Rückgrad-Amidprotonen koppelt. Die kompletten Seitenketten können mittels eines 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ]-HcCH-COSY (Bax *et al.* 1990) zugeordnet werden, indem jedes aliphatische Proton-Kohlenstoffpaar einer Aminosäure mit den direkt benachbarten Aliphaten der gleichen Aminosäure gekoppelt ist.

Zur Strukturaufklärung werden 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-NOESY-HSQC (Marion *et al.* 1989) und 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ]-HSQC-NOESY (Majumdar *et al.* 1993) genutzt, die ausgehend von den schon bekannten Amidprotonen- und Methylgruppenstreifen, alle Protonen über dipolare Kopplungen innerhalb von  $\sim 6\text{\AA}$  anzeigen.

### 3.11.4. Probenvorbereitung und Messbedingungen

Für NMR-Experimente wurde das Expressionsmedium von LB- zu M9 Minimalmedium gewechselt. Dem Minimalmedium wurde je nach Aufgabenstellung  $^{15}\text{N}$ -Ammoniumchlorid und bzw. oder  $^{13}\text{C}$ -Glukose zugegeben, damit die erhaltenen Proteine [ $U$ - $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ] bzw. nur [ $U$ - $^{15}\text{N}$ ]-isotopenmarkiert wurden.

Für die Messungen wurden 5 mm Shigemi-Röhrchen des Typs BMS-005V (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) verwendet außer für die Titration von Bin1 Tandem-SH3:NS5A(191-340), dafür wurde ein 2,5 mm Röhrchen verwendet. Alle Experimente wurden im SH3-Dialysebuffer s. Kapitel 3.3.4 unter Zugabe von 10 %  $\text{D}_2\text{O}$  (Euriso-top, Gif-sur-Yvette, Frankreich) bei  $T=25^\circ\text{C}$  gemessen. Zur Referenzierung wurde eine Kapillare mit DSS in die Proteinproben inseriert und 1D- $^1\text{H}$ - sowie 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ]-HSQC-Spektren aufgenommen. Die Referenzierung erfolgte bei Protonen und Kohlenstoff direkt auf die Methylgruppe des DSS und indirekt für Stickstoff mittels der Frequenzverhältnisse von  $^{15}\text{N}/^1\text{H}=0,101329118$  auf die Methylgruppe des DSS (Wishart *et al.* 1995). Die hergestellten Proben für NMR-Experimente sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12. Hergestellte NMR-Proben

NMR-Probe	Experimente	Stammlösung
920 $\mu\text{M}$ [ $U$ - $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ]-Bin1 Tandem-SH3	Zuordnung, Protonen-Abstände	
660 $\mu\text{M}$ [ $U$ - $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ]-Bin1 Tandem-SH3	Resonanzzuordnung	
200 $\mu\text{M}$ [ $U$ - $^{15}\text{N}$ ]-Bin1 Tandem-SH3	Titration	10 mM NS5A(341-361)
500 $\mu\text{M}$ [ $U$ - $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ]-Bin1 Tandem-SH3	Zuordnung, Protonen-Abstände	500 $\mu\text{M}$ NS5A(341-361)
200 $\mu\text{M}$ [ $U$ - $^{15}\text{N}$ ]-Bin1 SH3	Titration	10 mM NS5A(341-361)
60 $\mu\text{M}$ [ $U$ - $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ]-NS5A(191-340)	Titration	600 $\mu\text{M}$ [ $U$ - $^{15}\text{N}$ ]-Bin1 Tandem-SH3
340 $\mu\text{M}$ [ $U$ - $^{15}\text{N}$ ]-Bin1 Tandem-SH3	Titration	160 $\mu\text{M}$ NS5A(191-447)

### 3.11.5. NMR-Spektrometer

Die NMR-Messungen wurden an VNMR-Spektrometern mit Magnetfeldstärken von 18,8 T und 21,2 T sowie den Bruker NMR-Spektrometern mit 14,1 T durchgeführt. Die Varian-NMR-Spektrometer verfügten über cryogen-gekühlte 5 mm Z-PFG  $^1\text{H}$ -[ $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-Probenköpfe und die Bruker-Spektrometer über 5 mm CPTCI  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/\text{D}$  Z-GRD bzw. CPQCI  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/\text{D}$  Z-GRD Probenköpfe.

### 3.11.6. NMR-Experimente

Zur Charakterisierung des apo-Zustandes von Bin1 Tandem-SH3 wurden die in Tabelle 13 aufgelisteten Experimente durchgeführt. Für die Untersuchung der Bin1 SH3:NS5A-Interaktionen wurden die Experimente in Tabelle 14 und für den Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361)-Komplex die in Tabelle 15 aufgenommen. Die Experimente von Bin1 Tandem-SH3 wurden bei 18,8 T und die des Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361)-Komplexes bei 18,8 T und 21,2 T durchgeführt. Die Titration von Bin1 Tandem-SH3:NS5A(191-447) erfolgte bei 18,8 T, von Bin1 Tandem-SH3:NS5A(191-340) bei 21,2 T, die von Bin1 SH3 sowie Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361) bei 14,1 T.

Tabelle 13. Akquisitions- und Prozessierungsparameter der durchgeführten NMR-Experimente von Bin1 Tandem-SH3.

Die spektralen Weiten der jeweiligen Dimensionen stehen unter  $sw_1$ - $sw_3$ , die aufgenommenen komplexen Punkte in den Spalten  $t_1$ - $t_3$ , die Anzahl der Experimente  $nt$ , Relaxationswartezeit zwischen den Experimenten  $d1$ , die Mischzeit im NOESY-Experiment  $mix$ , die Trägerfrequenzen der jeweiligen Kerne  $^{13}C/^{15}N$  und die Anzahl der realen Punkte nach dem Prozessieren  $\omega_1$ - $\omega_3$ . Die Benennung erfolgt nach dem System, dass alle detektierten Kerne in Großbuchstaben und alle über die die Magnetisierung übertragen wurde ohne Detektion in Kleinbuchstaben stehen. Die Tabelle wurde aufgeteilt in NMR-Titrations und Experimente vom Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361)-Komplex.

Bin1 Tandem-SH3	$sw_1$ [ppm]	$t_1$ [Pkt.]	$sw_2$ [ppm]	$t_2$ [Pkt.]	$sw_3$ [ppm]	$t_3$ [Pkt.]	$nt$	$d1$ [s]	$mix$ [ns]	$^{13}C$ [ppm]	$^{15}N$ [ppm]	$\omega_1$ [Pkt]	$\omega_2$ [Pkt]	$\omega_3$ [Pkt]
[ $^1H$ ] 1D	17,56	1053					8	2						
[ $^1H$ , $^{15}N$ ] HSQC	16,67	850	36,19	128			4	1,25			117,8	2048	1024	
[ $^1H$ , $^{15}N$ ] BT-HSQC	16,80	940	25,48	200			8	0,25			119,6	4096	1024	
[ $^1H$ , $^{13}C$ ] HSQC aliphatisch	15,03	768	69,61	350			8	1,3		39,3		4096	2048	
[ $^1H$ , $^{13}C$ ] HSQC aromatisch	15,03	768	39,78	200			16	1,5		129,0		4096	2048	
[ $^1H$ , $^{13}C$ ] CT-HSQC aliphatisch	15,03	768	69,61	377			16	1,3		39,3		4096	2048	
[ $^1H$ , $^{13}C$ ] CT-HSQC aromatisch	15,03	768	39,78	128			32	1,5		129,0		4096	2048	
[ $^1H$ , $^{15}N$ , $^{13}C$ ] BT-HNCO	16,28	911	12,93	45	2,58	40	8	0,35		176,0	119,6	2048	1024	512
[ $^1H$ , $^{15}N$ , $^{13}C$ ] BT-HNCACB	12,60	706	64,64	130	25,48	40	16	0,28		47,2	119,6	2048	1024	512
[ $^1H$ , $^{15}N$ , $^{13}C$ ] BT-HNcoCACB	12,60	706	64,63	130	3,44	40	24	0,3		47,2	119,6	1024	1024	1024
[ $^1H$ , $^{15}N$ , $^1H$ ] HNHA	15,03	512	8,75	80	25,48	30	16	1,4			120,1	2048	256	128
[ $^1H$ , $^{13}C$ , $^1H$ ] HcCH-COSY	15,03	512	25,85	90	89,75	90	16	1	0,14	30,0		2048	1024	512
[ $^1H$ , $^{15}N$ , $^1H$ ] HBHAcoNH	15,03	768	7,19	85	25,48	38	16	1,4			120,1	2048	1024	64
[ $^1H$ , $^{15}N$ , $^{13}C$ ] CcoNH	15,03	512	63,15	128	25,48	40	8	1,45		45,1	120,1	2048	512	256
[ $^1H$ , $^{15}N$ , $^1H$ ] HCcoNH	15,03	512	39,28	120	25,48	36	16	1,3			120,1	2048	512	256
[ $^1H$ , $^{13}C$ , $^1H$ ] HSQC-NOESY aliphatisch	16,28	850	6,5	82	36,17	70	16	1,2	0,1	30,0		2048	1024	512
[ $^1H$ , $^{13}C$ , $^1H$ ] HSQC-NOESY aromatisch	16,28	850	2,06	32	21,88	68	16	1,5	0,1	123,6		2048	1024	512
[ $^1H$ , $^1H$ , $^{15}N$ ] NOESY-HSQC	15,03	901	11,75	150	25,48	40	8	1,5	0,12		120,1	2048	512	512

Tabelle 14. Akquisitions- und Prozessierungsparameter der durchgeführten NMR-Experimente zur Interaktion von Bin1 Tandem-SH3 und verschiedenen NS5A-Konstrukten.

<b>NMR-Experiment</b>	<b>sw<sub>1</sub></b> <b>[ppm]</b>	<b>t<sub>1</sub></b> <b>[Pkt.]</b>	<b>sw<sub>2</sub></b> <b>[ppm]</b>	<b>t<sub>2</sub></b> <b>[Pkt.]</b>	<b>sw<sub>3</sub></b> <b>[ppm]</b>	<b>t<sub>3</sub></b> <b>[Pkt]</b>	<b>nt</b>	<b>d1</b> <b>[s]</b>	<b>mix</b> <b>[ns]</b>	<b><sup>13</sup>C</b> <b>[ppm]</b>	<b><sup>15</sup>N</b> <b>[ppm]</b>	<b>ω<sub>1</sub></b> <b>[Pkt]</b>	<b>ω<sub>2</sub></b> <b>[Pkt]</b>	<b>ω<sub>2</sub></b> <b>[Pkt]</b>
Bin1 SH3:NS5A(341-361)- [ <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N] HSQC	16,03	2048	35,00	256			8, 64	1			117,0	1227	1024	
Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361)- [ <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N] HSQC	15,98	1024	39,99	35			8, 128	1			115	1231	1024	
Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361)- [ <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N] HSQC	15,61	1124	27,42	150			4	1,25			119,0	1364	2048	
Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361)- [ <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C] HSQC	15,61	750	37,57	150			16	1,5		29		3570	4096	
Bin1 Tandem-SH3:NS5A(191-477)- [ <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N] HSQC	16,28	1000	32,08	130			8, 128	1			120,1	2048	1024	
Bin1 Tandem-SH3:NS5A(191-340)- [ <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N, <sup>13</sup> C] BT-HNco	15,61	984	29,61	200			4, 48, 128, 256	0,2			118,4	2048	1313	
Bin1 Tandem-SH3:NS5A(191-340)- [ <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N, <sup>13</sup> C] BT-HNCA	14	512	22	70	24	35	80	0,25		51	119,1	616	1024	512
NS5A(341-361) [ <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H] NOESY	11,02	1488	11,02	500			48	1,5	0,175			3897	2048	

Tabelle 15. Akquisitions- und Prozessierungsparameter der durchgeführten NMR-Experimente vom Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361)-Komplex.

<b>Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361)</b>	<b><sup>1</sup>H-Frq.</b> <b>[MHz]</b>	<b>sw<sub>1</sub></b> <b>[ppm]</b>	<b>t<sub>1</sub></b> <b>[Pkt.]</b>	<b>sw<sub>2</sub></b> <b>[ppm]</b>	<b>t<sub>2</sub></b> <b>[Pkt.]</b>	<b>sw<sub>3</sub></b> <b>[ppm]</b>	<b>t<sub>3</sub></b> <b>[Pkt]</b>	<b>nt</b>	<b>d1</b> <b>[s]</b>	<b>mix</b> <b>[ns]</b>	<b><sup>13</sup>C</b> <b>[ppm]</b>	<b><sup>15</sup>N</b> <b>[ppm]</b>	<b>ω<sub>1</sub></b> <b>[Pkt]</b>	<b>ω<sub>2</sub></b> <b>[Pkt]</b>	<b>ω<sub>2</sub></b> <b>[Pkt]</b>
[ <sup>1</sup> H] 1D	900	15,61	1405					128	1,5				2940		
[ <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N] HSQC	900	15,61	1124		150			4	1,25			119,3	1313	2048	
[ <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C] HSQC aliphatisch	900	15,61	750	37,57	150			16	1,5		31,2		946	2048	
[ <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C] HSQC aromatisch	900	15,61	750	25,63	150			8	1,5		126,8		657	1024	
[ <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H] CN-filtriertes NOESY	900	13,36	1202	13,36	360			80	1,25	0,1			8192	4096	
[ <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H] CN-filtriertes TOCSY	800	12,50	1001	12,50	250			192	1,6	0,1			4096	1024	
[ <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N, <sup>13</sup> C] HNCO	900	15,61	1024	11,05	50	27,42	60	8	1,5		174,9	119,3	1313	1024	256
[ <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, <sup>1</sup> H] HcCH-COSY	800	15,03	600	28,09	70	36,42	80	16	1,1	0,14	29,2		2945	512	256
[ <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, <sup>1</sup> H] HSQC-NOESY aliphatisch	800	15,03	785	7,06	70	36,42	70	16	1,1	0,1	29,2		2945	512	256
[ <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N] NOESY-HSQC	800	15,03	901	11,88	150	30,85	40	8	1,46	0,12		119,7	1364	1024	256
[ <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, <sup>1</sup> H] HSQC-NOESY aromatisch	800	16,26	767	3,83	48	29,09	90	16	1,5	0,15	129		2721	512	256
[ <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H] HSQC-NOESY gefiltert via [ <sup>13</sup> C]	900	15,03	731	15,00	150			768	1,5	0,12			2945	2048	
[ <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H] HSQC-NOESY gefiltert via [ <sup>15</sup> N]	800	14,03	750	10,00	220			320	1,5	0,12			3154	2048	

### 3.11.7. Spektrenauswertung

Alle Spektren wurden mit nmrPipe (Delaglio *et al.* 1995) prozessiert, mit nmrDraw visualisiert und anschließend in CcpNmr analysis (Vranken *et al.* 2005) eingeladen und referenziert.

Für die Zuordnung und Strukturrechnung von Bin1 Tandem-SH3 wurden die in Tabelle 13 aufgenommen Spektren genutzt. Zunächst wurden die sequenziellen Zuordnungen der Amidprotonenresonanzen mithilfe der 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ]-HNCACB und 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ]-NHcoCACB durchgeführt. Anhand dieser Spektren soll eine vollständige Zuordnung des Rückgrats erlangt werden. Anschließend wurden die Seitenkettenmethylgruppen, unter Verwendung der schon bekannten Amidprotonenresonanzen, mittels 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ]-CcoNH, 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ ]-HCcoNH und 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ ]-HBHAcNH zugeordnet. Die erkannten Aminosäuren wurden mit dem 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ]-HcCH-COSY verifiziert. Zusätzlich wurden 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ]-HNCO und 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ ]-HNHA zur Bestimmung der Sekundärstrukturelemente verwendet. Zur Strukturrechnung wurden abschließend die NOESY-Spektren, aliphatisches und aromatisches 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ] HSQC-NOESY und 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] NOESY-HSQC herangezogen.

Ähnlich wurde mit der Auswertung zur Bestimmung der Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361)-Komplexstruktur verfahren. Da hier schon solche Kerne des Bin1 Tandem-SH3-Proteins bekannt sind, die nicht an der Interaktion mit NS5A(341-361) beteiligt sind, wurde die Zuordnung dieser Kerne zur Komplexstruktur übertragen. Solche Resonanzsignale, die andere chemische Verschiebungen aufwiesen und nicht übertragen werden konnten, wurden anhand des aufgenommenen 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ]-HcCH-COSY in ihrer Seitenkette verfolgt und zugeordnet. Folglich wurde die Anzahl der benötigten Spektren reduziert. Die Zuordnung der aromatischen Seitenketten erfolgte mit dem 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ]-HSQC-NOESY der Aromaten. Die Zuordnung des Peptides erfolgte mit den beiden Kohlenstoff- und Stickstoff gefilterten 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ]-TOCSY und 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ]-NOESY-Spektren. Wichtig für die Protonen-Protonen-Distanzeinschränkungen sowohl intramolekular in Bin1 Tandem-SH3 als auch intermolekular zwischen Bin1 Tandem-SH3 und NS5A(341-361) sind folgende Spektren: das aliphatische und das aromatische 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ] HSQC-NOESY, das 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] NOESY-HSQC, sowie die beiden 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ]-HSQC-NOESY-Spektren, die Kerne des Proteins mit Kernen des Peptides durch NOE ohne Detektion der Heterokerne wie  $^{13}\text{C}$  oder  $^{15}\text{N}$  korrelieren.

### 3.11.8. NMR-Titrationsen

Die Zugabe eines Liganden zu einem Interaktionspartner kann mittels NMR-Titration in HSQC-Spektren verfolgt werden. Die Interaktion führt zu einer Änderung der chemischen Verschiebung der an der Interaktion beteiligten Aminosäuren, welches mit „chemical shift perturbation“, CSP, bezeichnet wird. In der Regel werden [ $U$ - $^{15}\text{N}$ ]-markierte Proteine und unmarkierter Ligand verwendet, um die Bindestelle anhand von 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektren aufzuklären. Ändert sich die chemische Verschiebung graduell vom Ausgangs- zum Endpunkt der Titration, handelt es sich um einen schnellen Austausch. Verringert sich hingegen die Resonanzsignalintensität des Ausgangsspektrums und vergrößert sich parallel

im Titrationsverlauf ein Signal bei anderer chemischer Verschiebung, ist der Austausch zwischen ungebundenem und gebundenem Zustand langsam.

Je größer die Änderung der chemischen Verschiebung zwischen Abwesenheit des Liganden und vollständiger Sättigung mit Ligand ist, desto wahrscheinlicher ist dieser Aminosäurerest an der Interaktion beteiligt. Die CSP gibt eine sequenzgenaue Lokalisation der Bindung eines Liganden an ein isotoopenmarkiertes Amid an.

$$CSP = \sqrt{(10 \Delta \text{ } ^1\text{H})^2 + (\Delta \text{ } ^{15}\text{N})^2}$$

- NS5A(341-361)

Um die Interaktion von Bin1 SH3 bzw. Bin1 Tandem-SH3 mit NS5A(341-361) zu charakterisieren, wurde NS5A(341-361) zu [ $U\text{-}^{15}\text{N}$ ]-Bin1 SH3 bzw. Bin1 Tandem-SH3 titriert. Dazu wurden 200  $\mu\text{M}$  Bin1 SH3 oder Bin1 Tandem-SH3 in einem Volumen von 350  $\mu\text{l}$  vorgelegt und NS5A(341-361) aus der 10 mM Stocklösung in Schritten von 1,75  $\mu\text{l}$ ; 1,75  $\mu\text{l}$ ; 1,75  $\mu\text{l}$ ; 1,75  $\mu\text{l}$ ; 3,5  $\mu\text{l}$ ; 3,5  $\mu\text{l}$ ; 21  $\mu\text{l}$  und 8  $\mu\text{l}$  hinzugegeben und ebenso viele 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektren aufgenommen. Die molaren Verhältnisse von 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2;5 und 6,14 NS5A(341-361):Bin1 SH3 bzw. Bin1 Tandem-SH3 wurden hiermit abgedeckt. Die Anzahl an Transienten der Spektren betrug jeweils  $nt=8$  außer im Falle des Verhältnisses von 6,14 mit  $nt=64$  bei Bin1 SH3 bzw.  $nt=128$  bei Bin1 Tandem-SH3. Die Zuordnung beider Spektren erfolgte durch bereits bekannte Positionen der Amidresonanzsignale vom frei und gebundenen Bin1 SH3 (A. Aladag und M. Schwarten, persönliche Kommunikation) und vom freien Bin1 Tandem-SH3. Zur Analyse wurde die CSP in Abwesenheit und vollständiger Sättigung von NS5A(341-361):Bin1 SH3 bzw. Bin1 Tandem-SH3 im Verhältnis 6,14 berechnet.

- NS5A(191-340)

Die Titration von [ $U\text{-}^{15}\text{N}$ ]-Bin1 Tandem-SH3 und [ $U\text{-}^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-NS5A(191-340) erfolgte unter Isotoopenmarkierung beider Proteine. Zur zeitgleichen Betrachtung beider Proteine wurden 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-BT-HNco-Spektren aufgenommen, deren Vorteil durch die Aufnahmemodi ist, dass die beiden unterschiedlich isotoopenmarkierten Proteine in HSQC-Spektren durch Differenz getrennt betrachten werden können. Dieses Experiment besteht aus zwei Aufnahmemodi, einmal wurde Magnetisierung kurzzeitig auf die Carbonyl-Kohlenstoffe des NS5A(191-340) übertragen und das andere Mal wurde ein [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-BT-HSQC aufgenommen. Aus der Differenz der beiden Aufnahmemodi ließen sich sowohl 2D-Spektren von Bin1 Tandem-SH3 als auch NS5A(191-340) gewinnen, ohne dass der andere Interaktionspartner im Spektrum sichtbar wurde. Die Titration erfolgte in einem 2,5 mm NMR-Röhrchen mit einem Volumen von 180  $\mu\text{l}$ . Zunächst wurden die Spektren der jeweils freien, ungebundenen Formen aufgenommen: einmal 600  $\mu\text{M}$  Bin1 Tandem-SH3 mit einer Anzahl an Transienten von  $nt=4$  und 60  $\mu\text{M}$  NS5A(191-340) mit  $nt=48$ . Dann erfolgte die Zugabe von 4,5  $\mu\text{l}$  Bin1 Tandem-SH3 zu 60  $\mu\text{M}$  NS5A(341-361). Weitere Zugaben waren 4,5  $\mu\text{l}$ ; 4,5  $\mu\text{l}$ ;

4,5  $\mu\text{l}$ ; 9  $\mu\text{l}$ ; 9  $\mu\text{l}$ ; 54  $\mu\text{l}$  der 600  $\mu\text{M}$  Bin1 Tandem-SH3-Stammlösung, das entsprach Bin1 Tandem-SH3:NS5A(191-340)-Verhältnissen von 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2 und 5. Die einzelnen Transienten betragen mit fortschreitender Titration  $n_t=256$ ; 48; 128; 48; 128; 48 und 48. Zusätzlich wurde vom letzten Titrationsschritt beim Verhältnis 5:1 NS5A(191-340):Bin1 Tandem-SH3 ein 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ]-HNCA-Spektrum zur sequenziellen Zuordnung der Resonanzsignale des NS5A-Proteins aufgenommen. Obwohl dieses HNCA-Experiment des Komplexes Bin1 Tandem-SH3:NS5A(191-340) bei maximaler Ligandenkonzentration aufgenommen wurde, war die Signalintensität, der an der Interaktion beteiligten Amide, so gering [Daten nicht gezeigt], dass keine eindeutige Zuordnung dieser Resonanzsignale möglich war. Stattdessen wurden die chemischen Verschiebungen mit denen der Titration von Bin1 SH3:NS5A(191-340) (Schwarten *et al.* 2013) verglichen und eine Zuordnung der Resonanzsignale im 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-BT-HNco von NS5A(191-340) übernommen. Im Verlauf der Titration traten entweder durch Bindung oder durch Instabilität der Probe Signale auf, deren Zuordnung jedoch nicht eindeutig war.

- NS5A(191-447)

Zur Bindungsanalyse von Bin1 Tandem-SH3 und NS5A(191-447) wurde zunächst 342  $\mu\text{M}$  [ $U$ - $^{15}\text{N}$ ]-Bin1 Tandem-SH3 vorgelegt und schrittweise von der 160  $\mu\text{M}$  NS5A(191-447)-Stammlösung 354  $\mu\text{l}$  zugegeben, was einem Verhältnis von Bin1 Tandem-SH3:NS5A(191-447) von 0,25 entsprach. Dann wurden 709  $\mu\text{l}$  Stammlösung hinzupipettiert, ein Verhältnis von 0,7 wurde erreicht und anschließend 1418  $\mu\text{l}$  Stammlösung mit dem Endverhältnis 1,7. Die aufgenommenen Transienten betragen  $n_t=8$  beim Ausgangsspektrum von Bin1 Tandem-SH3 und in den weiteren Titrationsschritten  $n_t=128$ . Zur Zuordnung wurden die bereits bekannten chemischen Verschiebungen des freien und gebundenen Bin1 Tandem-SH3 genutzt.

### 3.11.9. Bestimmung der Torsionswinkeleinschränkungen

Die direkte, experimentelle Bestimmung der Torsionswinkel erfolgt mit der  $^3\text{J}$ -Kopplungskonstanten zwischen  $\text{H}^{\text{N}}$  und  $\text{H}^{\alpha}$  mit der Karplus-Beziehung (Minch 1994) oder indirekt aus den chemischen Verschiebungen der Rückgradkerne  $\text{H}^{\text{N}}$ ,  $\text{H}^{\alpha}$ ,  $\text{C}^{\alpha}$ ,  $\text{C}^{\beta}$ ,  $\text{C}^{\text{O}}$ ,  $\text{N}^{\text{H}}$ . Es werden dabei Abweichungen zu „random coil“-chemischen Verschiebungen, also Proteinen ohne erkennbare Sekundärstruktur, berechnet. Die Torsionswinkel  $\phi$  und  $\psi$  werden in Grad angegeben und graphisch in einem Ramachandran-Diagramm dargestellt. Die Verteilung der  $\phi$  und  $\psi$ -Torsionswinkel im Diagramm wird von den Sekundärstrukturelementen des Proteins beeinflusst. Bestimmte Bereiche sind für Sekundärstrukturelemente typisch, eine Abweichung von den erlaubten Bereichen weist auf Fehler in der Zuordnung oder den Distanzeinschränkungen hin.

Das hierzu verwendete Programm „torsion angle likelihood obtained from shift and sequence similarity“, TALOS-N, (Shen *et al.* 2013) berechnet Torsionswinkel und Sekundärstrukturwahrscheinlichkeiten anhand von bekannten Strukturmerkmalen,

chemischen Verschiebungen und der Proteinsequenz im Vergleich mit einer Datenbank mit 10103 Proteinen. Die Sekundärstrukturwahrscheinlichkeit für jede Aminosäure von Bin1 Tandem-SH3 wurde gegen die Aminosäuresequenz aufgetragen. Die bestimmten Torsionswinkeleinschränkungen wurden für die Strukturrechnung genutzt. Der zeitgleich berechnete Strukturparameter  $S^2$  gibt Auskunft über die Flexibilität des Rückgrads. Bereiche mit Rückgraddynamik zeigen geringe  $S^2$ -Werte, während Bereiche, die z. B. durch Sekundärstrukturelemente fixiert werden, einen  $S^2$ -Wert  $<0,6$  aufweisen.

Zusätzlich können Protonierungs- z. B. von Histidinen und Isomerisierungszustände von Prolin weitere Struktureinschränkungen geben. Histidin-Seitenketten-Protonierungszustände können experimentell mit dem lang-reichweitigem 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HMQC (Pelton *et al.* 1993) nachgewiesen werden. Cis-Proline können anhand der prominenten Abweichung der  $C^Y$  chemischen Verschiebung mit PROMEGA (Shen *et al.* 2010) und ihren verkürzten Distanzen zwischen  $H^{\alpha-1}$  und  $H^{\delta}$  (Wüthrich *et al.* 1984) identifiziert werden.

### 3.11.10. Strukturrechnung

Alle ermittelten Distanzeinschränkungen, die auf experimentellen Daten aus u. a. Protonen-Protonen-Abständen (Wüthrich 2003), Wasserstoffbrücken,  $^3\text{J}$ -skalaren Kopplungen, Torsionswinkeleinschränkungen (Minch 1994), paramagnetischen Relaxationsverstärkung (Clare *et al.* 2009), residuelle dipolare Kopplungen (Bouvignies *et al.* 2007) und Pseudokontaktshift (Saio *et al.* 2010) beruhen, werden für die Berechnung von NMR-Strukturen herangezogen. Wegen ihrer Anzahl stellen die Protonen-Protonen-Abstände den größten Anteil an strukturreinschränkenden Parametern. Zu Beginn der Strukturrechnung werden mögliche Distanzeinschränkungen in einem Netzwerk generiert, die dann in einem iterativen Prozess auf ihre Richtigkeit überprüft werden. Zunächst werden zufällige Anfangskonformationen generiert, die unter hohen Temperaturen leicht zwischen lokalen Energieminima wechseln können. Durch das schrittweise Abkühlen des Systems werden die Moleküle dazu gezwungen energetisch günstige Konformationen einzunehmen. Die Strukturrechnung impliziert, dass ein Ensemble aus mehreren Molekülen generiert wird, die zwischen den einzelnen Zyklen in Hinblick auf ihre Zuordnung evaluiert werden, bevor ein neuer Zyklus gestartet wird. Dieses Ensemble spiegelt die Genauigkeit der Einschränkungen und das dynamische Verhalten des Proteins in Lösung wider. In der Strukturrechnung mit NMR-Spektroskopie-Daten wird die Genauigkeit mit Hilfe des „root mean square deviation“, RMSD, der Abweichung der Strukturen im Ensemble vom Durchschnitt, in Angström angegeben.

In CcpNmr analysis wurden für Bin1 Tandem-SH3, jeweils für beide SH3-Domänen getrennt, mögliche Struktureinschränkungen bis  $10 \text{ \AA}$  erzeugt, die dann zusammen mit den Torsionswinkeleinschränkungen in das Strukturrechnungsprogramm importiert wurden. Die Rechnung erfolgte mit „ambiguous restraints for iterative assignment“, ARIA2 (Rieping *et al.* 2007). ARIA2 verwendet die Methoden der Energieminimierung, Einhaltung von Geometrie und Distanzen im Atomverbund und Molekulardynamik mit simulierter Temperaturabkühlung. Die molekulardynamische Simulation beruht auf einer Kombination aus logarithmischem und

harmonischem Potential (Nilges *et al.* 2008) zusammen mit automatisierter Einschränkungsgewichtung und dem Kraftfeld PARALLHDG (Linge *et al.* 1999).

Die anfänglichen expandierten 30 Aminosäureketten wurden durch molekulardynamische Rechnung in acht Iterationen zunächst auf  $T=10^5$  K für 25000 Stufen erhitzt und graduell auf  $T=10^4$  K für 20000 Stufen und  $T=50$  K für ebenfalls 20000 Stufen abgekühlt. Die pro Iteration zehn energetisch niedrigsten Strukturen mit ihren Distanzeinschränkungen bis zu 6,5 Å wurden für die darauffolgende Iteration weiterverwendet mit jeweils neu in dem NOE-Netzwerk berechneten, kalibrierten, gewichteten, zusammengeführten oder verworfenen verletzten Parametern um jeweils 30 weitere Strukturen zu generieren. Die achte Iteration generierte 100 Strukturen, die in der abschließenden Iteration, in der Wasser als Lösungsmittel für 8000 Stufen hinzugefügt wurde, zu den 10 energetisch günstigsten Strukturen zusammengeführt wurden. Eine qualitative Verbesserung beider Strukturen wurde mit diesem finalen Schritt, der Rechnung in Wasser als Lösungsmittel erreicht. Nach Abschluss der Rechnung gab ARIA2 die finale Struktur, verwandte und verletzte Restraints an CcpNmr analysis zurück, damit die Restraints überarbeitet wurden und in einem iterativen Prozess zwischen ARIA2 und CcpNmr analysis verbessert wurden.

Die Strukturen wurden mit Pymol (Schrödinger 2010) visualisiert und mit Hilfe des Programms PROCHECK-NMR (Laskowski *et al.* 1996) sowie MolProbity (Chen *et al.* 2010) analysiert. Mit Hilfe des Programms Theseus (Theobald *et al.* 2006) wurden die Strukturensamples nach der „maximal likelihood“-Methode überlagert. Die verringerte Gewichtung flexibler Regionen bei Theseus führt zu verbesserten Ergebnissen als die üblichen „least-squares“ Kriterien. Die Sekundärstruktur wurde über die Koordinaten der N, C $^{\alpha}$ , C, O und H $^N$ -Atome mit dem Programm „Kabsch and Sander algorithm for defining the secondary structure of proteins“, KSDSSP (Kabsch *et al.* 1983) vom Strukturensample bestimmt und in der PDB-Datei eingetragen.

## 4. Ergebnisse

Neben den beiden Bin1-Proteinen Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3 wurden drei Fragmente aus HCV NS5A nach bekannten Protokollen exprimiert und gereinigt (Schmidt *et al.* 2007, Glück *et al.* 2011, Schwarten *et al.* 2013). Mit diesen fünf Proteinen und den beiden zusätzlichen synthetischen Peptidfragmenten aus NS5A wurde die Interaktion charakterisiert. Die Bindung wurde mittels zweier immobilisierender Methoden, SPR und BLI, sowie zweier Methoden mit frei in Lösung vorliegenden Liganden und Analyten, ITC und NMR, analysiert. Des Weiteren erfolgte die Kristallisation des Bin1 Tandem-SH3 im apo- und holo-Zustand, d. h. ohne und mit Ligand NS5A(341-361). Die daraus resultierenden Kristalle wurden einer Röntgenstrukturanalyse unterzogen. Außerdem wurde die Struktur des apo- und holo-Zustandes Bin1 Tandem-SH3 mittels NMR aufgeklärt. NMR-Spektren zur Charakterisierung des Komplexes Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361) wurden aufgenommen und intermolekulare NOEs detektiert.

### 4.1. Proteinexpression und Reinigung

#### 4.1.1. Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3

Die beiden Proteine Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3 wurden mit Hilfe desselben Protokolls exprimiert und gereinigt. Chemisch kompetente *E. coli* BL21 (DE3) T1<sup>R</sup>-Zellen wurden mit den Bin1-Proteinen in pGEX-6P-2-Vektoren transformiert, s. Kapitel 3.1.2, und entweder in LB- oder Minimalmedium exprimiert, s. Kapitel 3.2. Die Expression des GST-Fusionsproteins wurde bei OD=0,6 bei  $\lambda=600$  nm mit 1 mM IPTG induziert. Nach vierstündiger Expression bei 37 °C wurden die Zellen abzentrifugiert und bei -80 °C gelagert. Nach dem Protokoll laut Kapitel 3.3.4 wurden pro Liter Kultur annähernd 2-3 g Zellen erhalten, die nach Resuspension in SH3-Lysepuffer am Microfluidizer aufgeschlossen wurden. Unlösliche Zellbestandteile wurden mit Zentrifugation abgetrennt und die löslichen Bestandteile auf die Affinitätschromatographiesäule Glutathion-Sepharose aufgetragen. An der Sepharose wurden die GST-Fusionsproteine konzentriert, während *E. coli*-Proteine im SH3-Bindebuffer gewaschen wurden. Das Fusionsprotein wurde mit GST-PreScission-Protease hydrolysiert und die SH3-Domänen im Elutionspuffer erhalten. Zur Kontrolle der Reinigungen von Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3 wurden SDS-Gele angefertigt und der Größenstandard „protein molecular weight marker“ (Fermentas) zur Referenzierung genutzt. Abbildung 10 und Abbildung 11 stehen beispielhaft für die durchgeführten Reinigungen.

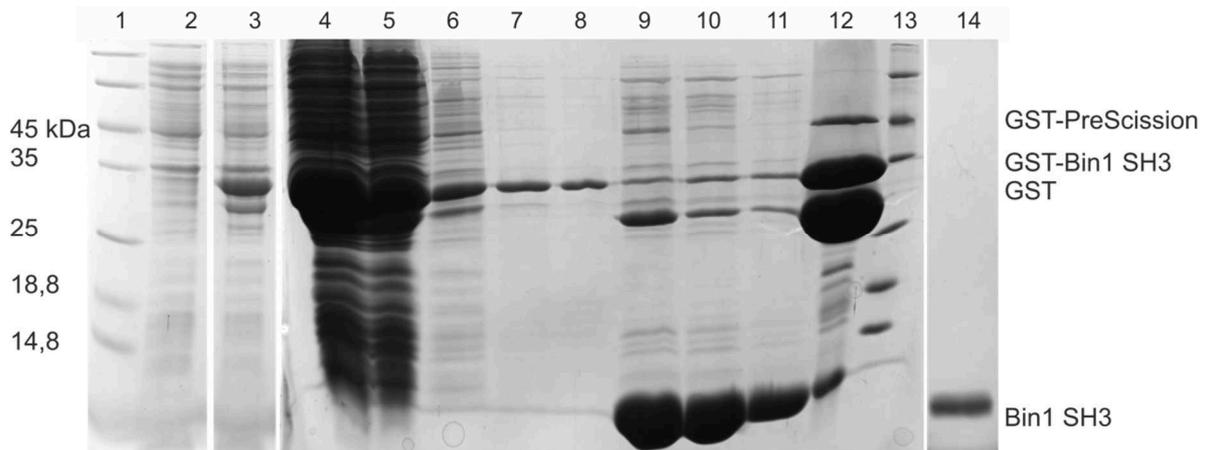


Abbildung 10. Expression und Reinigung des Proteins Bin1 SH3.

In den Spalten zwei und drei wurden Proben von Bakterienkulturen vor und nach der Induktion aufgetragen. Bei den induzierten Kulturen war die Bande von GST-Bin1 SH3 bei 34 kDa zu erkennen. Die Reinigung ist durch die Proben des Auftrags auf die GSH-Sepharose (Spalte 4), des Durchflusses (5), den drei Waschfraktionen (6-8), den drei Elutionsfraktionen (9-11) nach Spaltung des Fusionsproteins auf der Säule mit GST-PreScission zu Bin1 SH3 bei 8 kDa und dem Säulenmaterial (12), das sich aus GST-PreScission bei 46 kDa, GST bei 26 kDa, dem Fusionsprotein GST-Bin1 SH3 und Bin1 SH3 zusammensetzte, gezeigt. Nach Abschluss der Reinigung wurde Bin1 SH3 wie in Spalte 14 erhalten.

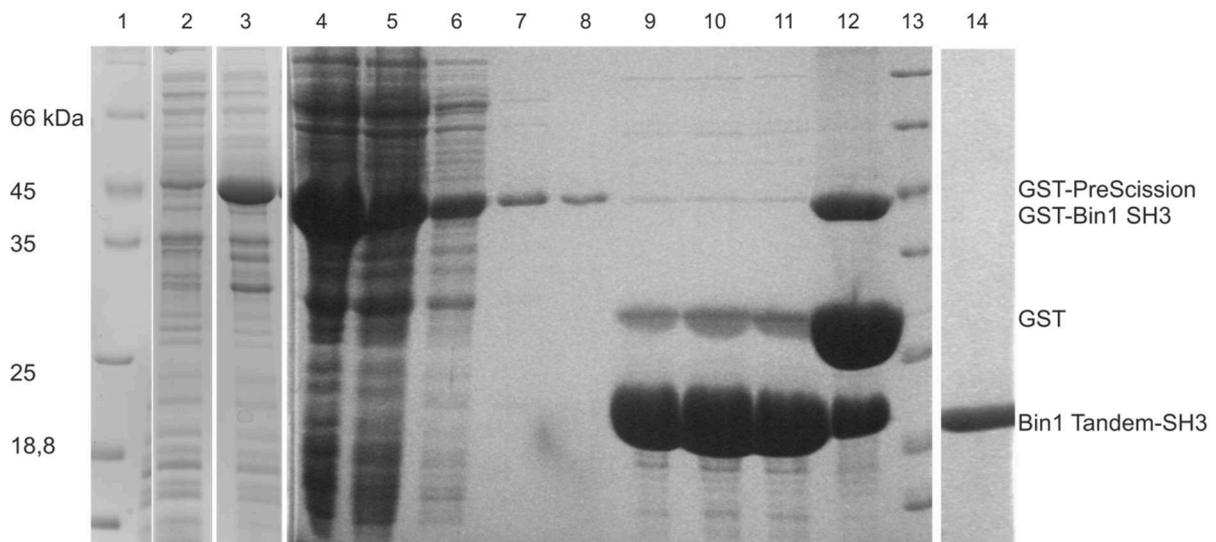


Abbildung 11. Expression und Reinigung von Bin1 Tandem-SH3.

Zunächst wurde die Expression kontrolliert; vor (Spalte 2) und nach (3) der Induktion mit IPTG sind zu sehen. Die markante Bande entsprach Bin1 Tandem-SH3 bei 45 kDa. Die Reinigung ist gezeigt mit den Spalten: Auftrag auf die GSH-Sepharose (4), Durchfluss (5), drei Waschfraktionen (6-8), drei Elutionsfraktionen (9-11) nach Spaltung des Fusionsproteins in Bin1 Tandem-SH3 mit 20 kDa und das Säulenmaterial (12), das GST-PreScission bei 46 kDa, GST und Bin1 Tandem-SH3 enthält. Abschließend wurde die Reinheit kontrolliert (14).

Die durch die GSH-Sepharose konzentrierten und erhaltenen Bin1-Proteine wurden von höher- und niedermolekularen Verunreinigungen befreit. Dazu wurden die Suspensionen auf eine Größenausschlusschromatographiesäule, Superdex 75 16/600, aufgetragen und anhand ihrer Größe im SH3-SEC-Puffer aufgetrennt, s. Abbildung 12. Bin1 Tandem-SH3 eluierte bei einem Retentionsvolumen von  $V=69$  ml und Bin1 SH3 bei  $V=82$  ml. Die abschließende Reinigung erfolgte durch Dialyse und Ultrafiltration. Mit dem molaren

Extinktionskoeffizienten der Proteine und UV-Vis-Spektroskopie konnten die Proteinkonzentrationen ermittelt werden, s. Kapitel 3.5. Erhalten wurden ca. 7 mg Bin1 SH3 bzw. Bin1 Tandem-SH3 aus einem Liter Expressionskultur.

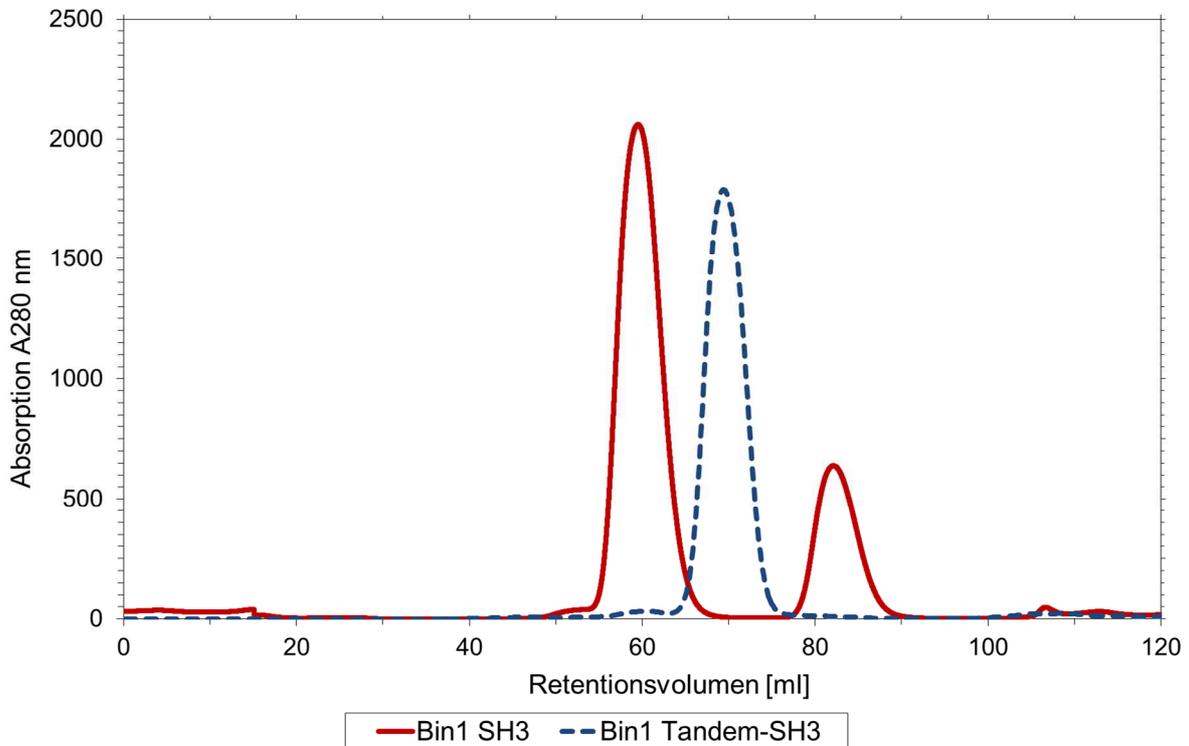


Abbildung 12. Gelfiltrationschromatogramme von Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3. Beide aufgetragenen Proteinlösungen enthalten GST, bei einem Retentionsvolumen von  $V=60$  ml, und die gewünschten Proteine, Bin1 SH3 (rot) bei  $V=82$  ml bzw. Bin1 Tandem-SH3 (blau gestrichelt) bei  $V=69$  ml.

#### 4.1.2. NS5A(333-369)

NS5A(333-369) wurde in pTTK19xUbi kloniert, s. Kapitel 3.1.2, und sowohl His-Ubiquitin als auch His-Ubiquitin-NS5A(333-369) (Glück *et al.* 2011) in *E. coli* BL21 (DE3) T1<sup>R</sup>-Zellen herangezogen. Die Proteinexpressionen, s. Kapitel 3.2, erfolgte ab  $OD=0,6$  mit 1 mM IPTG für 4 h bei 37 °C. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert und bei -80 °C gelagert. Die Proteine wurden nach dem Protokoll s. Kapitel 3.3.5 erhalten. Der Zellaufschluss wurde nach Resuspension in His-Ubiquitin-Lysepuffer mit Ultraschall durchgeführt und Fremdbestandteile abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde auf eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose aufgetragen und Fremdproteine durch Waschen mit 20 mM und 30 mM Imidazol entfernt. Die Proteine wurden im His-Ubiquitin-Elutionspuffer in sieben Fraktionen von der Säule eluiert. Die ersten fünf Fraktionen enthielten His-Ubiquitin und wurden vereinigt dialysiert. Bei His-Ubiquitin-NS5A(333-369) enthielten die ersten drei Fraktionen das Fusionsprotein, sodass nur diese drei Fraktionen vereinigt dialysiert wurden. Die Reinigungskontrolle erfolgte durch SDS-PAGE, s. Abbildung 13 und Abbildung 14.

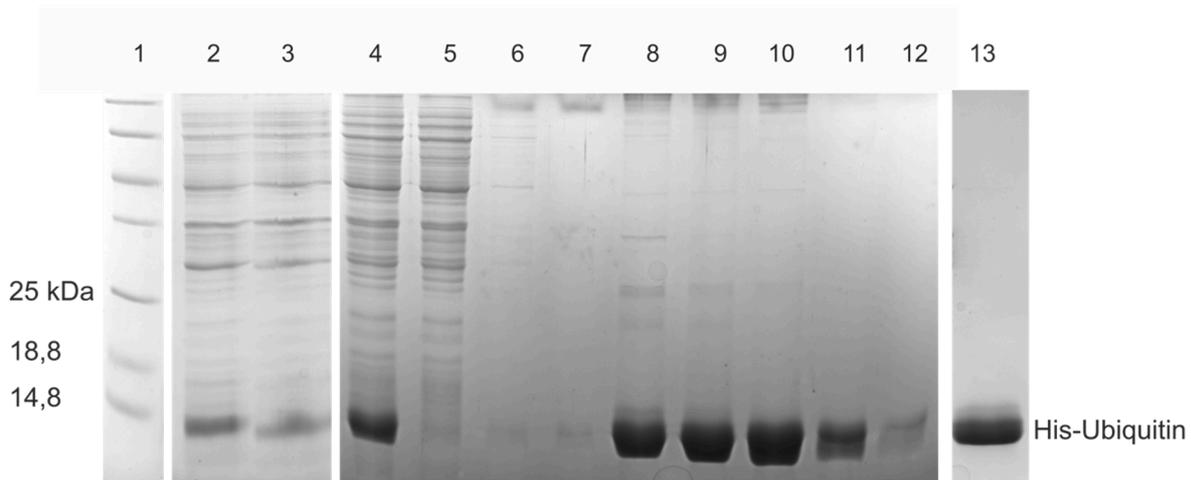


Abbildung 13. Expression und Reinigung von His-Ubiquitin.

Die Expression vor (Spalte 2) und nach (3) Induktion mit IPTG zeigte, dass His-Ubiquitin bei 11 kDa lief und schon vor Zugabe von IPTG exprimiert wurde. Die Reinigung enthält die Schritte: Auftrag auf  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose (4), Durchfluss (5), zwei Waschfraktionen (6-7) und fünf der sieben Elutionsfraktionen (8-12), die His-Ubiquitin enthielten. Abschließend nach Größenausschlusschromatographie wurde die Reinheit in Spalte 13 überprüft.

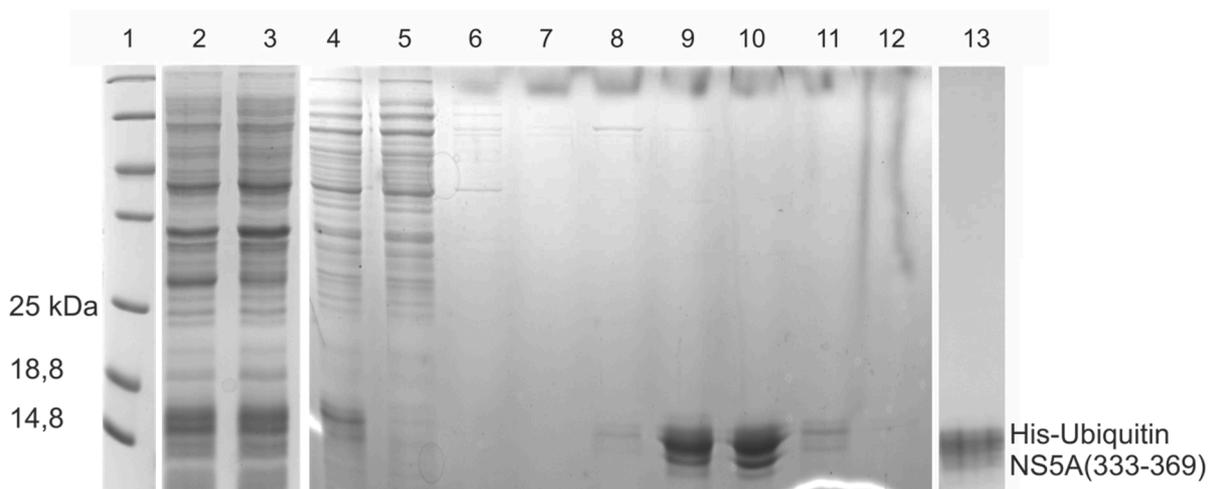


Abbildung 14. Expression und Reinigung von His-Ubiquitin-NS5A(333-369).

Die Expression ist gezeigt vor (Spalte 2) und nach (3) der Induktion mit IPTG. Bei ca. 15 kDa lief His-Ubiquitin-NS5A(333-369). Die Reinigung erfolgte mit Kontrolle hinsichtlich Auftrag auf  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose (4), Durchfluss (5), zwei Waschfraktionen (6-7), fünf der sieben Elutionsfraktionen (8-12). His-Ubiquitin-NS5A(333-369) wurde in den ersten drei Elutionsfraktionen erhalten. Abschließend wurde die Reinheit von His-Ubiquitin-NS5A(333-369) in Spalte 13 kontrolliert.

Die vereinigten Proteinproben wurden mit Größenausschlusschromatographie abschließend gereinigt. His-Ubiquitin eluierte bei einem Retentionsvolumen von  $V=85$  ml auf der Superdex 75 16/600 und His-Ubiquitin-NS5A(333-369) bei  $V=70$  ml, s. Abbildung 15. Die vereinigten Fraktionen wurden dialysiert und ultrafiltriert. Die Ausbeute betrug 10 mg/l Expressionskultur His-Ubiquitin und 6 mg/l His-Ubiquitin-NS5A(333-369).

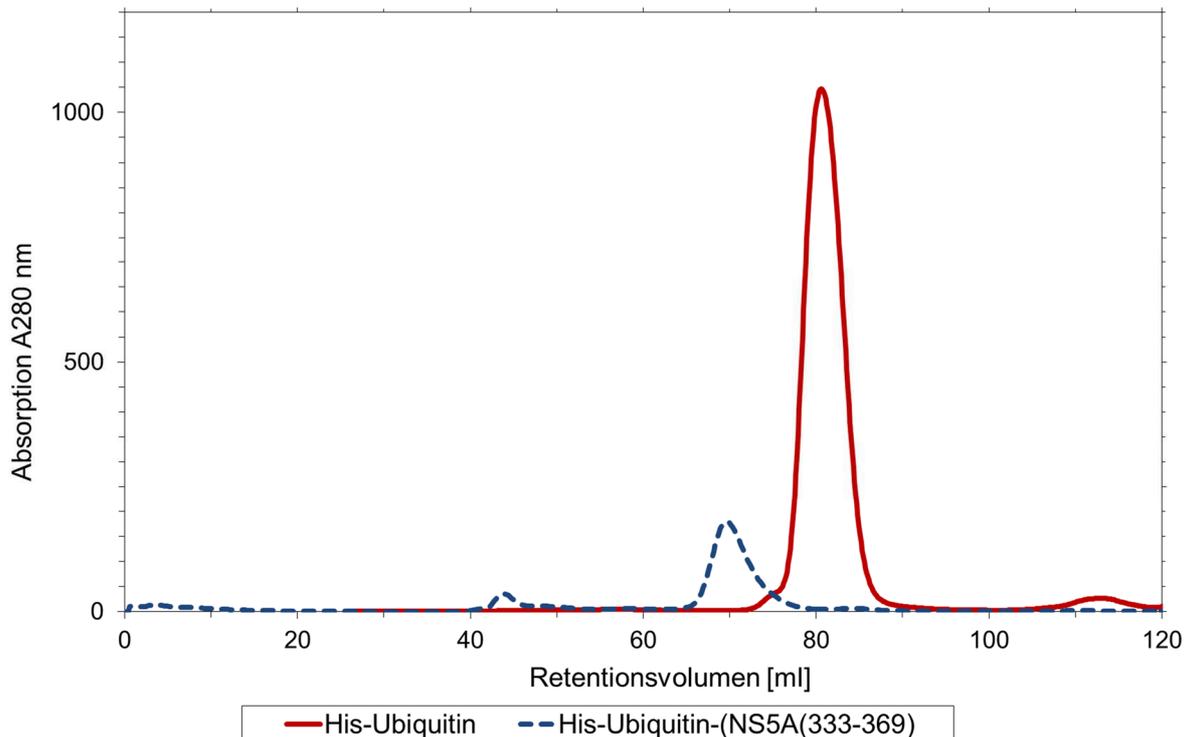


Abbildung 15. Gelfiltrationschromatogramme von His-Ubiquitin und His-Ubiquitin-NS5A(333-369). Auf der Superdex 75-Säule eluierte His-Ubiquitin (rot) bei  $V=85$  ml und His-Ubiquitin-NS5A(333-369) (blau gestrichelt) bei  $V=70$  ml.

#### 4.1.3. NS5A(191-340)

Die Expression von NS5A(191-340) als GST-Fusionsprotein erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) T1<sup>R</sup>-Zellen mittels des pGEX-6P-2-Vektors. Nach Wuchs der Zellen bei 37 °C bis zu OD=0,6 wurde die Proteinexpression mit 1 mM IPTG für 4 h bei 25 °C induziert. Die Zellen wurden zentrifugiert und bis zur Reinigung bei -80 °C gelagert, s. Kapitel 3.3.6. Nach Resuspension in SH3-Lysepuffer mit RNase wurden die Zellen durch Sonifikation aufgeschlossen. Die Fremdbestandteile wurden abzentrifugiert und der erhaltene lösliche Überstand auf eine Glutathion-Sepharose-Säule aufgetragen. Die nicht-bindenden Proteine wurden durch SH3-Bindepuffer mit erhöhter Salzkonzentration von der Säule gewaschen und das Fusionsprotein mit GST-PreScission-Protease für 2 h bei 4 °C limitiert hydrolysiert. Das daraus erhaltene NS5A(191-340)-Protein wurde mit SH3-Elutionspuffer eluiert, die NS5A(191-340)-haltigen Fraktionen vereinigt, s. Abbildung 16, und abschließend durch Größenausschlusschromatographie gereinigt, s. Abbildung 18. NS5A(191-340) hatte ein Retentionsvolumen von  $V=51$  ml und ergab 1 mg/l Expressionskultur.

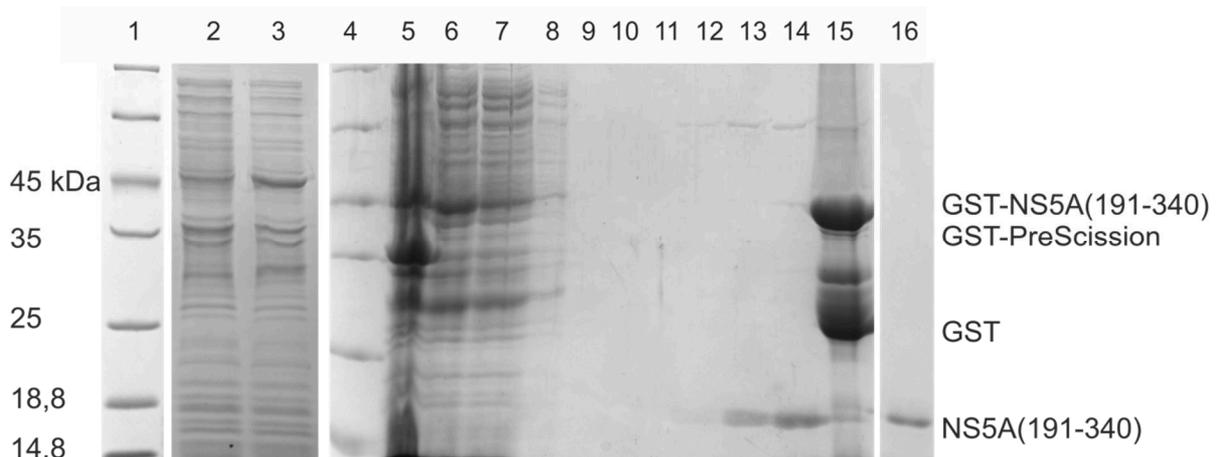


Abbildung 16. Expression und Reinigung von NS5A(191-340).

Die Expression des GST-Fusionsproteins wurde kontrolliert vor (Spalte 2) und nach (3) der Induktion mit IPTG. GST-NS5A(191-340) ist als schwache Bande bei 46 kDa zu erkennen. Die Kontrolle der Reinigung erfolgte bei den Schritten: Auftrag auf die GSH-Sepharose (5), Durchfluss (6), drei Waschfraktionen (6-8) aufsteigender Salzkonzentration, fünf Elutionsfraktionen (9-14) des hydrolysierten NS5A(191-340) bei 20 kDa und dem Säulenmaterial (15). Nach Abschluss der Reinigung wurde die Reinheit NS5A(191-340) in Spalte 16 kontrolliert.

#### 4.1.4. NS5A(191-447)

*E. coli* BL21 (DE3) T1<sup>R</sup>-Zellen wurde mit His-NS5A(191-447) im Vektor pET28a transformiert und bei 37 °C bis OD=0,6 angezogen. Die Expression wurde mit 1 mM IPTG für 4 h bei 25 °C induziert. Die Zellen wurden zentrifugiert und bei -80 °C gelagert. Das Fusionsprotein wurde nach dem Protokoll in Kapitel 3.3.7 durch Resuspension in NS5A(191-447)-Lysepuffer, Sonifikation, Zentrifugation, erneuter Sonifikation und Zentrifugation erhalten. Die Überstände wurden auf eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose aufgetragen. Das Fusionsprotein band an das Säulenmaterial erst vollständig bei erneutem Auftrag des Durchflusses. Fremdproteine wurden mit Lysepuffer aufsteigender Imidazolkonzentrationen eluiert. Bei 20 mM, 50 mM, 100 mM und 250 mM Imidazolkonzentrationen eluierte das Fusionsprotein, s. Abbildung 17, welches dialysiert und mit His-TEV-Protease hydrolysiert wurde. Die Suspension wurde mit einer erneuten Ni<sup>2+</sup>-IMAC in His-getaggte Proteine und das NS5A(191-447)-Protein getrennt.

Das erhaltene Protein wurde zentrifugiert und mit Größenausschlusschromatographie gereinigt, s. Abbildung 18. Das Retentionsvolumen von NS5A(191-447) lag bei V=48 ml. Abschließend wurde das Protein dialysiert, ultrafiltriert und gekocht. Aus einem Liter Expressionskultur wurde ca. 1 mg NS5A(191-447) erhalten.

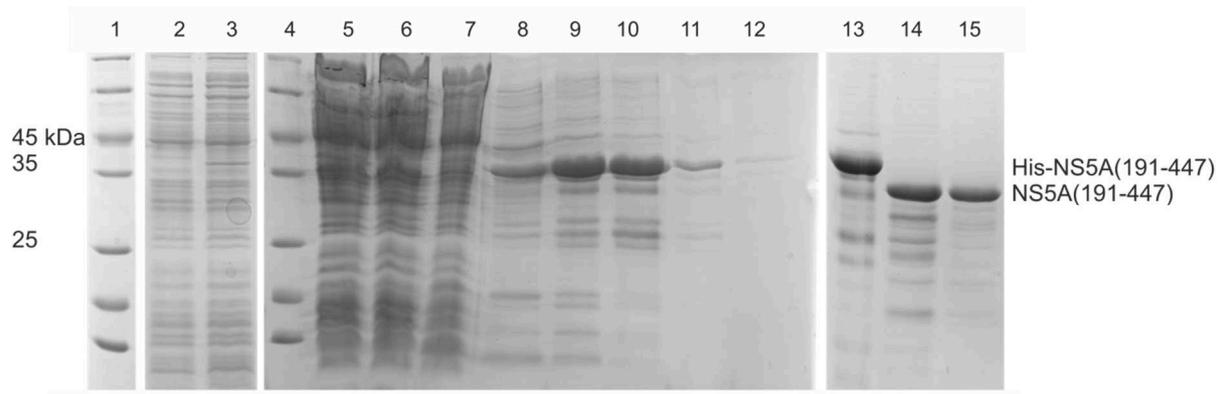


Abbildung 17. Expression und Reinigung von NS5A(191-447).

Die Expression wurde vor (Spalte 2) und nach (3) der Induktion mit IPTG kontrolliert, His-NS5A(191-447) ist bei  $M=36$  kDa zu erkennen. Die Reinigungskontrolle erfolgte beim Auftrag auf die  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose (5), Durchfluss (6), erneutem Auftrag und Durchfluss (7), fünf Wasch- bzw. Elutionsfraktionen (8-12), die His-NS5A(191-447) bei 36 kDa zeigen. His-NS5A(191-447) vor (Spalte 13) und nach (14) hydrolytischer Spaltung mit His-TEV-Protease und abschließender Reinigungskontrolle (15) ist gezeigt.

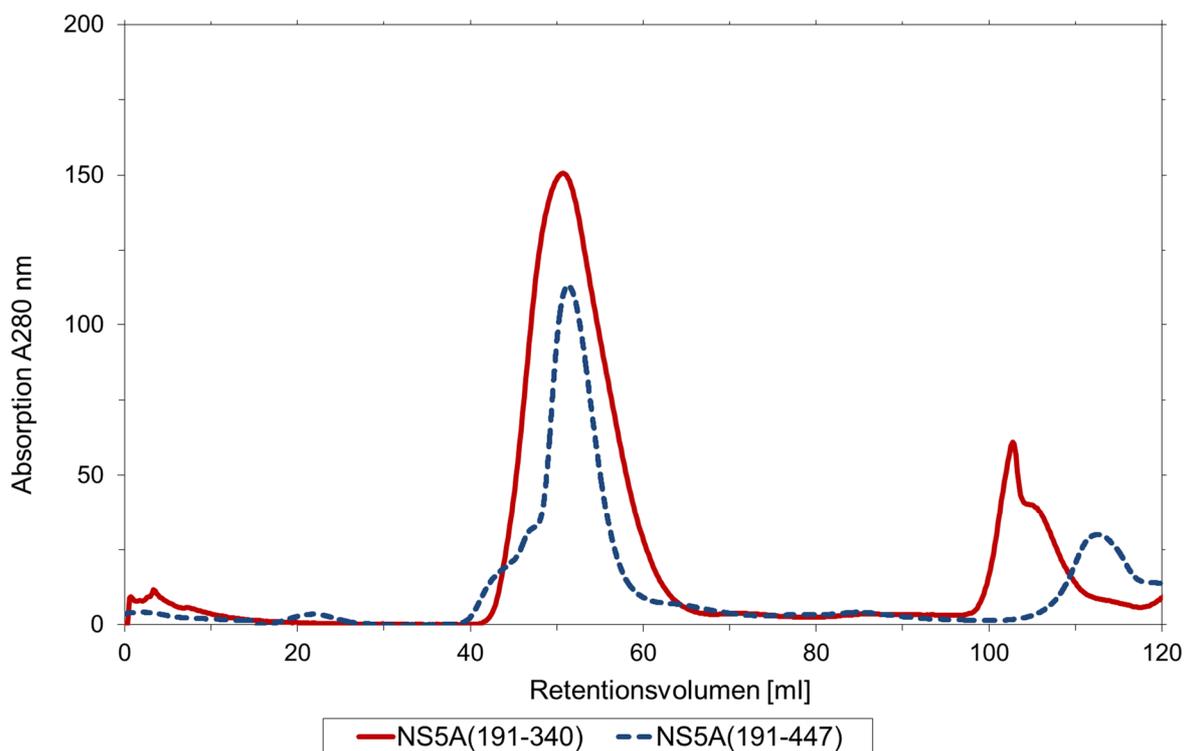


Abbildung 18. Gelfiltrationschromatogramme von NS5A(191-340) und NS5A(191-477).

NS5A(191-340) (rot) eluiert bei  $V=51$  ml Retentionsvolumen und NS5A(191-477) (blau gestrichelt) bei  $V=48$  ml.

## 4.2. Charakterisierung der Interaktionen

Die Charakterisierung der Interaktion von Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3 an drei NS5A-Konstrukten wurde mit Hilfe von SPR-, BLI- und ITC-Messungen analysiert. Die SPR- und BLI-Messungen wurden mit His-Ubiquitin-NS5A(333-369) durchgeführt, da hier ein zu immobilisierender Ligand nötig war, während bei ITC-Messungen die Konstrukte NS5A(347-361), NS5A(341-361) und His-Ubiquitin-NS5A(333-369) verwendet wurden.

### 4.2.1. Bindungsstudien mit SPR

Zur Charakterisierung der Affinitäten von Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3 an NS5A(333-369) wurden SPR-Experimente am Biacore T200 bei  $T=25\text{ °C}$  durchgeführt, s. Kapitel 3.6.1. Dazu wurde der NTA-Sensorchip mit EDTA regeneriert, mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen beladen und die beiden parallelen Flusszellen mit dem Referenzliganden His-Ubiquitin bzw. dem Interaktionsliganden His-Ubiquitin-NS5A(333-369) gekoppelt. Die Beladung des NTA-Chips mit beiden Liganden erfolgte in einem linearen Verlauf, das sprach für eine optimale Verteilung ohne Überbeladung. Auch die Auswahl des Liganden His-Ubiquitin in der Referenzzelle erwies sich als zuverlässige Referenzmessung aufgrund einerseits der Ähnlichkeit der nicht-funktionalen Einheit His-Ubiquitin und andererseits der analogen Handhabung ohne Bindeeigenschaften. Die immobilisierte Menge His-Ubiquitin-NS5A(333-369) korrelierte bei 1000 RU zu 9,9 mg/ml His-Ubiquitin-NS5A(333-369).

Zum Vergleich zwischen Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3, s. Kapitel 3.6.2, wurden zwei unterschiedliche NS5A(333-369)-Kopplungszeiten bei  $c=0,03\text{ }\mu\text{M}$  von  $t_1=210\text{ s}$  und  $t_2=420\text{ s}$  gewählt. Das führte bei einer Flussrate von  $5\text{ }\mu\text{l/min}$  zu einer Beladung des Chips mit 125 RU bzw. 250 RU, d. h.  $n_1=0,5\text{ }\mu\text{mol}$  und  $n_2=1\text{ }\mu\text{mol}$  His-Ubiquitin-NS5A(333-369). Die beiden Analyten wurden mit dem Faktor 3 verdünnt, wobei eine Höchstkonzentration von  $c=1\text{ }\mu\text{M}$  Bin1 SH3 bzw.  $c=0,5\text{ }\mu\text{M}$  Bin1 Tandem-SH3 eingesetzt wurde. Die Sensorgramme, s. Abbildung 19 und Abbildung 20, wurden mit Biacore T200 Evaluation Software prozessiert und nach den Verfahren in Kapitel 3.6.3 analysiert.

Auffällig war, dass sowohl die Assoziations- als auch Dissoziationsratenkonstante von Bin1 Tandem-SH3 in Bezug zu Bin1 SH3 divergierten. Während eine Bin1 SH3-Injektion bei niedrigen Konzentrationen ein Plateau bis zum Ende der Injektion zeigte, stieg die SPR-Antwort mit Bin1 Tandem-SH3 während der Injektion weiter an. Erst zu höheren Konzentrationen, bei den beiden vorletzten Injektionen, veränderte sich die Bindekurve bei Bin1 SH3 von einem Plateau zu einem nicht-linearen Anstieg während der Injektion. Dieses Verhalten wiederholte sich bei Bin1 Tandem-SH3. Die Dissoziation war bei Bin1 Tandem-SH3 so langsam, dass eine vollständige Dissoziation nach der letzten Injektion trotz langer Versuchszeit nicht erreicht wurde. Somit unterschieden sich die Assoziations- und Dissoziationseigenschaften von Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3 grundlegend.

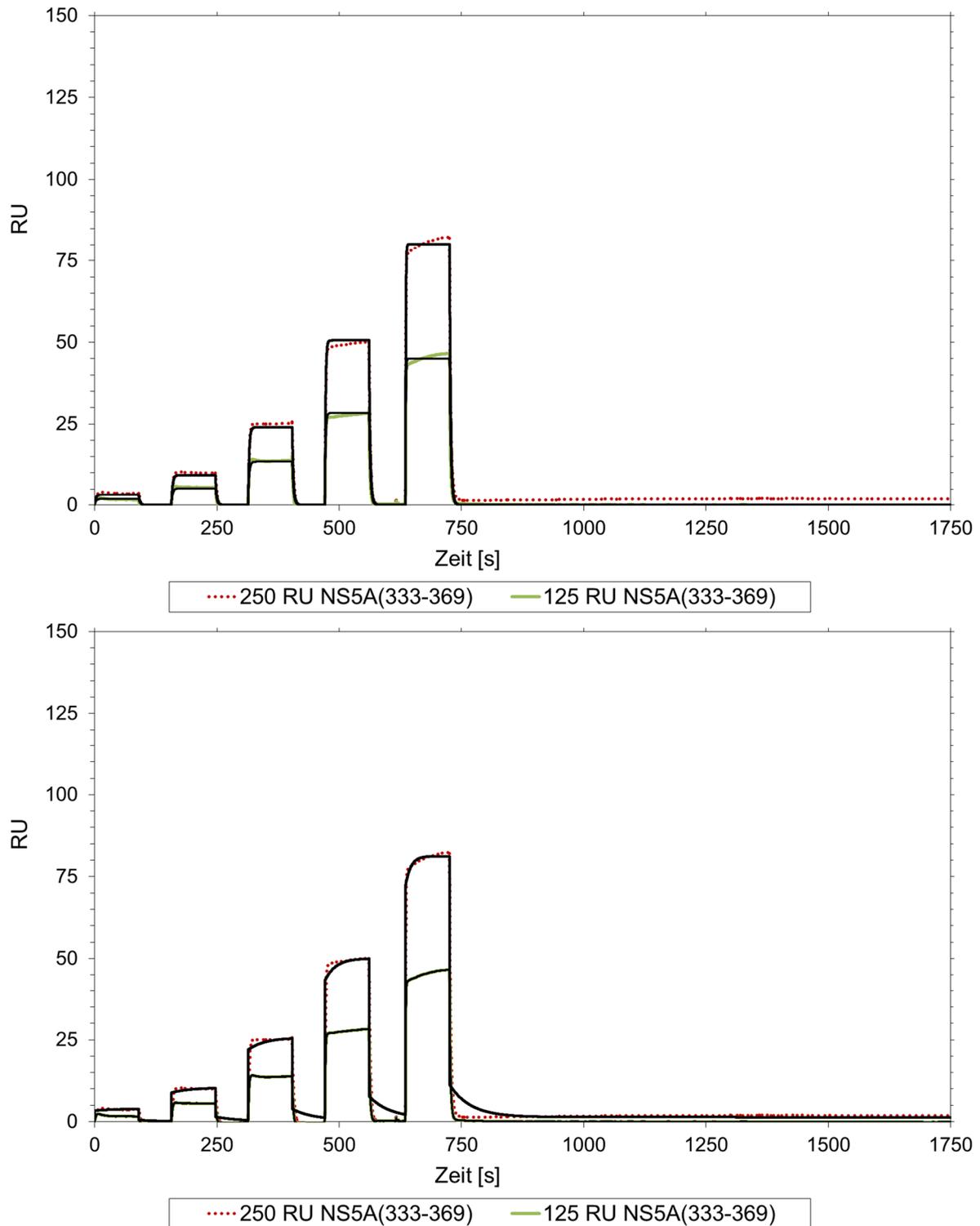


Abbildung 19. SPR-Sensorgramm von Bin1 SH3 an His-Ubiquitin-NS5A(333-369). Mit denselben Verdünnungsschritten startend ab  $1 \mu\text{M}$  bei Bin1 SH3 vom Faktor 3 wurden zwei unterschiedlich lange Immobilisierungszeiten von 420 s, 250 RU (rot gepunktet) und 210 s, 125 RU (grün) His-Ubiquitin-NS5A(333-369) vorgenommen. Die schwarzen Linien zeigen den Fit nach dem 1:1-Langmuir-Bindemodell (oben) oder dem heterogenem Analyt-Bindemodell (unten) mit RI an.

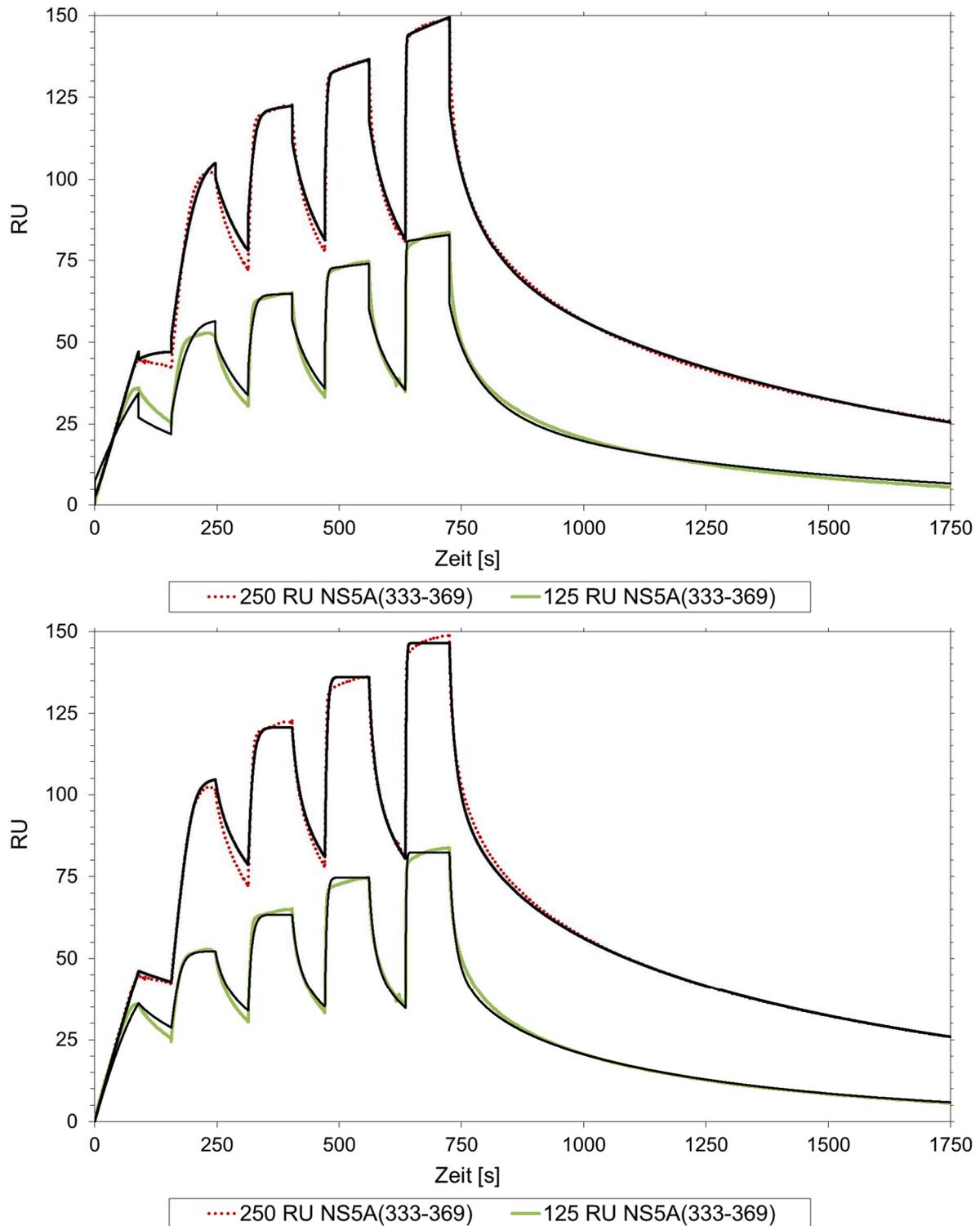


Abbildung 20. SPR-Sensorgramm von Bin1 Tandem-SH3 an His-Ubiquitin-NS5A(333-369). Mit denselben Verdünnungsschritten startend ab  $0,5 \mu\text{M}$  bei Bin1 Tandem-SH3 vom Faktor 3 wurden zwei unterschiedlich lange Immobilisierungszeiten von 420 s, 250 RU (rot gepunktet) und 210 s, 125 RU (grün) His-Ubiquitin-NS5A(333-369) vorgenommen. Die schwarzen Linien zeigen den Fit nach dem bivalenten Analytmodell (oben) mit RI oder dem heterogenen Analyt-Bindemodell (unten) an.

Tabelle 16. Auswertung der Bindung von NS5A(333-369) an Bin1 (Tandem-)SH3.

Die Zeilen 2 und 4 zeigen die Ergebnisse für das 1:1-Langmuir-Bindemodell und Zeilen 3 und 5 für die heterogenen (bei Bin1 SH3) bzw. bivalenten (bei Bin1 Tandem-SH3) Analyten-Bindemodelle mit RI. Die maximale SPR-Antwort wurde für beide Messungen lokal gefittet, da unterschiedliche Ligandkonzentrationen immobilisiert waren, damit wurden zwei  $R_{\max}$ -Werte ermittelt.

Bin1-Protein	$k_{a1}$ [1/Ms]	$k_{d1}$ [1/s]	$K_{D1}$ [nM]	$k_{a2}$	$k_{d2}$ [1/s]	$R_{\max1}$ [RU]	$R_{\max2}$ [RU]	$\chi^2$ [RU <sup>2</sup> ]
<b>SH3</b>	9,22e5 ±3,50e3	0,382 ±1e-3	415			113,5 ±0,1 63,62 ±0,07		1,25
<b>SH3</b>	10,3e5 ±8,7e3	0,464 ±4,8e-3	453	0,55 ±0,069 [1/Ms]	68,2e-4 ±510e-4	123,5 ±,34 49,11 ±0,22	4093 1627	0,34
<b>Tandem-SH3</b>	192e5 ±550e3	0,019 ±0,55e-3	1,00			113 ±0,097 55,74 ±0,096		6,71
<b>Tandem-SH3</b>	14,0e5 ±8,7e3	0,0158 ±0,12e-3	11,3	9,12e-5 ±5,4e-7 [1/RU s]	9,47e-4 ±330e-4	159,3 ±0,23 74,7 ±0,13		2,38

Die Auswertung der SPR-Daten erfolgte zunächst mit dem 1:1-Langmuir-Bindemodell, dabei wurden Dissoziationskonstanten von  $K_D=415$  nM mit  $k_a/k_d=9,22 \cdot 10^5$   $M^{-1}s^{-1}/0,382$   $s^{-1}$  für Bin1 SH3 bzw.  $K_D=1$  nM mit  $k_a/k_d=1,92 \cdot 10^7$   $M^{-1}s^{-1}/0,019$   $s^{-1}$  für Bin1 Tandem-SH3 berechnet, s. Tabelle 16. Die Bindekapazität wurde für beide Proteine nach dem 1:1-Langmuir-Bindemodell mit  $R_{\max}=113$  RU angegeben. Die Abweichung aufgrund des  $\chi^2$ -Wertes bei beiden Proteinen legte nahe, dass die kinetischen Daten nicht hinreichend mit einem 1:1-Langmuir-Bindemodell beschrieben werden konnten. Durch die vergrößerte Antwort während der Injektion bei höheren Konzentrationen, kann für diesen Teil der Interaktion kein 1:1-Langmuir-Bindemodell angenommen werden.

Die schnelle Assoziation des Bin1 SH3 konnte bei niedrigen Konzentrationen bis  $c=0,25$   $\mu M$  mit dem 1:1-Langmuir-Bindemodell beschrieben werden, jedoch traten bei höheren Konzentrationen weitere Assoziationen auf, die nicht mehr mit diesem Modell beschrieben werden konnten, s. Abbildung 19 oben. Ein bivalenter Analyt mit zwei Bindestellen, ebenso wie zwei Konformationen des Analyten unter 1:1-Bindung, konnten ausgeschlossen werden, da es dabei zu keiner weiteren Erhöhung der Masse an der Matrix käme. Auch wenn die PPR-Region des Liganden aus drei putativen PxxP-Motiven bestand, so war die Interaktion des Analyten nicht unabhängig sondern zweiphasig, dieses heterogene Liganden-Modell beschrieb ebenfalls nicht die langsame Assoziation. Die langsamere Assoziation könnte mit einem heterogenen Analytmodell beschrieben werden. Mit diesem heterogenen Analytenmodell wurde die Interaktion des Bin1 SH3 beschrieben mit  $k_a/k_d=1,03 \cdot 10^6$   $M^{-1}s^{-1}/0,464$   $s^{-1}$  und  $k_a/k_d=0,55$   $M^{-1}s^{-1}/6,82 \cdot 10^{-5}$   $s^{-1}$  und einer apparenten Dissoziationskonstante von  $K_D=k_d/k_a=453$  nM. Die schnelle Assoziation wurde damit wie mit dem 1:1-Langmuir-Bindemodell gut wiedergegeben, allerdings waren die zweiten Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten extrem klein, und das führte zu sehr hohen Bindekapazitäten. Jedoch wichen hierbei die Injektionen bis  $c=0,11$   $\mu M$  Bin1 SH3 ab, sodass auch dieses

Modell nicht die Kinetik Bin1 SH3 beschrieb, s. Abbildung 19 unten. Folglich wurde bei Bin1 SH3 davon ausgegangen, dass Bin1 SH3 zunächst einfach band, dann eine Umorganisation stattfand und anschließend ein weiterer Analyt den Liganden band, die zum nicht-linearen Anstieg während der Injektion bei den höheren Konzentrationen ab  $c=0,33 \mu\text{M}$  führte.

Bei Bin1 Tandem-SH3 konnte hingegen angenommen werden, dass die beiden Domänen separat binden können und daher die Daten mit dem bivalenten Analyt-Bindemodell ausgewertet werden können. Das Modell fittete die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten für Bin1 Tandem-SH3 mit  $k_a/k_d=1,40 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}/0,0158 \text{ s}^{-1}$  und  $k_a/k_d=9,12 \cdot 10^{-5} \text{ RU}^{-1}\text{s}^{-1}/9,47\text{e-}4 \text{ s}^{-1}$  und die apparente Dissoziationskonstante mit  $K_{D1}=k_d/k_a=11,3 \text{ nM}$ . Dieses Modell beschrieb den Massenanstieg der letzten Injektionen ab  $c=0,17 \mu\text{M}$  zufriedenstellend, da eine kleine Assoziationsratenkonstante bestimmt wurde, jedoch die ersten Injektionen nicht wiedergegeben wurden, s. Abbildung 20 oben. Dabei ist zu beachten, dass die zweite Assoziationsratenkonstante nicht in  $[\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$  sondern in  $[\text{RU}^{-1}\text{s}^{-1}]$  angegeben ist, da die zweite Assoziation keine weitere Massenänderung hervorrufen kann, da bereits der Analyt an einer Bindestelle assoziiert hat. Das heterogene Analyten-Modell gab währenddessen die schnelle Assoziation wider, aber die langsame nicht, s. Abbildung 20 unten. Jedes andere im SPR-Programm hinterlegte Modell beschrieb die Daten mit noch größeren Abweichungen: Ein konkurrierendes Verhalten der beiden SH3-Domänen (heterogener Analyt), konformationelle Änderungen, die neben der 1:1-Komplexierung auftraten, und ebenfalls das heterogene Ligand-Bindemodell konnten durch die beiden äquivalenten Domänen ausgeschlossen werden. Die langsame Dissoziation des Komplexes sprach für eine stabilisierende Wirkung der zweiten SH3-Domäne, da jene für Bin1 Tandem-SH3 in Bezug zu Bin1 SH3 deutlich verlangsamt war. Damit interagieren die beiden Domänen des Bin1 Tandem-SH3 separat, zunächst erfolgte eine einfache Assoziation, danach eine Konformationsänderung des Komplexes und die Assoziation der zweiten Domäne entweder an ein PxxP-Motiv desselben NS5A-Liganden oder an einen anderen räumlich nahegelegenen Liganden. Es muss beachtet werden, dass die niederraffine Bindestelle während der Messung keine Sättigung erreichte und somit die Affinitäten nicht hinreichend genau berechnet wurden. Es ist außerdem anzumerken, dass die Gerätespezifischen Limits der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante mit den Bereichen  $k_a \sim 10^3\text{-}10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bzw.  $k_d \sim 10^{-1}\text{-}10^{-6} \text{ s}^{-1}$  für die Messungen erreicht wurden.

Als robusteste Methode konnte deshalb nur die Gleichgewichtsanalyse durchgeführt werden, die hauptsächlich die schnelle Assoziation erfasste, jedoch durch die nicht erfasste langsame Assoziation eine fehlerhaft erhöhte Bindekapazität und eine verringerte Assoziationskonstante ergab. Durch das inverse Verhalten der Assoziationskonstante zur Dissoziationskonstante wurden zu hohe Dissoziationskonstanten erlangt. Die Gleichgewichtsanalyse erfolgte nach Mittelung der letzten 4 s vor Injektionsstopp für 5 s der jeweiligen Konzentration, s. Abbildung 21, und ergab folgende Dissoziationskonstanten, s. Tabelle 17:  $K_D=428 \text{ nM}$  bzw.  $K_D=446 \text{ nM}$  für Bin1 SH3 und  $K_D=12 \text{ nM}$  bzw.  $K_D=9 \text{ nM}$  für Bin1 Tandem-SH3 bei 250 RU bzw. 125 RU gekoppeltem His-Ubiquitin-NS5A(333-369). Das Konzentrationsverhältnis Analyt zu Ligand entspricht der Aktivität bei maximaler Beladung des Liganden. Die Berechnung der Aktivität geht davon aus, dass die gesamte

Ligandenpopulation zugänglich und intakt ist. Sie betragen für Bin1 SH3 im Mittel 83 % und für Bin1 Tandem-SH3 48 %. Folglich konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von Bin1 SH3 verdoppelt war. Die Aktivität unterstützt die beschriebenen kinetischen Modelle, da für Bin1 SH3 zwei Bindestellen zugänglich sind, während für das Bin1 Tandem-SH3 mit beiden schon vorhandenen Domänen diese mit nur einem Molekül belegt sind.

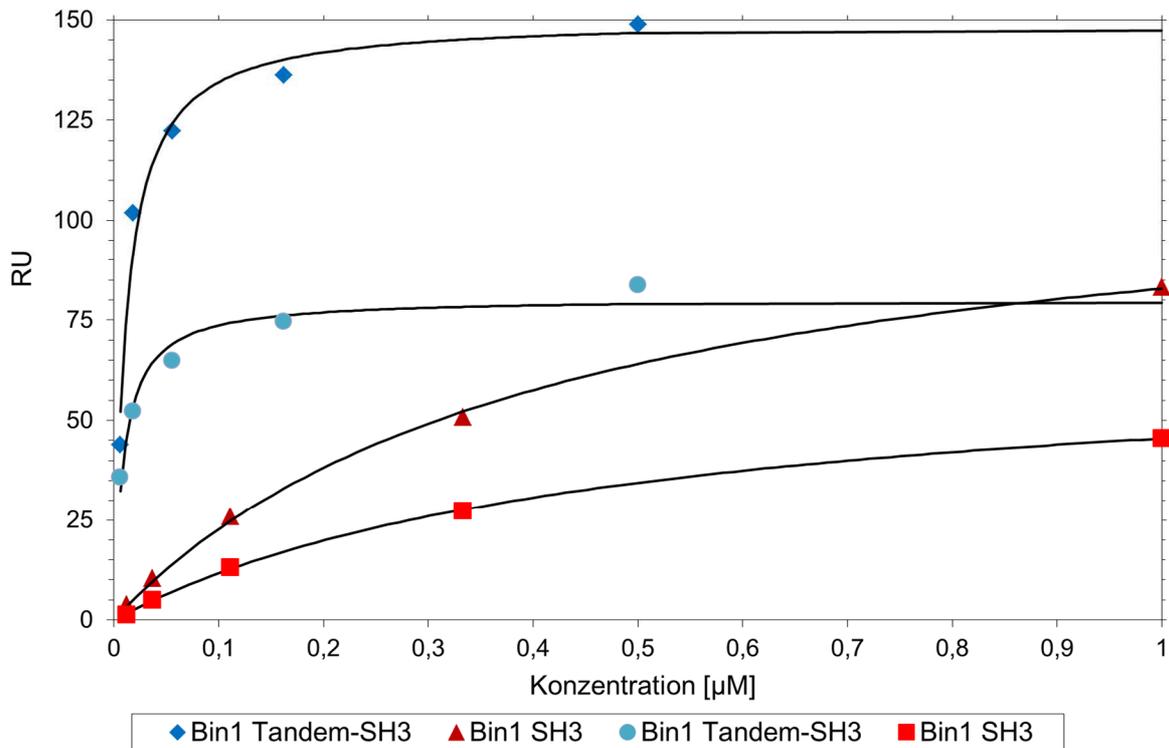


Abbildung 21. Gleichgewichtsanalyse der Bindung von Bin1 (Tandem-)SH3 an NS5A(333-369). Die experimentellen Daten sind für Bin1 SH3 (rot, für 250 RU Dreiecke, für 125 RU Quadrate) und für Bin1 Tandem-SH3 (blau, für 250 RU Rauten, für 125 RU Kreise) dargestellt. Die jeweiligen Fits sind schwarze Linien.

Tabelle 17. Gleichgewichtsanalyse der Bindung von Bin1 (Tandem-)SH3 an NS5A(333-369). Die Auswertung erfolgte mit den Daten aus Abbildung 21.

Bin1-Protein	Ligand [RU]	$K_D$ [nM]	$R_{max}$ [RU]	$\chi^2$ [RU <sup>2</sup> ]	Aktivität [%]
SH3	250	428±28	117,0±3,3	1,09	78
SH3	125	446±22	67,05±1,5	0,20	88
Tandem-SH3	250	11,7±0,2	150,1±6,1	61,0	46
Tandem-SH3	125	9,22±1,85	80,48±3,18	18,5	49

Die weiteren Versuchsreihen mit Einzelzykluskinetiken sollten einen Vergleich von Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3 bei niedrigen Analyt-Konzentrationen mit einer lückenlosen Konzentrationspanne ermöglichen, s. Kapitel 3.6.2. Hierbei wurden  $t=420$  s bei  $5 \mu\text{l}/\text{min}$   $c=0,01 \mu\text{M}$  His-Ubiquitin bzw. His-Ubiquitin-NS5A(333-369) auf die  $\text{Ni}^{2+}$ -beladenen Sensorchips immobilisiert. Drei Verdünnungsreihen wurden von den beiden Analytproteinen angelegt und injiziert. Die überlagerten Sensorgramme sind in Abbildung 22 und Abbildung 23 dargestellt.

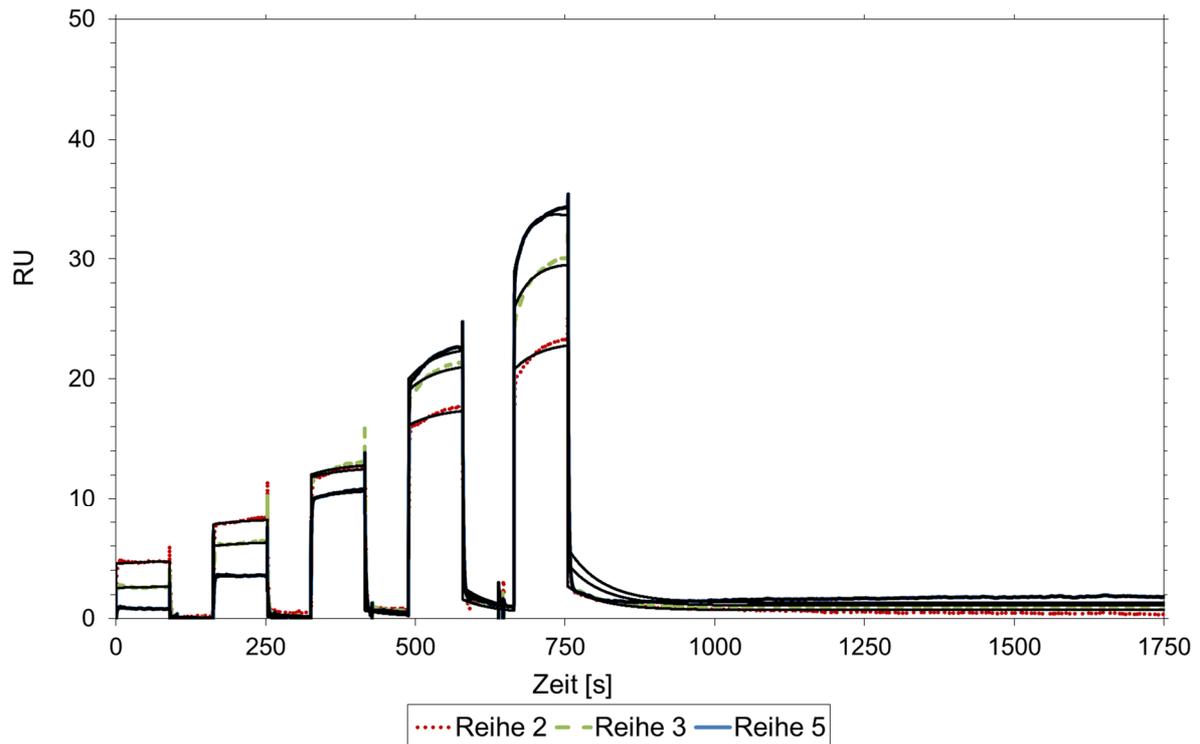


Abbildung 22. SPR-Sensorgramme von Bin1 SH3 an His-Ubiquitin-NS5A(333-369). Überlagerung der Sensorgramme mit den Verdünnungsfaktoren 2 (rot gepunktet) 3 (grün gestrichelt) und 5 (blau) ausgehend von  $1 \mu\text{M}$  für Reihe 2,  $2,5 \mu\text{M}$  für Reihe 3 und  $5 \mu\text{M}$  Bin1 SH3 für Reihe 5. Der Fit nach dem heterogenen Analyt-Bindemodell mit RI ist als schwarze Linie dargestellt.

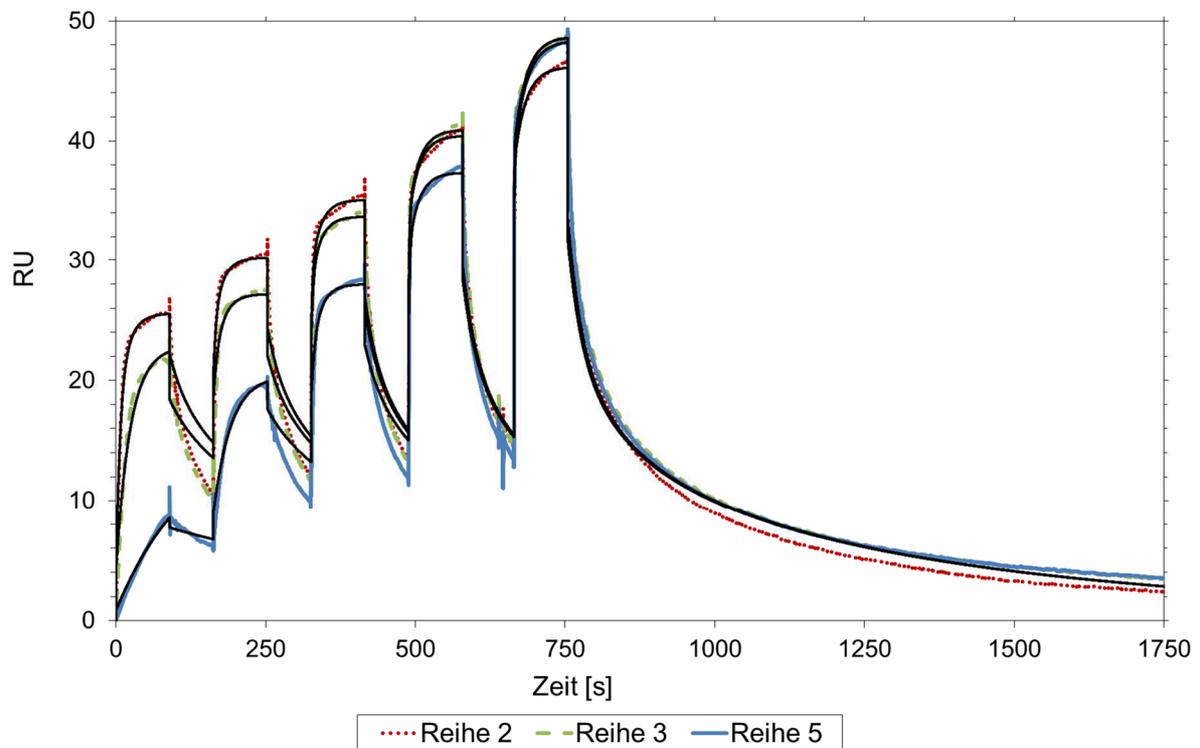


Abbildung 23. SPR-Sensorgramme von Bin1 Tandem-SH3 an His-Ubiquitin-NS5A(333-369). Überlagerung der Sensorgramme mit den Verdünnungsfaktoren 2 (rot gepunktet) 3 (grün gestrichelt) und 5 (blau) ausgehend von  $0,5 \mu\text{M}$  für Reihe 2,  $0,83 \mu\text{M}$  für Reihe 3 und  $1 \mu\text{M}$  Bin1 Tandem-SH3 für Reihe 5. Der Fit nach dem bivalenten Analyt-Bindemodell mit RI ist als schwarze Linie dargestellt.

Tabelle 18. Bindemodelle zur Interaktion von Bin1 (Tandem-)SH3 an NS5A(333-369) mit SPR. Auswertungen nach dem 1:1-Langmuir-Bindemodell befinden sich in Zeile 2 und 4 und nach dem heterogenen (für Bin1 SH3) bzw. bivalenten (für Bin1 Tandem-SH3) Analyt-Bindemodell in Zeilen 3 und 5.

<b>Bin1-Protein</b>	<b><math>k_{a1}</math> [1/MS]</b>	<b><math>k_{d1}</math> [1/s]</b>	<b><math>K_{D1}</math> [nM]</b>	<b><math>k_{a2}</math></b>	<b><math>k_{d2}</math> [1/s]</b>	<b><math>R_{max1}</math> [RU]</b>	<b><math>R_{max2}</math> [RU]</b>	<b><math>X^2</math> [RU<sup>2</sup>]</b>
<b>SH3</b>	1,11e6 ±8,3e3	0,534 ±0,004	482			34,22 ±0,04		1,27
<b>SH3</b>	1,23e6 ±6,0e3	0,654 ±0,003	532	37,22 ±1,1 [1/MS]	3,26e-4 ±4,3e-6	33,88 ±0,02	453	0,35
<b>Tandem-SH3</b>	22,4e6 ±700e3	0,040 ±0,001	1,79			47,69 ±0,04		3,48
<b>Tandem-SH3</b>	1,04e6 ±7,2e3	0,019 ±1,6e-4	18,2	1,56e-2 ±2,3e-4 [1/RU s]	2,07e-2 ±3,0e-4	37,02 ±0,10		1,32

Auch bei diesen Sensorgrammen war zu erkennen, dass lediglich bei kleinen eingesetzten Konzentrationen die schnelle Assoziation beobachtet wurde und die langsame erst bei höheren Konzentrationen auftrat. Besonders auffällig war, dass bei der kleinsten Konzentration von 2 nM Bin1 Tandem-SH3 ein linearer Massenanstieg von sofortiger Bindung Bin1 Tandem-SH3 an NS5A zeugte. Ein Effekt, der bei Bin1 SH3 und bei höheren Konzentrationen von Bin1 Tandem-SH3 nicht zu beobachten ist. Erneut wurde trotz langer Experimentdauer die gesamte Dissoziation von Bin1 Tandem-SH3 nicht vollständig erfasst. Im Vergleich zu den ersten beiden Messreihen wurde das mehrphasige Verhalten noch prägnanter observiert.

Nach dem 1:1-Langmuir-Bindemodell wurden  $K_D=482$  nM mit  $k_a/k_d=1,11 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}/0,534 \text{ s}^{-1}$  für Bin1 SH3 und  $K_D=2$  nM mit  $k_a/k_d=2,24 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}/0,040 \text{ s}^{-1}$  für Bin1 Tandem-SH3 ermittelt, s. Tabelle 18. Auch hierbei erwies sich das heterogene Analyt-Bindemodell für Bin1 SH3 als vorteilhaft und beschrieb die Bindung mit  $k_a/k_d=1,23 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}/0,654 \text{ s}^{-1}$  und  $k_a/k_d=37 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}/3,26 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  mit einer apparenten Dissoziationskonstante von  $K_D=k_a/k_d=532$  nM. Jedoch wurden erneut die langsame Assoziation nicht mit dem 1:1-Langmuir- und die schnelle Assoziation nicht mit dem heterogenen Analyt-Modell erfasst, da hierbei wieder sehr kleine Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten mit einer hohen Bindekapazität bestimmt wurden. Das sprach erneut für eine erste Assoziation Bin1 SH3, einer Konformationsänderung des Komplexes und einer weiteren Assoziation Bin1 SH3s. Das bivalente Analyt-Modell gab die Interaktion von Bin1 Tandem-SH3 an NS5A(333-369) wieder mit  $k_a/k_d=1,04 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}/1,90 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  und  $k_a/k_d=1,56 \cdot 10^{-2} \text{ RU}^{-1} \text{ s}^{-1}/2,07 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  und  $K_D=18$  nM. Auch hier war weder das heterogene Analyt-Modell geeignet um die langsame Assoziation zu beschreiben, noch das bivalente Analyt-Modell für die niedrigen Konzentrationen. Alle weiteren Modelle wurden, wie für die ersten beiden Sensorgramme, aufgrund der verwendeten Liganden und Analyten verworfen, sodass auch hier zunächst die einfache Interaktion einer SH3-Domäne an den Liganden anhand des linearen Massenanstiegs stattfand, dann eine Umorganisation des Komplexes und eine weitere Assoziation der benachbarten Domäne.

Die Gleichgewichtsanalyse, s. Kapitel 3.6.3, wurde ebenfalls angewandt unter den limitierenden Bedingungen der beiden zuerst beschriebenen Sensorgramme. Die für 5 s

gemittelten Maxima 4 s vor Injektionsstopp der jeweiligen Konzentration wurden gegen die Konzentration aufgetragen, s. Abbildung 24. Die Dissoziationskonstanten betragen für die Bindung von Bin1 SH3 an NS5A(333-369)  $K_D=498$  nM und für Bin1 Tandem-SH3  $K_D=34$  nM, s. Tabelle 19. Die Aktivitäten betragen 93 % für Bin1 SH3 und 54 % für Bin1 Tandem-SH3. Erneut wurde die Aktivität im Falle Bin1 Tandem-SH3s halbiert.

Tabelle 19. Gleichgewichtsanalyse zur Bindung von Bin1 (Tandem-)SH3 an NS5A(333-369) mit SPR. Die aus Abbildung 24 graphisch dargestellten Kurven wurden getrennt in Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3 gefittet.

Bin1-Protein	$K_D$ [nM]	$R_{max}$ [RU]	$\chi^2$ [RU <sup>2</sup> ]	Aktivität [%]
SH3	498±3,5	36,0±0,9	0,85	93
Tandem-SH3	34,1±3,5	66,8±6,1	3,75	54

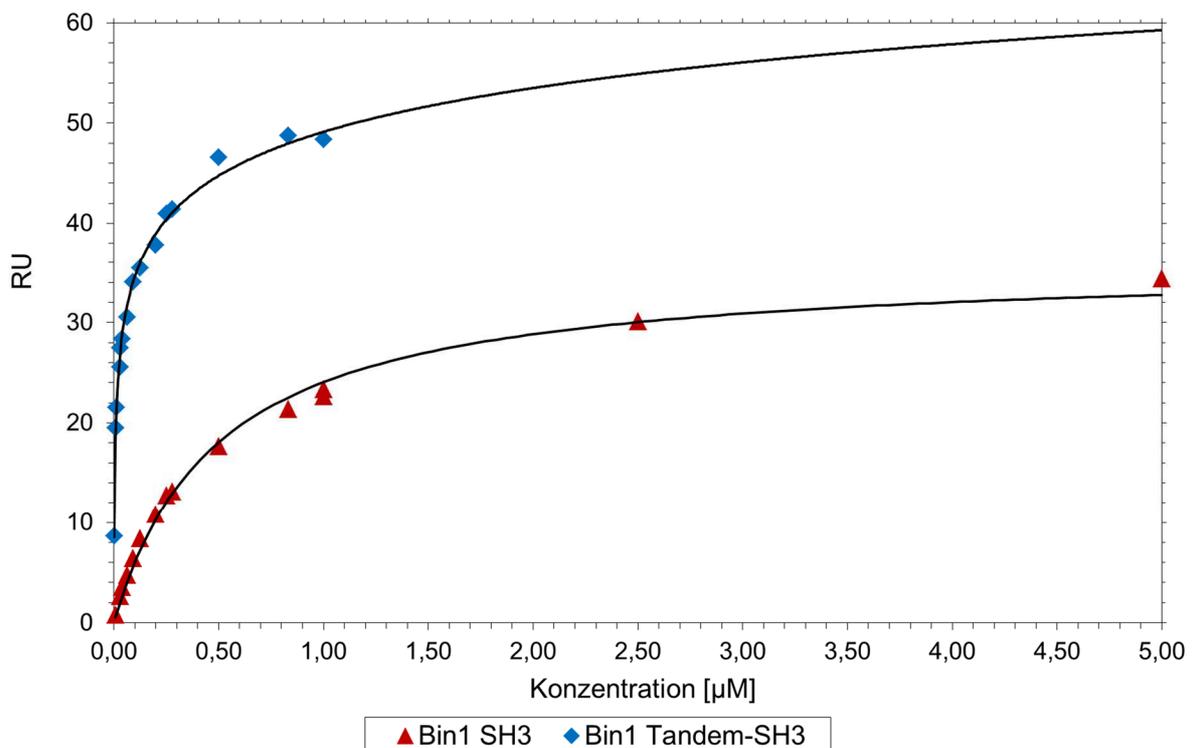


Abbildung 24. Gleichgewichtsanalyse der SPR-Sensorgramme von Bin1 (Tandem-)SH3. Experimentelle Daten zu Bin1 SH3 (rotes Dreieck) und Bin1 Tandem-SH3 (blaue Raute) wurden mit dem 1:1-Langmuir-Bindemodell gefittet (schwarze Linien).

#### 4.2.2. Bindungsstudien mit BLI

Die Bindung von Bin1 SH3 bzw. Bin1 Tandem-SH3 an His-Ubiquitin-NS5A(333-369) wurde zusätzlich zur SPR, s. Kapitel 3.6, mit BLI am FortéBio OctetRED96 untersucht, s. Kapitel 3.7. Dabei wurde His-Ubiquitin-NS5A(333-369) an  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-beladene Spitzen immobilisiert, äquilibriert und in Analytlösungen getaucht. Die Beladung der Spitzen erfolgte mit 2 mg/ml His-Ubiquitin-NS5A(333-369) in einem linearen Verlauf ohne optisch sichtbare Dissoziation von His-Ubiquitin-NS5A(333-369) von den Spitzen. Die immobilisierte Konzentration korrelierte zu 2 mg/ml/ $\delta\text{nm}$ . Die Analytlösungen bestanden aus Bin1 SH3 mit einer Höchstkonzentration von  $c=1 \mu\text{M}$  in einer Verdünnungsreihe mit dem Faktor zwei, sowie Bin1 Tandem-SH3 mit  $c=0,5 \mu\text{M}$  mit dem gleichen Verdünnungsfaktor, s. Abbildung 25 und Abbildung 26. Damit waren die eingesetzten Konzentrationen analog zu denen in den SPR-Messungen. Die Daten wurden mit einer Aufnahmezeit von 5 Hz bei 30 °C unter 1000 rpm vertikaler Rotation ermittelt, s. Kapitel 3.7.1.

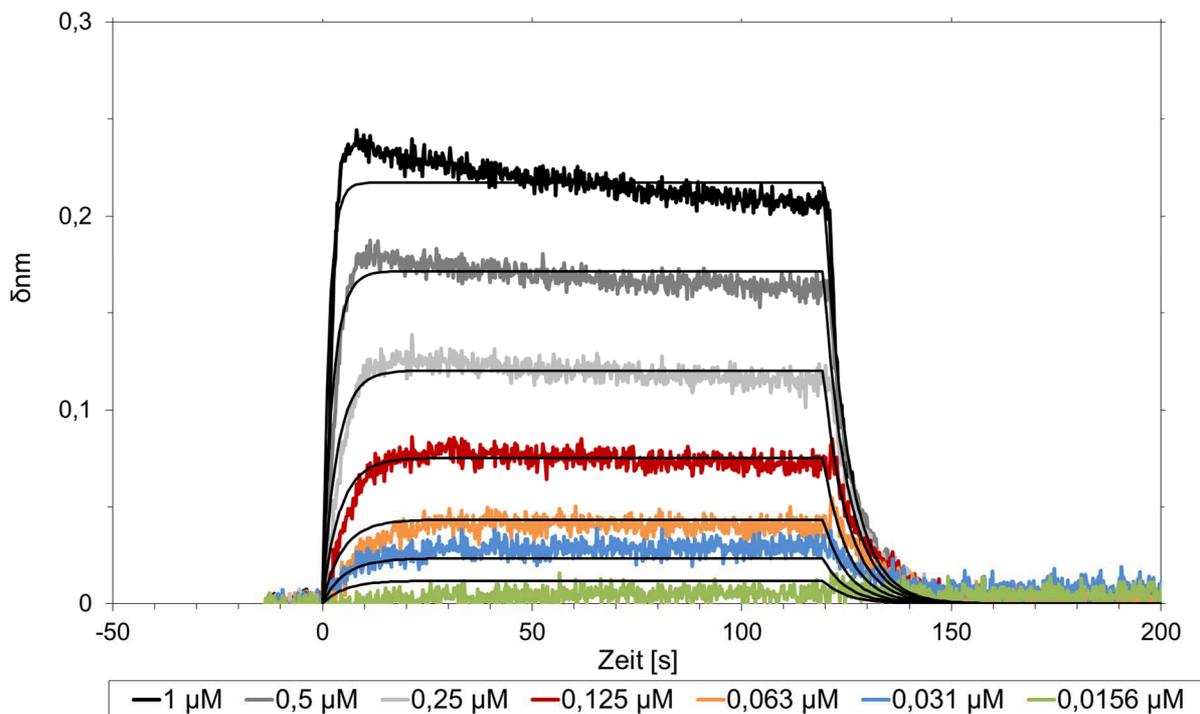


Abbildung 25. Bio-Layer Interferometrie von Bin1 SH3 an His-Ubiquitin-NS5A(333-369).

Auf Spitzen mit immobilisiertem His-Ubiquitin-NS5A(333-369) wurde Bin1 SH3 in den Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$ , 500 nM, 250 nM, 125 nM, 63 nM, 31 nM und 15,6 nM gebunden. Die Darstellung der Messkurven erfolgte nach Abzug der Puffermessung. Der Fit nach dem heterogenen Analyt-Modell ist als schwarze dünne Linie dargestellt.

Den Messkurven war zu entnehmen, dass die Bindung von Bin1 SH3 an NS5A(333-369) sowohl durch eine schnelle Assoziation als auch durch eine schnelle Dissoziation beschrieben werden konnte. BLI-Messkurven wurden, wie in Kapitel 3.7.2 beschrieben, zunächst kinetisch mit dem 1:1-Langmuir-Bindemodell für Bin1 SH3 ausgewertet und eine Dissoziationskonstante von  $K_D=184 \text{ nM}$  mit  $k_a/k_d=7,55 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}/0,139 \text{ s}^{-1}$  ermittelt, s. Tabelle 20. Parallel dazu fand ein weiterer Prozess statt, der dazu führte, dass bei höheren

Konzentrationen kein Plateau erreicht wurde. Dieser Effekt konnte nicht durch eine Dissoziation des Komplexes erklärt werden, diese wäre zwar erkennbar an einer verringerten Schichtdicke im Verlauf der Assoziationsphase, aber nach vollständiger Dissoziation des Bin1 SH3 wurde für alle Messreihen die BLI-Antwort vor der Beladung mit Bin1 SH3 erreicht. Direkt nach dem Eintauchen der Spitzen in die Analytlösung erfolgte eine zusätzliche BLI-Antwort bei höheren Konzentrationen ab  $c=0,25 \mu\text{M}$ . Somit konnte dieses kinetische Verhalten für einen heterogenen Analyten stehen. Nach diesem Modell wurden eine apparente Dissoziationskonstante von  $K_{D1}=376 \text{ nM}$  mit  $k_a/k_d=4,28 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}/0,161 \text{ s}^{-1}$  und  $k_a/k_d=76,4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}/3,61 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  erhalten. Für Bin1 SH3 konnten andere Interaktionsmodelle ausgeschlossen werden, da die SH3 nur eine Bindestelle aufweist. Da diese zusätzliche BLI-Antwort nur bei hohen Konzentrationen auftrat, erfolgte zunächst eine einfache 1:1-Bindung verbunden mit einer konformationellen Änderung des Komplexes und eine weitere Assoziation eines Analyten an ein weiteres PxxP-Motiv, sobald dieses zugänglich war.

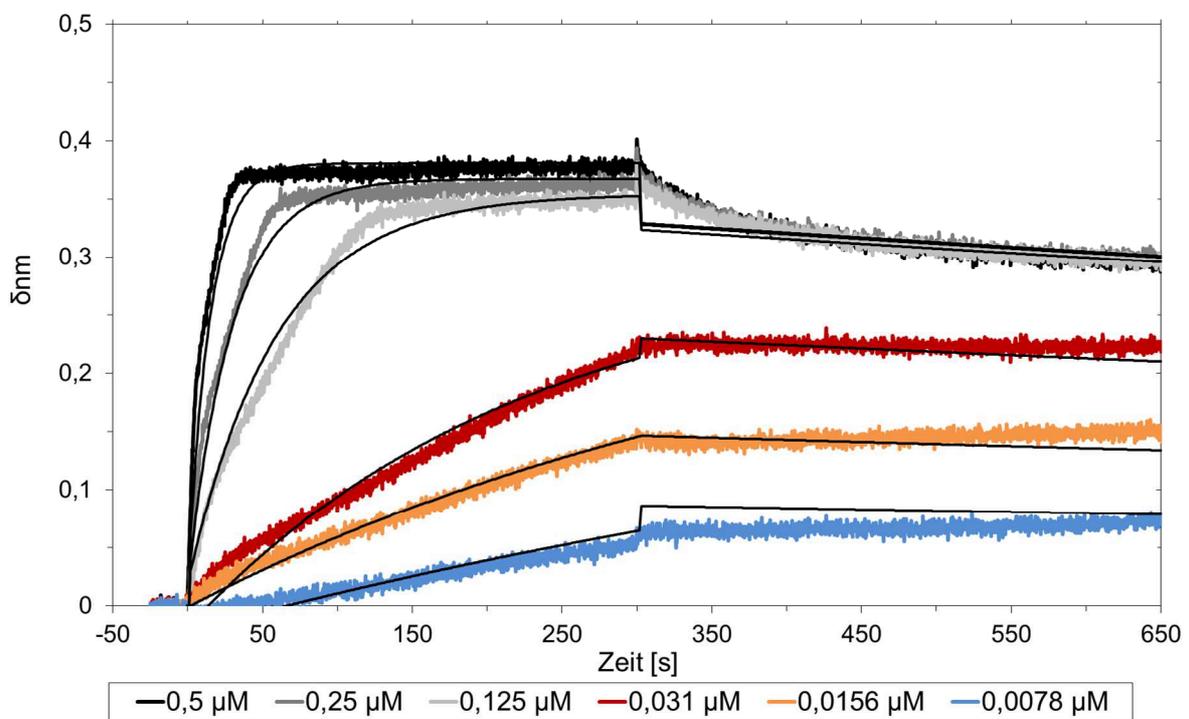


Abbildung 26. Bio-Layer Interferometrie von Bin1 Tandem-SH3 an His-Ubiquitin-NS5A(333-369). Auf Spitzen mit immobilisiertem His-Ubiquitin-NS5A(333-369) wurde Bin1 Tandem-SH3 in den Konzentrationen von 500 nM, 250 nM, 125 nM, 63 nM, 31 nM, 15,6 nM und 7,8 nM gebunden. Die Darstellung der Messkurven erfolgte nach Abzug der Puffermessung. Der Fit nach dem bivalenten Analyt-Modell mit RI ist als schwarze dünne Linie dargestellt.

Die Messkurven der verschiedenen Bin1 Tandem-SH3-Konzentrationen unterschieden sich. Im nieder-konzentrierten Bereich wurde ein linearer Anstieg der Beladung des His-Ubiquitin-NS5A(333-369) mit Bin1 Tandem-SH3 festgestellt. Sämtliche Bin1 Tandem-SH3-Moleküle in der Messlösung wurden gebunden, eine Gleichgewichtseinstellung der Assoziations- und Dissoziationsrate erfolgte nicht. Bei den höherkonzentrierten Lösungen ab  $c=125 \text{ nM}$  war eine Teilung der Messkurve in drei Abschnitte möglich: instantaner Anstieg der Schichtdicke,

linearer langsamerer Beladungsanstieg und das Plateau, das für eine Gleichgewichtseinstellung von Assoziation und Dissoziation sprach. Eine Dissoziation wurde lediglich ab  $c=125$  nM Analyt detektiert, sie könnte bedingt sein durch eine Assoziation von Proteinmolekülen an die „well plate“ bis zur Gleichgewichtseinstellung. Da im Gegensatz zur SPR bei der BLI geschüttelt und keine hohe Flussgeschwindigkeit angesetzt wurde, bei der die Analyten weggeschwemmt wurden, war keine nennenswerte Dissoziation zu erkennen. Somit war eine Auswertung der Messkurven aufgrund der langsamen Dissoziation von Bin1 Tandem-SH3 erschwert. Für Bin1 Tandem-SH3 wurde nach dem 1:1-Langmuir-Bindemodell eine Dissoziationskonstante von  $K_D=2,3$  nM mit  $k_a/k_d=1,32 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} / 3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  ermittelt, s. Tabelle 20. Die Kinetik der Interaktion beider SH3-Domänen konnte mit dem bivalenten Analyt-Bindemodell  $k_a/k_d=6,25 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} / 6,23 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  und  $k_a/k_d=9,82 \cdot 10^{-5} \text{ RU}^{-1} \text{ s}^{-1} / 1,37 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  mit einer apparenten Dissoziationskonstante von  $K_D=139$  nM beschrieben werden. Anhand der Unterschiede zwischen niedrigen und hohen eingesetzten Konzentrationen und der Schichtdicke kann spekuliert werden, dass bei niedrigen Konzentrationen ein 1:1-Komplex entstand, während bei höheren Konzentrationen nur eine SH3-Domäne des Bin1 Tandem-SH3 an NS5A assoziierte. Durch den linearen Beladungsanstieg mit einer halbierten Maximalantwort wird der 1:1-Komplex angenommen, sodass beide SH3-Domänen an einen Liganden banden, während im Überschuss lediglich die hochaffine Bindestelle des Liganden besetzt wurde.

Tabelle 20. Kinetische Auswertung der BLI-Messung von NS5A(333-369) und Bin1 (Tandem-)SH3. Auswertungen nach dem 1:1-Langmuir-Bindemodell befinden sich in Zeile 2 und 4 und nach dem heterogenen sowie bivalenten Analyt-Bindemodell in Zeilen 3 und 5.

Bin1-Protein	$k_{a1}$ [1/Ms]	$k_{d1}$ [1/s]	$K_{D1}$ [nM]	$k_{a2}$	$k_{d2}$ [1/s]	$K_{D2}$ [μM]	$R_{max1}$ [δnm]	$\chi^2$ [δnm <sup>2</sup> ]
SH3	7,55e5 ±43,5e2	0,139 ±2,63e-3	184				0,218 ±89e-4	5,92e-2
SH3	4,28e5 ±38,7e2	0,161 ±1,32e-3	376	76,4 ±34,2 [1/Ms]	3,61e-3 ±1,03e-3	47,82	0,3 ±8,1e-4	5,53e-5
Tandem-SH3	1,32e5 ±4,99e2	3,0e-04 ±7,3e-6	2,3				0,36 ±5,4e-4	2,30e-2
Tandem-SH3	0,625e5 ±1,22e2	6,23e-4 ±9,8e-5	9,97	9,82e-5 ±1,2e-4 [1/RUs]	0,0137 ±4,35e-3		0,368 ±2,9e-4	2,81e-4

Neben der kinetischen Auswertung wurde die Gleichgewichtsanalyse nach Kapitel 3.6.3 durchgeführt. Dabei wurden die letzten 5 s vor Wechsel von Analytlösung zum Puffer gemittelt und in Beladung gegen Konzentration dargestellt, s. Abbildung 27. Die Gleichgewichtsanalyse, s. Tabelle 21, lieferte  $K_D=170$  nM für Bin1 SH3 und  $K_D=11$  nM für Bin1 Tandem-SH3. Die Aktivitäten betragen 43 % für Bin1 SH3 und etwa die Hälfte, 25 %, für Bin1 Tandem-SH3.

Tabelle 21. Auswertung der Gleichgewichtsanalyse von Bin1 (Tandem-)SH3 an NS5A(333-369).

Bin1-Protein	$K_D$ [nM]	$R_{max}$ [δnm]	$\chi^2$ [δnm <sup>2</sup> ]	Aktivität [%]
SH3	170±22	0,204±0,011	3,2e-5	43
Tandem-SH3	95±0,05	0,357±0,003	3,6e-5	25

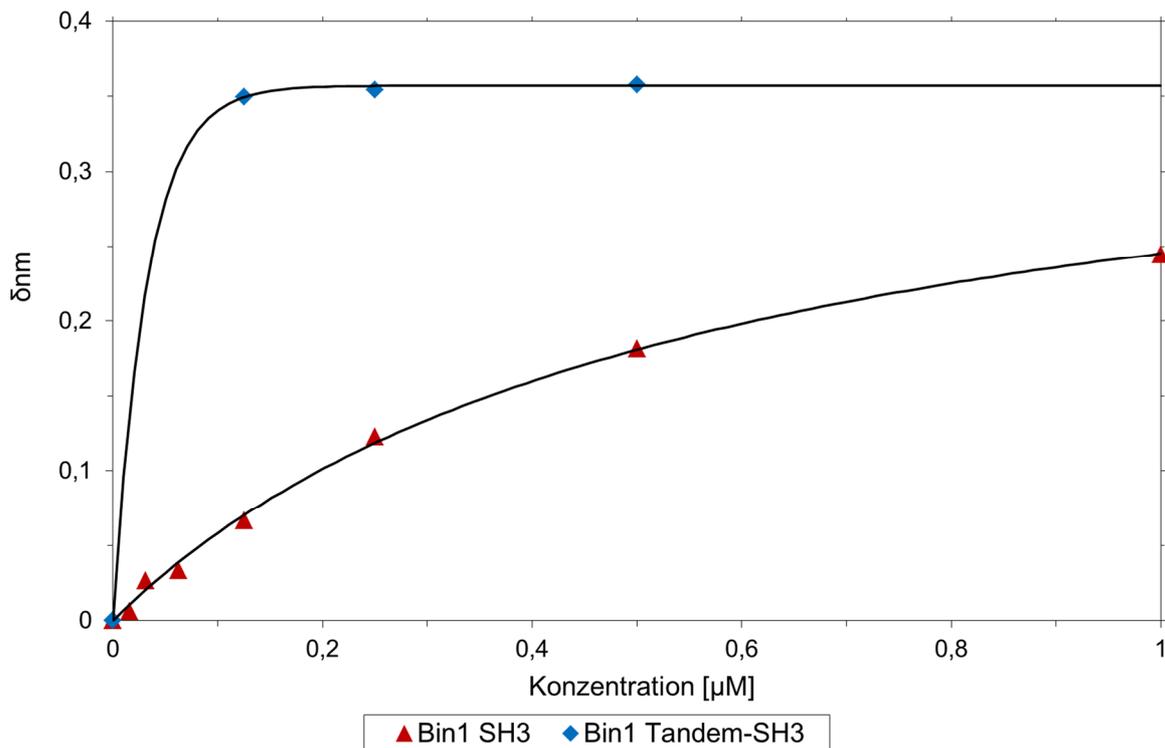


Abbildung 27. Gleichgewichtsanalyse der Bindung von NS5A(333-369) und Bin1 (Tandem-)SH3. Aus den kinetischen Messungen wurden die über 5 s gemittelten Maxima der jeweiligen Konzentration gegen die Analytkonzentration aufgetragen. Experimentelle Daten zu Bin1 SH3 (rote Dreiecke) und Bin1 Tandem-SH3 (blaue Rauten) sind mit ihren jeweiligen Fits (schwarze Linien) dargestellt.

#### 4.2.3. Bindungsstudien mit ITC

Mit isothermer Titrationskalorimetrie wurden die Bindeeigenschaften von His-Ubiquitin-NS5A(333-369), NS5A(341-361) und NS5A(347-361) und beiden Bin1-Proteinen studiert. Dazu wurde das MicroCal iTC 200 (GE Healthcare, München, Deutschland) verwendet. Nach dem Gerätetest mit Wasser-in-Wasser-Titration und den Referenzmessungen von Ligand-in-Puffer wurden die Bindungsstudien an Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3 durchgeführt, s. Kapitel 3.8.1. Zur Auswertung wurden die Referenzsensorgramme von den Rohdaten, s. Kapitel 7.2.1, subtrahiert und integriert, s. Kapitel 3.8.2. Die Messung von Bin1 SH3 mit NS5A(347-361) bei  $T=25\text{ °C}$  wurde bereits veröffentlicht (Aladag *et al.* 2014). Die Auswertungen zwischen Publikation und Dissertation unterschieden sich, da sich das molare Verhältnis durch den Einsatz von Bin1 SH3 bzw. Bin1 Tandem-SH3 als zutitrierte Spezies und nicht als vorgelegte Spezies aufgrund der Definition des Liganden umkehrte. Zusätzlich wurde die Konzentrationsabweichung des NS5A bei der Veröffentlichung nicht mit einbezogen. Die korrigierten Konzentrationen beruhen auf einer gemittelten Bestimmung aus Bradford- und BCA-Assays sowie zusätzlich Infrarotspektroskopie. Da NS5A kein Tryptophan enthielt, war eine Bestimmung mit UV-VIS-Spektroskopie nicht möglich und durch eine ungewöhnlich hohe Anzahl an Lysin und Arginin im Vergleich zu BSA war eine Bradford-Proteinbestimmung fehlerhaft. Darum bot das erst im Verlauf der Dissertation erworbene Gerät zur Infrarotspektroskopie eine exaktere Konzentrationsbestimmung der NS5A-Konstrukte.

## 4.2.3.1. NS5A(347-361)

Die Messung der NS5A(347-361)-Zugabe zu Bin1 Tandem-SH3 bei  $T=25\text{ °C}$  wurde zusammen mit Bin1 SH3 (Aladag *et al.* 2014) in Abbildung 28 dargestellt. Aufgrund der negativen Heizleistung zwischen Mess- und Referenzzelle handelte es sich um exotherme Reaktionen, bedingt durch eine Umverteilung nicht-kovalenter Bindungen vom freien zum gebundenen Zustand. Die Messungen von Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3 an NS5A(347-361) bei  $T=25, 30$  und  $37\text{ °C}$ , sind in Abbildung 29 zusammengefasst. Die Überlagerung zeigte, dass bei zunehmender Temperatur die Bindungsenthalpie  $\Delta H$  stieg und die Steigung größer wurde. Aufgrund der inversen Beziehung der Steigung zur Dissoziationskonstante, stieg generell die Dissoziationskonstante mit zunehmender Temperatur. Die Auswertung der Bindekurven erfolgte mit dem auf Origin basierenden Programm des ITC-Gerätes.

Tabelle 22. Auswertung der ITC-Bindekurven von NS5A(347-361) mit Bin1 (Tandem-)SH3. Die Messung von Bin1 SH3 und NS5A(347-361) bei  $T=25\text{ °C}$  wurde entnommen aus (Aladag *et al.* 2014).

Bin1-Protein	Temperatur [°C]	N	K [M <sup>-1</sup> ]	$\Delta H$ [cal/mol]	$\Delta S$ [cal/mol/deg]	K <sub>D</sub> [nM]
SH3 <sup>1</sup>	25	2,00 ±0,01	6,05e6 ±11,7e5	-4,68e3 ±4,26e1	15,3	165 ±32
SH3	30	2,07 ±0,01	5,17e6 ±6,01e5	-5,27e3 ±2,74e1	13,3	193 ±22
SH3	37	2,00 ±0,01	2,10e6 ±2,80e5	-6,96e3 ±5,97e1	6,5	476 ±63
Tandem-SH3	25	0,999 ±0,004	12,9e6 ±20,7e5	-10,4e3 ±7,41e1	2,38	78 ±12
Tandem-SH3	30	1,000 ±0,004	13,5e6 ±15,7e5	-11,4e3 ±1,57e1	-5,01	74 ±9
Tandem-SH3	37	0,997 ±0,002	6,57e6 ±5,21e5	-15,1e3 ±6,65e1	-17,4	152 ±12

Bei  $T=25\text{ °C}$  wurde zwischen NS5A(347-361) und Bin1 SH3 eine Dissoziationskonstante von  $K_D=165\pm 32\text{ nM}$  (Aladag *et al.* 2014) gemessen, bei  $T=30\text{ °C}$   $K_D=193\pm 22\text{ nM}$  und bei  $T=37\text{ °C}$   $K_D=476\pm 63\text{ nM}$  und für Bin1 Tandem-SH3 bei  $T=25\text{ °C}$   $K_D=78\pm 12\text{ nM}$ , bei  $T=30\text{ °C}$   $K_D=74\pm 9\text{ nM}$  und bei  $T=37\text{ °C}$   $K_D=152\pm 12\text{ nM}$ , s. Tabelle 22. Die Enthalpie bzw. Entropie bei steigender Temperatur änderte sich bei Bin1 SH3 von  $\Delta H=-4,68\text{e}3\text{ cal/mol}$ ,  $\Delta H=-5,27\text{e}3\text{ cal/mol}$  zu  $\Delta H=-6,96\text{e}3\text{ cal/mol}$  bzw.  $\Delta S=15,3\text{ cal/mol/deg}$ ,  $\Delta S=13,3\text{ cal/mol/deg}$  zu  $\Delta S=6,5\text{ cal/mol/deg}$  und bei Bin1 Tandem-SH3 von  $\Delta H=-1,04\text{e}4\text{ cal/mol}$ ,  $\Delta H=-1,14\text{e}4\text{ cal/mol}$  zu  $\Delta H=-1,51\text{e}4\text{ cal/mol}$  bzw.  $\Delta S=2,38\text{ cal/mol/deg}$ ,  $\Delta S=-5,01\text{ cal/mol/deg}$  zu  $\Delta S=-17,4\text{ cal/mol/deg}$ . Somit ergaben sich lineare Zusammenhänge zwischen Temperaturerhöhung und Änderungen der Dissoziationskonstante, Enthalpie und Entropie. Die ermittelten Stöchiometrien betragen für NS5A(347-361) mit Bin1 SH3  $N=2$  und mit Bin1 Tandem-SH3  $N=1$ . Das hieß, dass stets zwei Bin1 SH3-Moleküle an ein Molekül NS5A(347-361) banden und ein Bin1 Tandem-SH3-Molekül ein Molekül NS5A(347-361) band.

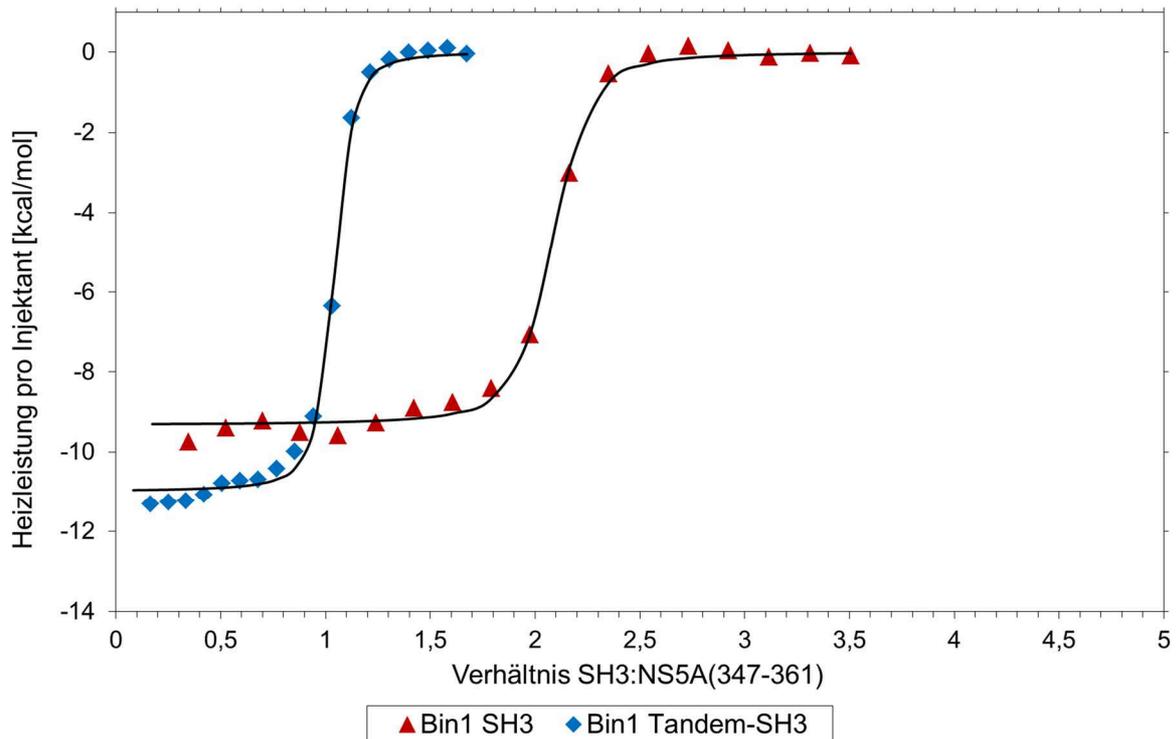


Abbildung 28. ITC-Bindekurven von NS5A(347-361) mit Bin1 (Tandem-)SH3 bei 25 °C. Die Messung von Bin1 Tandem-SH3 wurde in blauen Rauten mit schwarzem Fit und Bin1 SH3 (Aladag *et al.* 2014) in roten Dreiecken mit schwarzem Fit dargestellt.

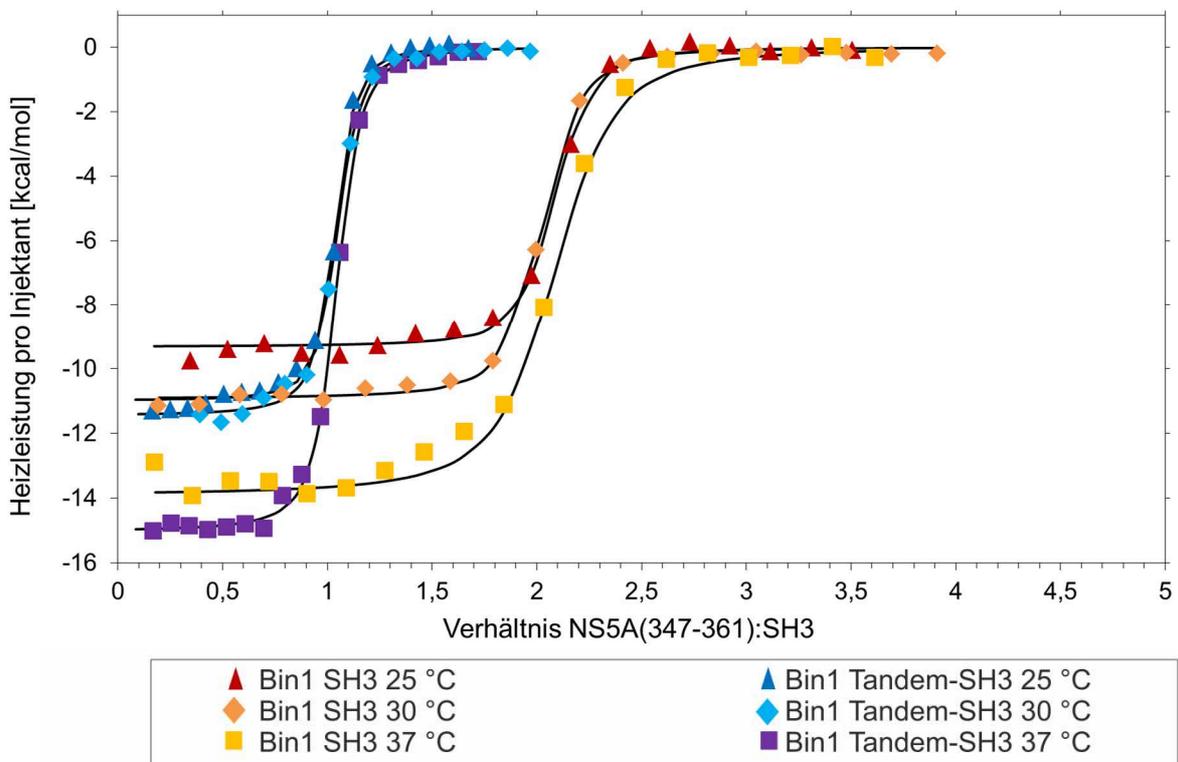


Abbildung 29. ITC-Bindekurven von NS5A(347-361) mit Bin1 (Tandem-)SH3. Die experimentellen Daten wurden als einzelne Messpunkte aufgetragen und die dazugehörigen Fits als schwarze Linien. Die Messungen von Bin1 SH3 waren bei 25 °C (rote Dreiecke) (Aladag *et al.* 2014), 30 °C (orangefarbene Rauten) und 37 °C (gelbe Quadrate) und die von Bin1 Tandem-SH3 bei 25 °C (dunkelblaue Dreiecke), 30 °C (blaue Rauten) und 37 °C (violette Quadrate).

## 4.2.3.2. NS5A(341-361)

Die referenzierten und prozessierten ITC-Rohdaten aus Kapitel 7.2.1 für NS5A(341-361) mit Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3 wurden für  $T=25\text{ °C}$  in Abbildung 30 und für  $T=37\text{ °C}$  in Abbildung 31 gezeigten Bindekurven.

Die Auswertung der experimentellen Daten von NS5A(341-361) mit Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3 ist in Tabelle 23 gezeigt. Die Stöchiometrien betragen für Bin1 SH3 bei beiden Messungen stets  $N=2$  und für Bin1 Tandem-SH3 stets  $N=1$ , sodass erneut jeweils ein Molekül NS5A(341-361) von zwei Bin1 SH3-Molekülen und ein Molekül Bin1 Tandem-SH3 von einem Molekül NS5A(341-361) gebunden wurden. Dissoziationskonstanten für Bin1 SH3 wurden bei  $T=25\text{ °C}$  mit  $K_D=119\pm 17\text{ nM}$  bzw. bei  $T=37\text{ °C}$  mit  $K_D=282\pm 50\text{ nM}$  und für Bin1 Tandem-SH3 bei  $T=25\text{ °C}$  mit  $K_D=37\pm 5\text{ nM}$  und bei  $T=37\text{ °C}$  mit  $K_D=93\pm 34\text{ nM}$  bestimmt. Die Enthalpie- bzw. Entropieänderungen betragen bei Bin1 SH3  $\Delta H=-3,80\text{e}3\text{ cal/mol}$  bzw.  $\Delta S=19\text{ cal/mol/deg}$  bei  $T=25\text{ °C}$  und  $\Delta H=-4,66\text{e}3\text{ cal/mol}$  bzw.  $\Delta S=14,9\text{ cal/mol/deg}$  bei  $T=37\text{ °C}$ , bei Bin1 Tandem-SH3 wurden sie mit  $\Delta H=-7,32\text{e}3\text{ cal/mol}$  bzw.  $\Delta S=9,46\text{ cal/mol/deg}$  und  $\Delta H=-1,09\text{e}4\text{ cal/mol}$  bzw.  $\Delta S=-2,93\text{ cal/mol/deg}$  bestimmt. Hier konnte ebenfalls eine lineare Abhängigkeit der Dissoziationskonstante, Enthalpie und Entropie bei Temperaturerhöhung detektiert werden.

Tabelle 23. Auswertung der ITC-Bindekurven von NS5A(341-361) mit Bin1 (Tandem-)SH3.

Bin1-Protein	Temperatur [°C]	N	K [M <sup>-1</sup> ]	$\Delta H$ [cal/mol]	$\Delta S$ [cal/mol/deg]	$K_D$ [nM]
SH3	25	2,000 $\pm 0,006$	8,42e6 $\pm 11,9\text{e}5$	-3,80e3 $\pm 2,18\text{e}1$	19	119 $\pm 17$
SH3	37	1,99 $\pm 0,01$	3,55e6 $\pm 6,26\text{e}5$	-4,66e3 $\pm 4,06\text{e}1$	14,9	282 $\pm 50$
Tandem-SH3	25	0,999 $\pm 0,003$	27,1e6 $\pm 41,3\text{e}5$	-7,32e3 $\pm 3,97\text{e}1$	9,46	37 $\pm 5$
Tandem-SH3	37	1,000 $\pm 0,008$	10,7e6 $\pm 39,3\text{e}5$	-10,9e3 $\pm 17,0\text{e}1$	-2,93	93 $\pm 34$

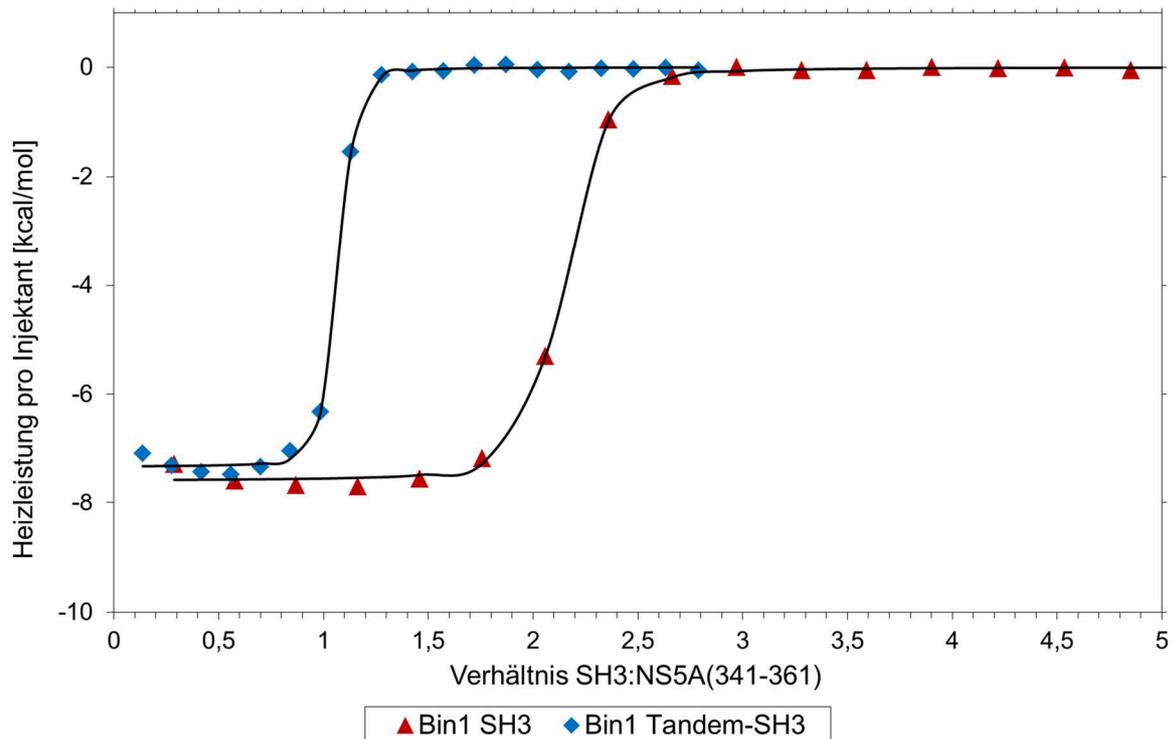


Abbildung 30. ITC-Bindekurven von NS5A(341-361) mit Bin1 (Tandem-)SH3 bei 25 °C. Die experimentellen Daten von Bin1 SH3 wurden als rote Dreiecke und die von Bin1 Tandem-SH3 als blaue Rauten dargestellt. Die jeweiligen Fits wurden als schwarze Linien gezogen.

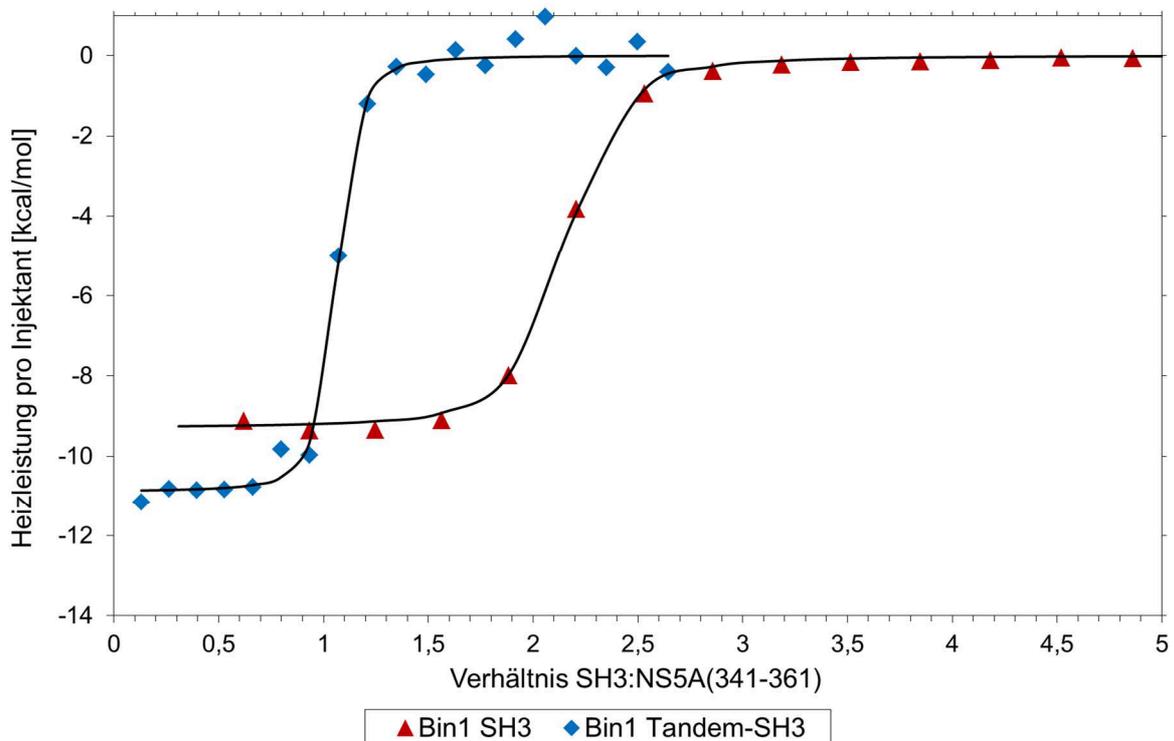


Abbildung 31. ITC-Bindekurven von NS5A(341-361) mit Bin1 (Tandem-)SH3 bei 37 °C. Die experimentellen Daten von Bin1 SH3 wurden als rote Dreiecke und die von Bin1 Tandem-SH3 als blaue Rauten dargestellt. Die jeweiligen Fits wurden als schwarze Linien gezogen.

## 4.2.3.3. NS5A(333-369)

ITC-Messungen wurden auch mit dem Konstrukt His-Ubiquitin-NS5A(333-369) mit Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3 durchgeführt. Die Rohdaten aus Kapitel 7.2.1 wurden referenziert und integriert und sind in Abbildung 32 als Bindekurven dargestellt.

In der Auswertung wurden die Stöchiometrien von 1:2 NS5A(333-369):Bin1 SH3 und 1:1 NS5A(333-369):Bin1 Tandem-SH3 zusammen mit den Dissoziationskonstanten von  $K_D=126\pm 16$  nM für Bin1 SH3 und  $K_D=63\pm 8$  nM für Bin1 Tandem-SH3 erhalten, s. Tabelle 24. Die Enthalpie- bzw. Entropieänderungen betragen für Bin1 SH3 bei  $T=25$  °C  $\Delta H=-4,41e3$  cal/mol bzw.  $\Delta S=16,8$  cal/mol/deg und für Bin1 Tandem-SH3  $\Delta H=-9,22e3$  cal/mol bzw.  $\Delta S=2,03$  cal/mol/deg.

Tabelle 24. Auswertung der ITC-Bindekurven von His-Ubiquitin-NS5A(333-369) mit Bin1 (Tandem-)SH3.

Bin1-Protein	Temperatur [°C]	N	K [M <sup>-1</sup> ]	$\Delta H$ [cal/mol]	$\Delta S$ [cal/mol/deg]	$K_D$ [nM]
SH3	25	2,010 $\pm 0,009$	7,95e6 $\pm 1,04e6$	-4,41e3 $\pm 3,66e1$	16,8	126 $\pm 16$
Tandem-SH3	25	1,070 $\pm 0,005$	16,0e6 $\pm 2,08e6$	-9,22e3 $\pm 7,67e1$	2,03	63 $\pm 8$

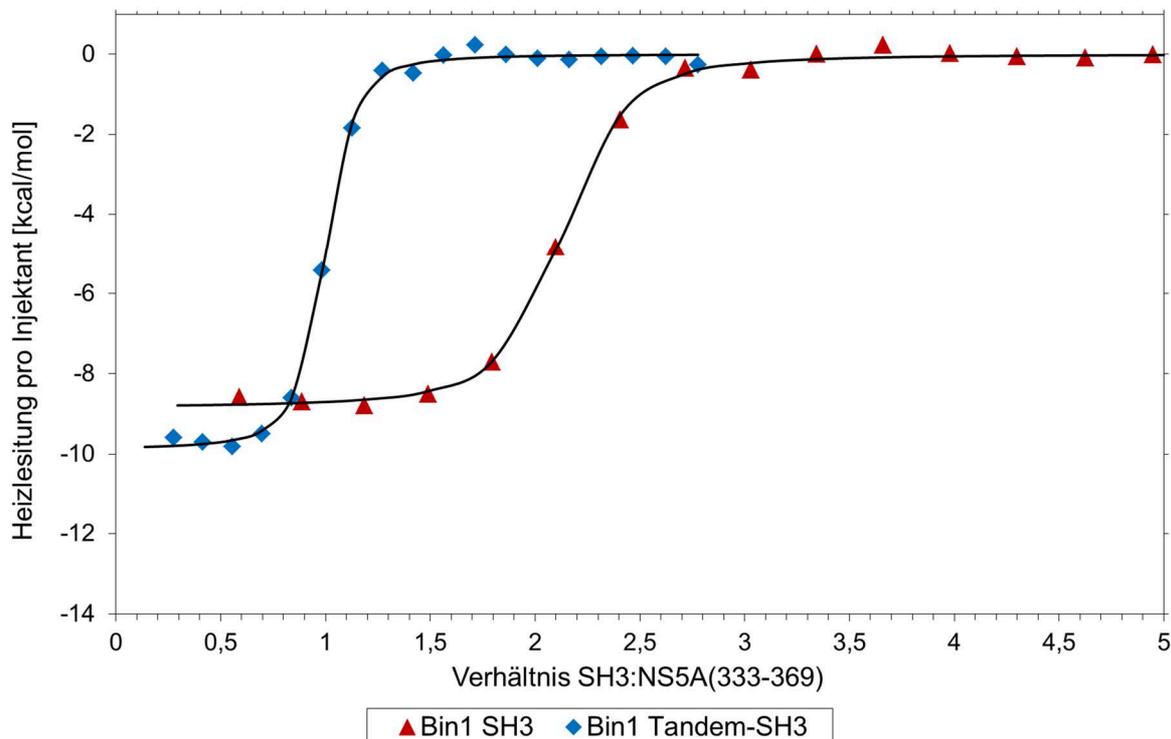


Abbildung 32. ITC-Bindekurven von His-Ubiquitin-NS5A(333-369) mit Bin1 (Tandem-)SH3 bei 25 °C. Die experimentellen Daten von Bin1 SH3 wurden als rote Dreiecke und die von Bin1 Tandem-SH3 als blaue Rauten dargestellt. Die jeweiligen Fits wurden als schwarze Linien gezogen.

#### 4.2.3.4. Auswertung der ITC-Messungen

Eine exotherme Bindereaktion wurde bei allen gemessenen Temperaturen und Konstrukten observiert. Außerdem zeigten alle durchgeführten Experimente mit den unterschiedlichen Proteinen und Liganden eine gute Übereinstimmung anhand eines einfachen Zwei-Zuständemodells, sodass die Bindekurven mit ihren Gleichgewichtsdissoziationskonstanten  $K_D$ , Enthalpien  $\Delta H$  und Entropien  $\Delta S$  bei unterschiedlichen Temperaturen verglichen werden konnten. Wie gut die Asymptoten erreicht wurden, kann mit dem Brandtschen c-Wert  $c=[M_{\text{tot}}]*K$  abgeschätzt werden (Wiseman *et al.* 1989). Für die durchgeführten Messungen wurden optimale c-Werte von 300-700 ermittelt. Die einzelnen Parameter konnten durch Variation der Proteinkonzentration [Daten nicht gezeigt] validiert werden.

Diagramme der Titrations mit NS5A(347-361), s. Abbildung 33, mit  $\Delta H_D$  gegen T und  $\Delta S_D$  gegen  $\ln(T)$  wiesen beide lineare Steigungen von  $\Delta C_p$  auf, während das van't Hoff-Diagramm mit  $\ln(K_D)$  gegen  $T^{-1}$  eine von  $\Delta C_p$ -abhängige Krümmung aufwies. Auch der Eyring-Plot mit  $\ln(K_D/T)$  gegen  $T^{-1}$  ergab die Aktivierungsdissoziationsenthalpie mit einer von  $\Delta C_p$  abhängigen Krümmung. Wird 25 °C als Referenztemperatur gewählt, so wurden  $\Delta H_0=-4,7\pm 0,3$  kcal/mol,  $\Delta S_0=15\pm 1,5$  cal/mol/K und  $\Delta C_p=31,4\pm 0,3$  cal/mol/K für Bin1 SH3 und  $\Delta H_0=-11,0\pm 1,5$  kcal/mol,  $\Delta S_0=-4,7\pm 2,3$  Cal/mol/K und  $\Delta C_p=33,1\pm 0,7$  cal/mol/K für Bin1 Tandem-SH3 bestimmt.

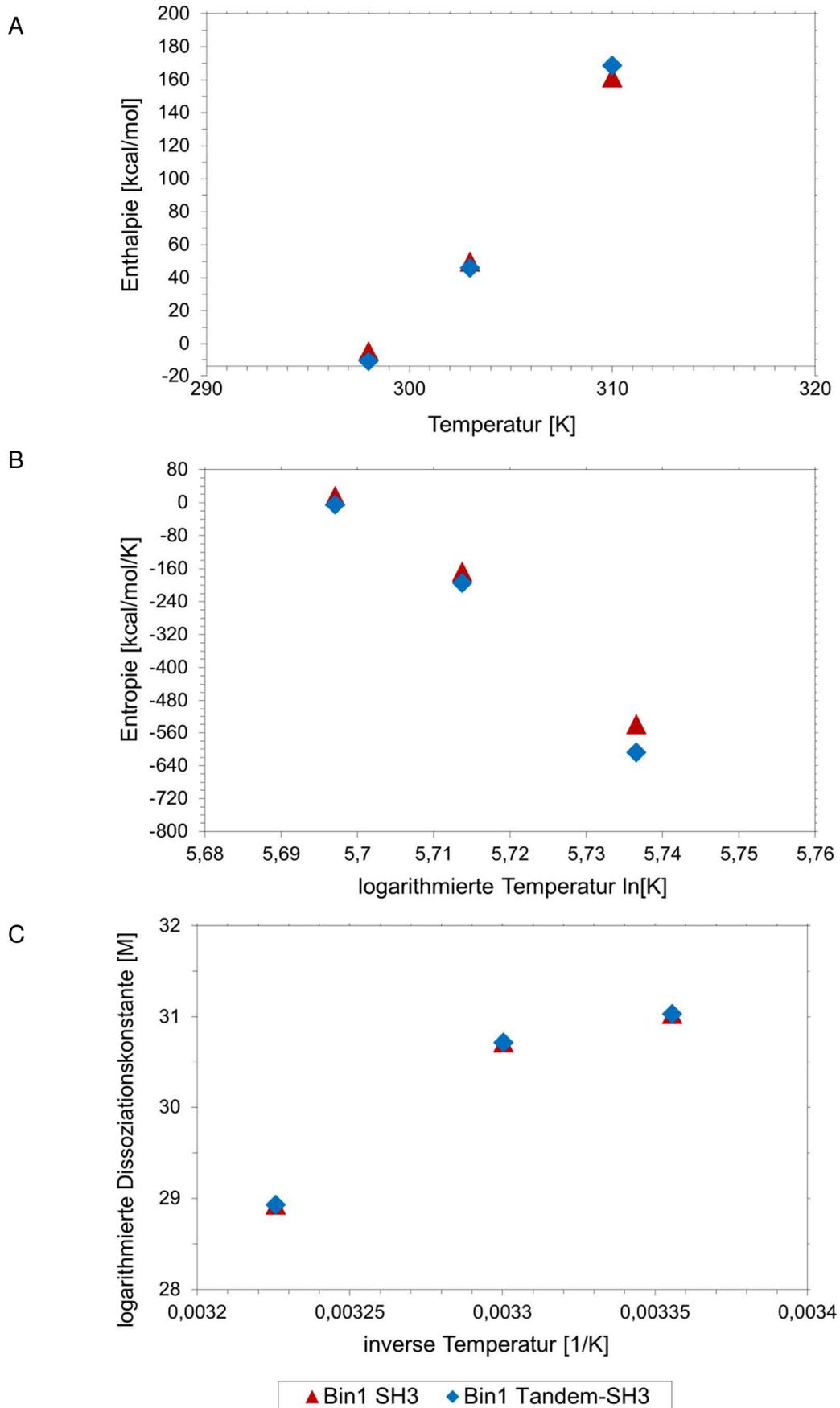


Abbildung 33. Auswertung der ITC-Messungen von Bin1 (Tandem-)SH3 an NS5A(347-361). A. Dissoziationsenthalpien als Funktion der Temperatur. B. Dissoziationsentropien als Funktion von  $\ln(T)$  C. van't Hoff-Diagramm der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten. In den Diagrammen wurde Bin1 SH3 mit roten Dreiecken und Bin1 Tandem-SH3 mit blauen Rauten dargestellt.

#### 4.2.4. Analytische Größenausschlusschromatographie

Zur Abschätzung der hydrodynamischen Radii von Bin1 Tandem-SH3 und des Komplexes Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361) wurde eine analytische Größenausschlusschromatographie nach Kapitel 3.9 durchgeführt. Beide Chromatogramme sind in Abbildung 34 dargestellt. Deutlich unterschieden sich die freie und gebundene Form von Bin1 Tandem-SH3 hinsichtlich ihrer Retentionszeiten, Bin1 Tandem-SH3 eluierte bei  $V=63,5$  ml und der 1:1-Komplex bei  $V=59,3$  ml.

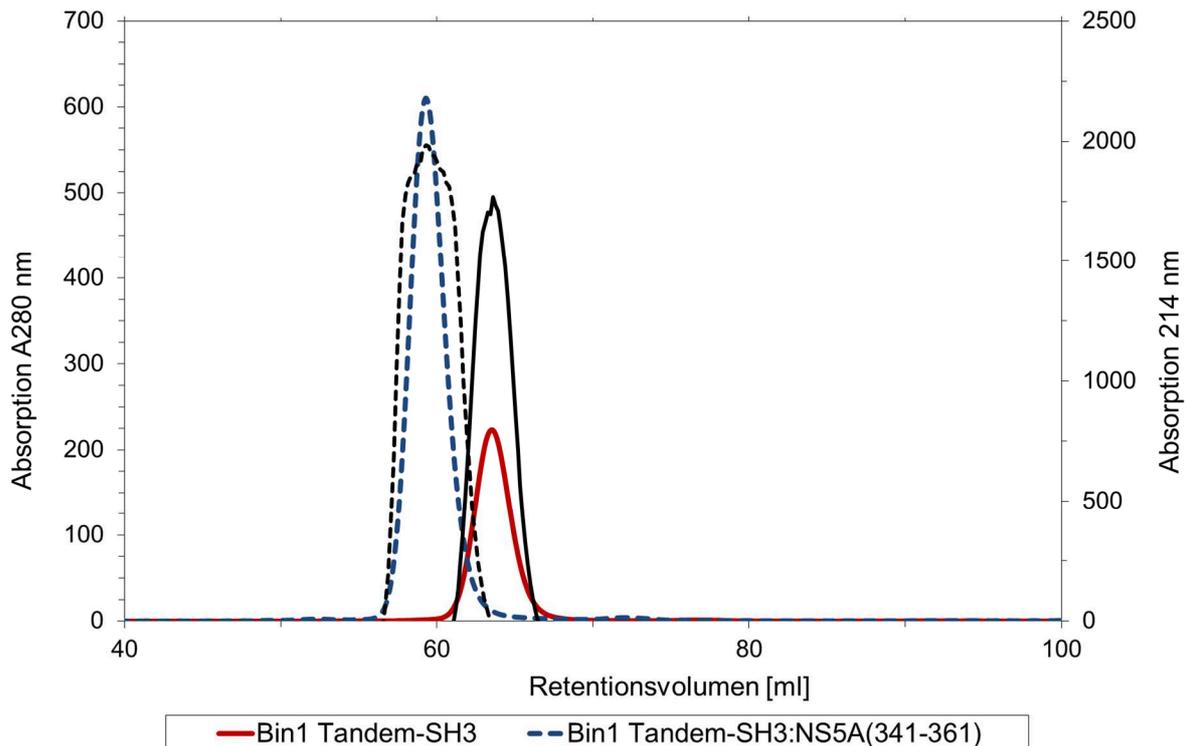


Abbildung 34. Analytische Gelfiltrationschromatogramme von Bin1 Tandem-SH3 und dem Komplex Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361).

Bin1 Tandem-SH3 (rote Linie) eluierte im Maximum bei 63,5 ml Retentionsvolumen und der 1:1-Komplex Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361) (blaue gestrichelte Linie) eluierte im Maximum bei 59,3 ml. Den Absorptionen bei 280 nm in Farbe wurde die Absorption bei 214 nm in schwarz gegenübergestellt.

Generell wird angenommen, dass der hydrodynamische Radius mit der molekularen Masse eines globulären Proteins korreliert. Da die beiden Domänen des Bin1 Tandem-SH3 für sich globulär sind, kann das gesamte Molekül eher als hantelförmig beschrieben werden. Daher gilt in diesem Fall nicht die einfache Korrelation des Radius zur Masse. Die Retentionsvolumina der maximalen Absorption bei  $\lambda=280$  nm jedes verwendeten Kalibrierungsproteins wurden gegen ihr Molekulargewicht in Abbildung 35 aufgetragen. Die erhaltene Kalibrierungsgerade diente zur Bestimmung der hydrodynamischen Radii der Probenproteine. Bin1 Tandem-SH3 hat eine theoretische molekulare Masse von  $M=19,9$  kDa und zeigte auf der Superdex 75 eine Masse von  $M=20,1$  kDa. Somit entspricht die experimentelle Masse nahezu der theoretischen. Im Gegensatz dazu wurde der 1:1-Komplex Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361) mit einer theoretischen Masse von  $M=22,4$  kDa injiziert.

Die experimentell ermittelte Masse dieses Komplexes entsprach  $M=25,4$  kDa und hatte damit einen größeren hydrodynamischen Radius als in der Theorie. Diese Masse entspräche einem 1:2-Komplex. Folglich konnte aus der analytischen Größenausschlusschromatographie nur ein nicht linearer Massenzuwachs erhalten werden.

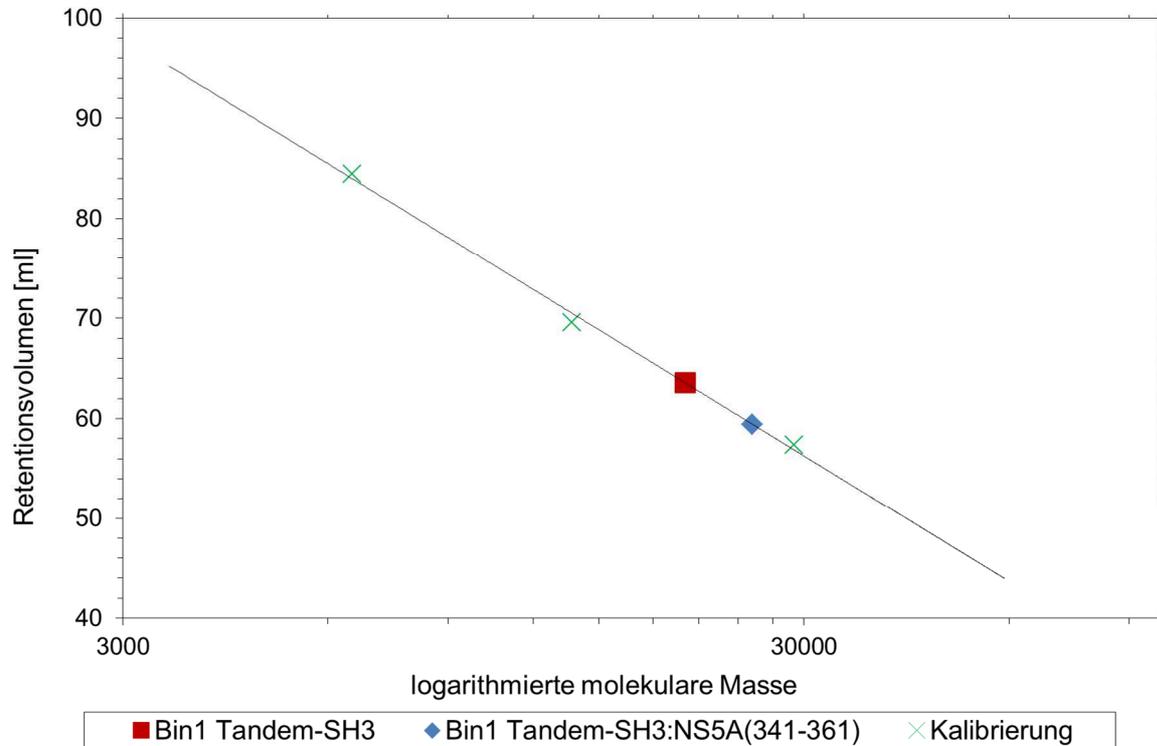


Abbildung 35. Auswertung der analytischen Gelfiltration.

Die drei Kalibrierungsproteine Ribonuklease A, Carboanhydrase und Aprotinin wurden als grüne Kreuze und die daraus gezogene Kalibrierungsgerade in schwarz dargestellt. Bin1 Tandem-SH3 wurde als rotes Quadrat und der Komplex Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361) als blaue Raute gezeigt. Bin1 Tandem-SH3 eluierte bei einer Retentionszeit, die einer molekularen Masse von  $M=20,1$  kDa entsprach und der Komplex bei  $M=25,4$  kDa.

### 4.3. Röntgenstrukturanalyse

Die Struktur des Komplexes Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361) sollte parallel zur NMR mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden. Dazu wurden zunächst faktorielle Kristallisationsbedingungen mit 20 mg/ml bis 120 mg/ml Protein:Peptid-Komplex getestet, s. Kapitel 3.10.1. Unter diesen faktoriellen Kristallisationsbedingungen wurde mit 0,1 M MES pH 6,5; 0,2 M Ammoniumsulfat und 30 % PEG 5000MME bei 60 mg/ml Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361) im 1:1-Komplex eine Bedingung gefunden, bei der sich Kristalle bildeten, s. Abbildung 36A. Diese Kristallisationsbedingung wurde unter Vergrößerung der eingesetzten Volumina mit unterschiedlichen Protein-, Ammoniumsulfat- und PEG 2000MME-Konzentrationen im „hanging drop“-Verfahren weiter getestet. Bei 60 mg/ml Bin1 Tandem-SH3 mit 0,1 M MES pH 6,5; 0,2 M Ammoniumsulfat und 30 % PEG 2000MME wurde die optimale Bedingung für Kristalle mit hexagonaler Symmetrie bestätigt. Diese Bedingungen wurden auch für den Protein:Peptid-Komplex wiederholt und erneut unter Bildung für Kristalle hexagonaler Symmetrie bestätigt, s. Abbildung 36B. Die Ansätze mit und ohne Ligand unterschieden sich hinsichtlich ihrer Ausbildung einer öligen Phase und der Kyrofähigkeit.

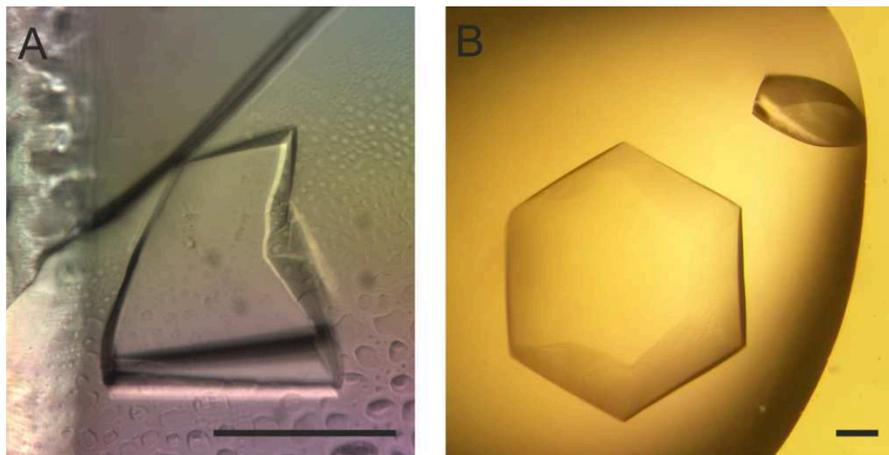


Abbildung 36. Fotografien der Kristalle von Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361). A zeigt den Kristall aus der faktoriellen Kristallisationsbedingung, die unter B verfeinert wurde. Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361) kristallisiert mit hexagonaler Symmetrie. Der schwarze Balken rechts unten symbolisiert 50 µm.

Sowohl Kristalle mit Bin1 Tandem-SH3 als auch dem 1:1-Komplex Tandem-SH3:NS5A(341-361) wurden unter den in Kapitel 3.10.2 beschriebenen Bedingungen gemessen und die Daten ausgewertet, s. Tabelle 25. Dabei diffraktierten beide Kristalle bis zu einer Auflösung von 2,1 Å bzw. 2,2 Å für ohne bzw. mit Ligand. Die beiden Kristalle in den Ansätzen mit und ohne Ligand haben die gleiche Raumgruppe  $P3_121$  mit sehr ähnlichen Elementarzellen. Mit molekularem Ersatz konnten die Phasen beider Datensätze bestimmt werden, da Bin1 SH3 bereits als Kristallstruktur in der Proteindatenbank mit der Nummer 1bb9 bekannt ist. Durch die Verfeinerung wurden R-Werte für den Kristall ohne Ligand von  $R_{\text{Arbeit}}=21,4\%$  und  $R_{\text{frei}}=27,3\%$  und für den Kristall mit Ligand von  $R_{\text{Arbeit}}=23,4\%$  und  $R_{\text{frei}}=25,4\%$  erreicht.

Tabelle 25. Röntgenkristallographische Diffraktionsdaten von Bin1 Tandem-SH3 mit und ohne Ligand NS5A(341-361).

Die Statistiken der äußeren Schale mit der höchsten Auflösung sind in Klammern angegeben.

Kristall	Bin1 Tandem-SH3	Bin1 Tandem-SH3 :NS5A(341-361)
<b>Röntgendaten</b>		
Detektor	Mar Image Plate	
Wellenlänge [Å]/Monochromator	$\lambda=1,5418$ / Graphitmonochromator	
Auflösung [Å]	18,8–2,1 (2,16 – 2,1)	28,3–2,2 (2,27 – 2,2)
Raumgruppe	P 3 <sub>1</sub> 21	P 3 <sub>1</sub> 21
Gitterkonstanten a=b, c [Å]	72,24; 31,18	72,37; 31,71
Gitterkonstanten $\alpha=\beta, \gamma$ [°]	90; 120	90; 120
Anzahl der gemessenen Reflexe	30588 (2456)	23956 (2100)
Anzahl der reduzierten Reflexe	5674 (458)	3888 (354)
Multiplizität	5,4 (5,4)	6,2 (5,9)
Vollständigkeit der Daten [%]	99,9 (100,0)	77,2 (80,8)
I/ $\sigma$ (I)	28,5 (7,8)	7,3 (1,6)
Temperaturfaktor aus Wilson Diagram [Å <sup>2</sup> ]	33,7	38,7
R <sub>gemittelt</sub>	0,046 (0,205)	0,19 (1,518)
R <sub>gemessen</sub>	0,051 (0,228)	0,206 (1,648)
<b>Verfeinerung</b>		
Auflösung [Å]	18,4 – 2,1 (2,2 – 2,1)	28,3 – 2,2 (2,3 – 2,2)
R <sub>Arbeit</sub>	0,214 (0,303)	0,234 (0,446)
R <sub>frei</sub>	0,273 (0,344)	0,254 (0,365)
Koordinatenfehler (max.-likelihood basiert)	0,36	0,18
Anzahl der Nicht-Wasserstoff-Atome	694	687
Proteinatome	654	668
Wassermoleküle	40	19
rms (Bindung)	0,05	0,011
rms (Winkel)	5,62	1,21
Ramachandran [%]	97	96
Ramachandran Ausreißer [%]	1,3	1,2
Sterische Überlappung	15,92	6,96
Gemittelter B-Faktor [Å <sup>2</sup> ]	35,4	45,3
Proteinatome [Å <sup>2</sup> ]	35,2	45,3
Wassermoleküle [Å <sup>2</sup> ]	38,8	46,1

In der Auswertung stellte sich heraus, dass Elementarzellen beider Ansätze lediglich eine SH3-Domäne enthielten und nicht das vollständige Bin1 Tandem-SH3. Diese eine Domäne wurde der C-Terminalen im Bin1 Tandem-SH3 zugewiesen. Da in den beiden Kristallstrukturen nur eine SH3-Domäne in die Elementarzelle gelegt wurde, widerspricht dies den eingesetzten Proteinen, sodass sowohl die Kristallisationslösung als auch die gemessenen Kristalle mittels SDS-PAGE analysiert wurden. Die Kristallisationslösung enthielt als Hauptbestandteil Bin1 Tandem-SH3 und einen geringen Anteil Bin1 SH3. Der geringe Anteil an Bin1 SH3 im Ansatz könnte bedingt sein durch drei putative Trypsinschnittstellen im Linker, die über den Kristallisationszeitraum hydrolysiert wurden. Alle gemessenen Kristalle, auch solche, die kein Einkristall waren und nicht Teil dieser Arbeit wurden, sowohl mit als auch ohne Ligand, bestanden aus Bin1 Tandem-SH3 mit einer molekularen Masse von M=20 kDa. Beispielhaft wird der diffraktierende Kristall im Ansatz mit NS5A(341-361) in Abbildung 37 gezeigt.

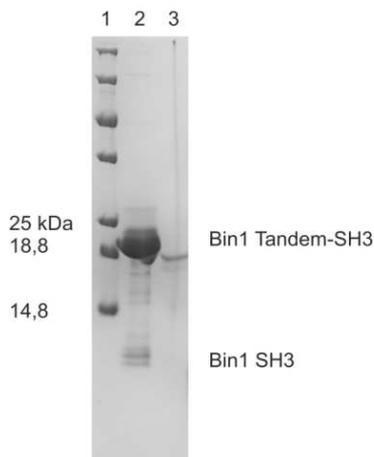


Abbildung 37. SDS-Gel von Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361) im 1:1-Komplex zur Röntgenstrukturanalyse.

Die verwendete Kristallisationslösung wurde in Spalte 2 und der gemessene Kristall in Spalte 3 aufgetragen. In beiden wurde hauptsächlich Bin1 Tandem-SH3 bei etwa 20 kDa nachgewiesen.

Würde ein Bin1 Tandem-SH3 mit  $M=19926$  Da in einer Elementarzelle vorkommen, so ergäbe dies nach der Matthews-Formel  $V_M=8.17 \text{ \AA}^3/\text{Da}$  und einem Lösungsmittelanteil von 0,9 %. Diese Werte sind außerhalb des erlaubten Bereichs für Proteinkristalle. Würde lediglich eine Hälfte des Proteins, eine SH3-Domäne mit  $M=9277$  Da, vorliegen, ergäbe dies  $V_M=2,32 \text{ \AA}^3/\text{Da}$  und einem Lösungsmittelanteil von 47 % für beide Messungen. Damit entspricht der Anteil an Lösungsmittel dem durchschnittlichen Lösungsmittelanteil von Kristallen. Elektronendichte, die für den Linker zwischen den SH3-Domänen steht, wurde nicht in den Elektronendichtekarten gefunden, auch nicht als überschüssige Differenzdichte, die für eine Fehlinterpretation der Daten stünde. Die direkten Abstände zwischen den C-Termini und N-Termini der Domänen wurden gemessen und ergaben mit nur einer SH3-Domäne pro asymmetrische Einheit u. a. 12 Å, 20 Å, 30 Å, 50 Å. Bei der Länge des Linkers von neun Aminosäureresten bei ausgestreckter Konformation könnte theoretisch ein Abstand von  $d=3,3 \text{ \AA} \cdot \text{Aminosäureanzahl}=30 \text{ \AA}$  überbrückt werden. Bei Reduktion der Symmetrie von  $P3_121$  zu  $P3_1$  konnte der direkte Abstand zwischen C- und N-Terminus mit 48 Å angegeben werden und bestätigen, dass die beiden Domänen so nicht mit dem Linker verbunden werden konnten. Erst bei einer weiteren Reduktion der Symmetrie der Raumgruppe zu  $P1$  konnten Abstände erkannt werden, die mit diesem Linker verbunden werden konnten. Die Diskrepanz zwischen eingesetztem Bin1 Tandem-SH3 und den gemessenen Einzel-SH3s im Kristall könnte durch eine asymmetrische Verteilung des Bin1 Tandem-SH3 erklärt werden.

Die SH3-Domänen, s. Abbildung 38, beider Ansätze bestanden aus 70 Aminosäuren und bildeten fünf  $\beta$ -Stränge im  $\beta$ -„barrel“ aus, die in zwei  $\beta$ -Faltblättern mit rechten Winkeln angeordnet waren. Das erste  $\beta$ -Faltblatt bestand aus den  $\beta$ -Strängen 1, 5 und der ersten Hälfte von 2, das zweite aus 3, 4 und der zweiten Hälfte von 2. Ein  $\beta$ -„bulge“ in  $\beta$ -Strang 2 erlaubte die Teilnahme dieses Stranges an beiden  $\beta$ -Faltblättern.  $\beta$ -Stränge 1 und 2 wurden durch die RT-Schleife mit antiparalleler Anordnung unterbrochen. Die kürzeren N-Src- und distalen Schleifen waren zwischen den  $\beta$ -Strängen 2 und 3 bzw. 3 und 4 lokalisiert. Die weiteren Sekundärstrukturelemente nach dem Kabsch-Sander-Algorithmus, KSDSSP, (Kabsch *et al.* 1983) ergaben eine  $3_{10}$ -Helix in der N-Src-Schleife, eine  $\alpha$ -Helix und eine  $3_{10}$ -Helix in der distalen Schleife und eine weitere  $3_{10}$ -Helix zwischen den  $\beta$ -Strängen 4 und 5.

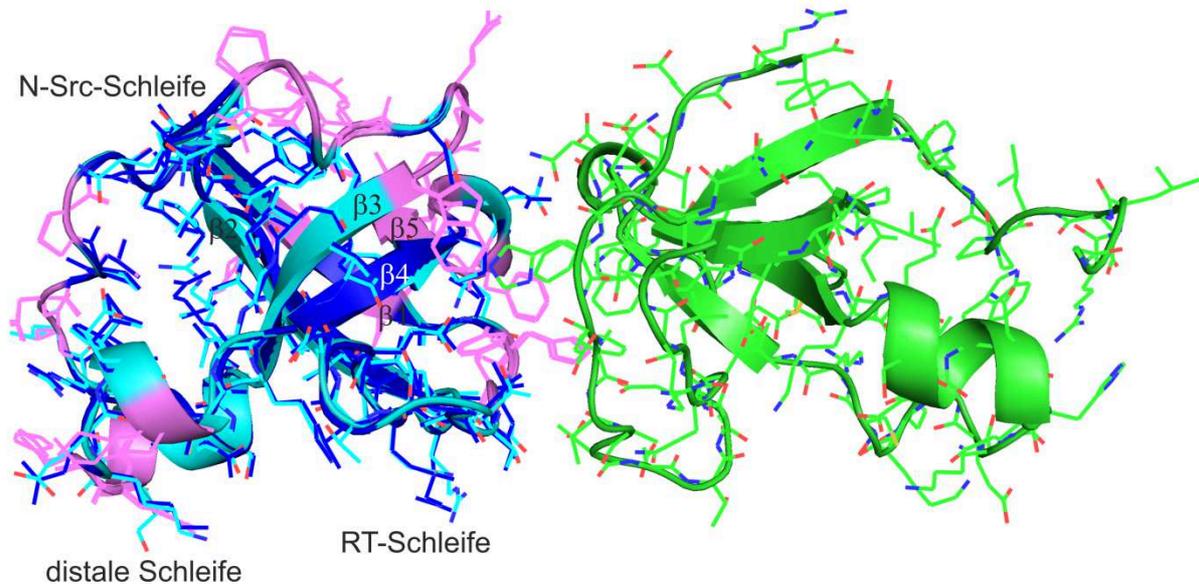


Abbildung 38. Position der SH3-Domäne im Kristall.

Eine Überlagerung der beiden SH3-Domänen aus den Kristallen mit (türkis) und ohne (blau) Zugabe von Ligand NS5A(341-361). Seitenketten, die Kristallkontakte zu weiteren SH3-Domänen ausbilden sind violett hervorgehoben. Die putative Bindestelle von NS5A(341-361) an die SH3-Domäne ist kristallisationsbedingt von einer rotationssymmetrischen SH3-Domäne belegt.

Der Ligand mit einer molekulare Masse von  $M=2,3$  kDa, der in einem der beiden Ansätze in einem Verhältnis von 1:1 Protein:Ligand zugegeben worden war, könnte entweder zu einer Änderung der Raumgruppe, zu einer Aufweitung der Gitterkonstanten führen oder einen Platz in einem Lösungsmittelkanal einnehmen. Es konnten allerdings keine Unterschiede zwischen den beiden Ansätzen anhand der Raumgruppe mit den gleichen Gitterkonstanten zwischen apo- und holo-Form von Bin1 Tandem-SH3 festgestellt werden. Ein Nachweis des Liganden mittels SDS-PAGE war aufgrund der Masse und der Färbereigenschaften nicht möglich. Bei Betrachtung der Strukturen fiel jedoch auf, dass die putative Bindestelle des Liganden zwischen der RT- und N-Src-Schleife in unmittelbarer Nähe einer weiteren, symmetrieäquivalenten SH3-Domäne lag, daher konnten beide Bindestellen nicht von NS5A besetzt werden. Ein Lösungsmittelkanal befand sich auf der Seite der RT- und distalen Schleife, die nicht von NS5A gebunden werden können. Es wurde keine positive Elektronendichte gefunden, die für eine Fehlinterpretation der Daten steht. Bei einer Überlagerung der SH3-Domänen aus apo- und holo-Ansätzen wurde ein geringer RMSD der  $C^\alpha$ -Atome von  $0,188 \text{ \AA}$  bestimmt. Kristallkontakte zwischen benachbarten SH3-Domänen bestanden an den (violett hervorgehobenen) Seitenketten u. a. an der zweizähligen Rotationsachse zwischen den äquivalenten Aminosäureresten H574, Q573 und K581. Hydrophobe Kontakte wurden zwischen L563-L515 und  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen W562-F588' und -H529' sowie Y531-H529' ausgebildet. Weitere Kristallkontakte wurden zwischen Q526-N572', E556-K524', L515-T589', P555-T589', E538-H529' und N572-V592' detektiert, dabei steht die erste Aminosäure für die Domäne in der asymmetrischen Einheit und die mit Hochkomma markierte für die symmetrieäquivalente (grün).

## 4.4. Charakterisierung durch NMR-Titrations

Zur Analyse der NMR-Titrations wurden die Spektren in CcpNmr analysis eingeladen, referenziert und anhand der Änderung der chemischen Verschiebung wurde die CSP berechnet. Insgesamt wurden vier NMR-Titrations durchgeführt, dazu zählen Titrations von Bin1 Tandem-SH3 mit NS5A(341-361), NS5A(191-340) und NS5A(191-447) sowie die Titration von Bin1 SH3 mit NS5A(341-361).

### 4.4.1. NMR-Titration von Bin1 (Tandem-)SH3 und NS5A(341-361)

Die Titration von [ $U$ - $^{15}\text{N}$ ]-Bin1 Tandem-SH3 und NS5A(341-361) ist in Abbildung 39 zu sehen. Bin1 Tandem-SH3 wurde mit  $c=200\ \mu\text{M}$  vorgelegt und zunächst kleinschrittig in Konzentrationsverhältnisänderungen von 0,25 NS5A(341-361) hinzupipettiert. Zum Ende der Titration wurden die Schritte bis [NS5A(341-361)]: [Bin1 Tandem-SH3] 6,1 vergrößert. Die an der Interaktion beteiligten Amidresonanzsignale des Bin1 Tandem-SH3 verringerten ihre Signalintensität vom Ausgangszustand zum Endzustand, während die Intensität eines Signals bei einer anderen chemischen Verschiebung zunahm. Die Präsenz zweier distinkter Signale deutete auf einen langsamen Austausch  $k$  zwischen freier  $\delta_a$  und gebundener  $\delta_b$  Form des Bin1 Tandem-SH3 in der NMR-Zeitskala hin. Mit  $k \ll \delta_a - \delta_b$  entsprach dies einer hohen Affinität. Obwohl es sich hierbei um das Bin1 Tandem-SH3 handelte, dessen Amidresonanzsignale sich aus den N-terminalen und C-terminalen Amidgruppen zusammensetzten, wurde lediglich ein Signalsatz beobachtet. Das ließ den Schluss zu, dass beide Domänen gleichzeitig den Ligand binden. In der Vergrößerung wurden solche Aminosäuren mit Sequenznummern versehen, die einen Austausch zeigten. Prägnante Änderungen der chemischen Verschiebung wurden u. a. für die Aminosäurereste T536, D587, V583 und F584 beobachtet, deren freien Signale teilweise schon ab einem Verhältnis von 0,5 NS5A:Bin1 Tandem-SH3 (orangene Signale) nicht mehr zu beobachten waren.

Die Titration wurde für [ $U$ - $^{15}\text{N}$ ]-Bin1 SH3 und NS5A(341-361) wiederholt, s. Abbildung 40. Dieselben Konzentrationen wurden eingesetzt und damit dieselben Konzentrationsverhältnisse wie bei der Titration mit Bin1 Tandem-SH3 erhalten. Aus den 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektren war zu entnehmen, dass es sich erneut um langsamen Austausch zwischen freiem und gebundenem Bin1 SH3 und somit auch um eine affine Bindung handelte. Die Vergrößerung derselben spektralen Region wie bei Bin1 Tandem-SH3 zeigte, dass dieselben Aminosäurereste an der Interaktion mit NS5A(341-361) beteiligt waren. Daher besteht kein Unterschied zwischen beiden Domänen anhand der an der Interaktion beteiligten Aminosäurereste. Für dieselben Aminosäurereste, wie zuvor für Bin1 Tandem-SH3 beschrieben, wurden Resonanzsignale des freien Zustands bei zum Verhältnis von 0,75-1 NS5A:Bin1 SH3 (gelbe-grüne Signale) observiert. Damit wurde von Bin1 SH3 etwa doppelt so viel NS5A benötigt, um eine Sättigung zu erreichen.

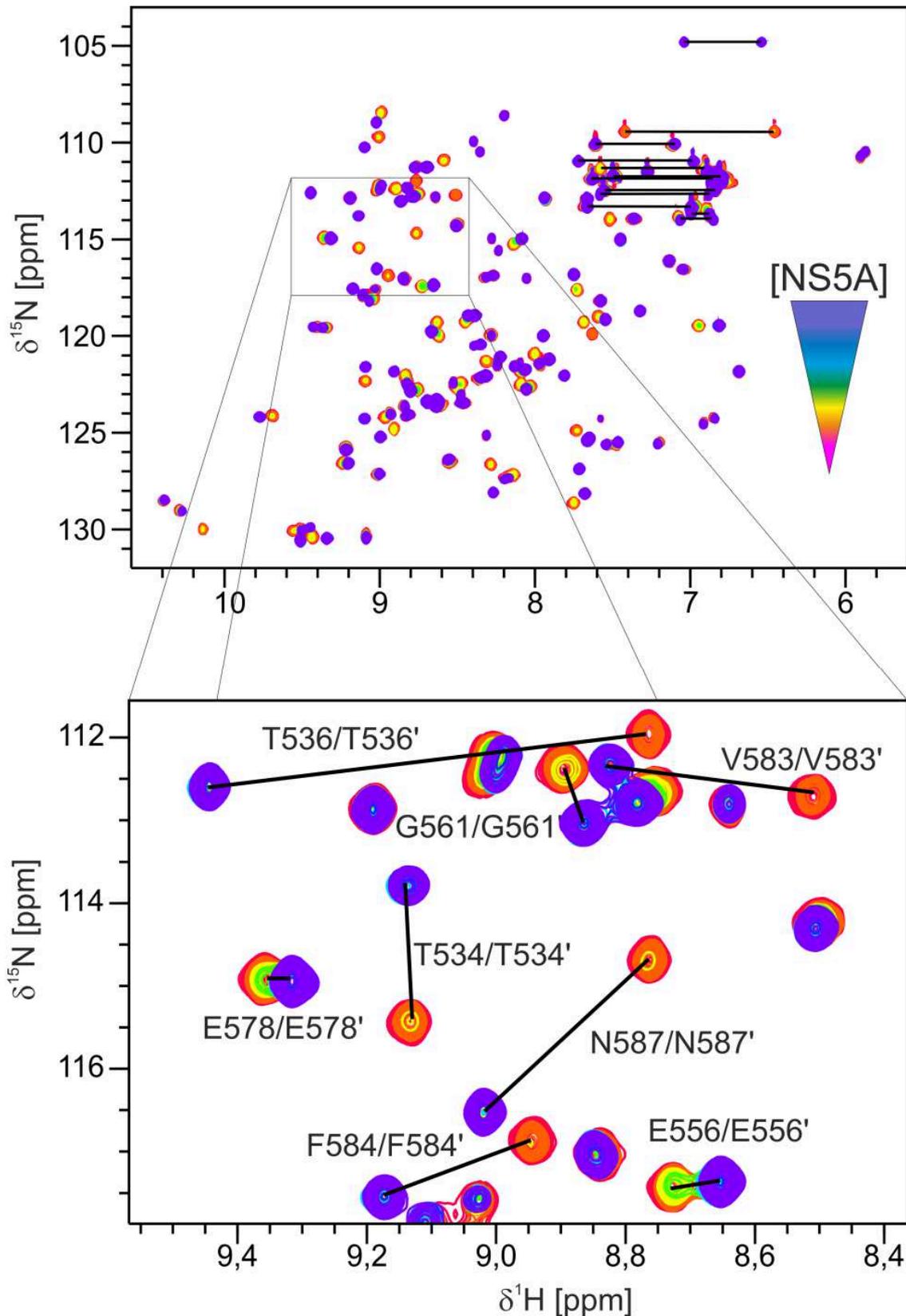


Abbildung 39. NMR-Titration von NS5A(341-361) zu Bin1 Tandem-SH3.

Von [ $^{15}\text{N}$ ]-Bin1 Tandem-SH3 wurden [ $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektren während des Titrationsverlauf aufgenommen. Die NS5A(341-361)-Konzentration wurde schrittweise erhöht auf Konzentrationsverhältnisse von 0 (pink), 0,25 (rot), 0,5 (orange), 0,75 (gelb), 1 (grün), 1,5 (türkis), 2 (hellblau), 5 (blau) und 6,1 (violett). Der Ausschnitt zeigt ausgewählte Aminosäurereste, die an der Interaktion von Bin1 Tandem-SH3 und NS5A(341-361) beteiligt sind.

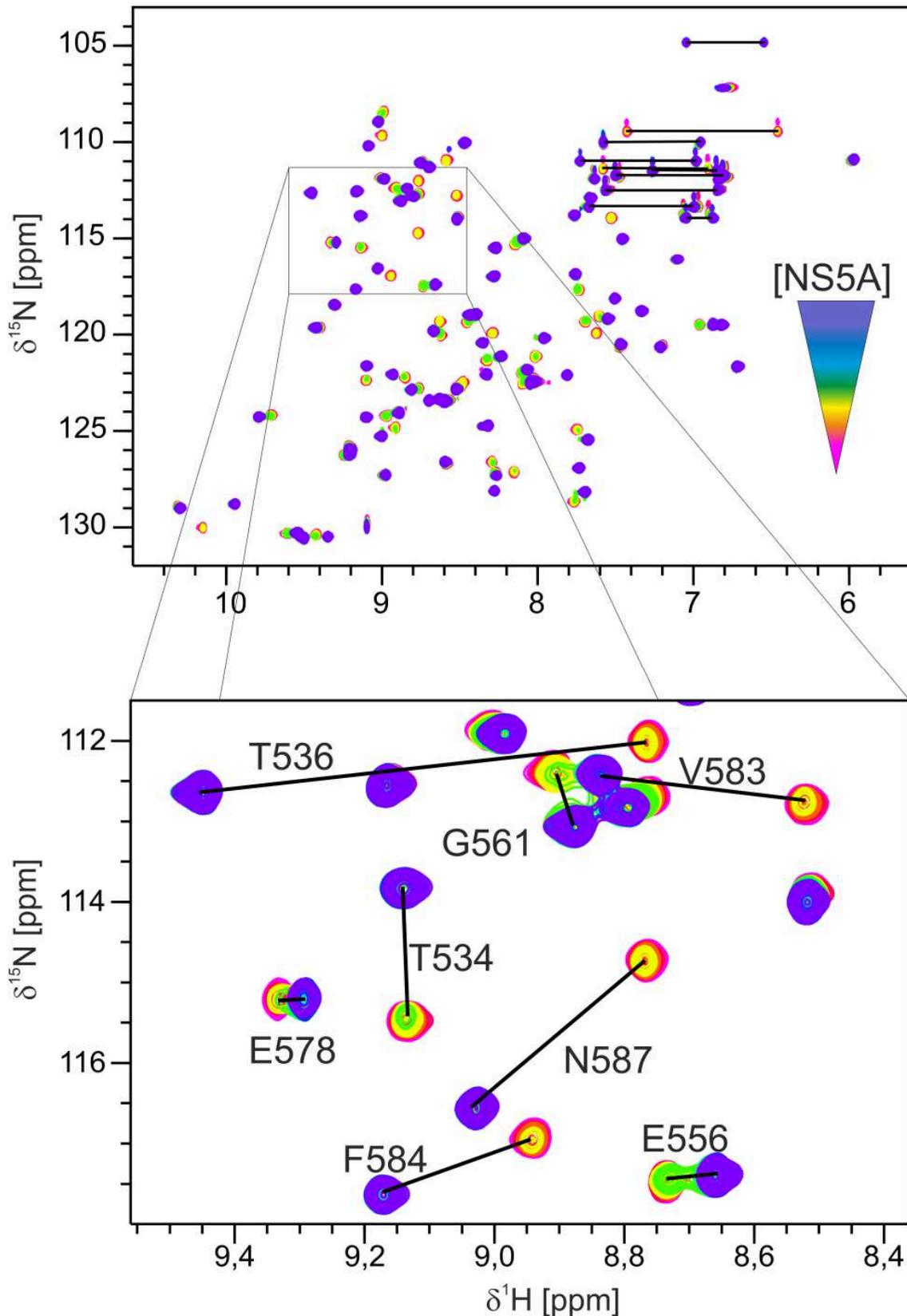


Abbildung 40. NMR-Titration von NS5A(341-361) zu Bin1 SH3.

Von [ $U$ - $^{15}\text{N}$ ]-Bin1 SH3 wurden [ $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektren während des Titrationsverlauf aufgenommen. Die NS5A(341-361)-Konzentration wurde schrittweise erhöht auf Konzentrationsverhältnisse von 0 (pink), 0,25 (rot), 0,5 (orange), 0,75 (gelb), 1 (grün), 1,5 (türkis), 2 (hellblau), 5 (blau) und 6,1 (violett). Der Ausschnitt zeigt ausgewählte Aminosäurereste, die an der Interaktion von Bin1 SH3 und NS5A(341-361) beteiligt sind.

#### 4.4.2. NMR-Titration von Bin1 Tandem-SH3 und NS5A(191-340)

Für die NMR-Titration von Bin1 Tandem-SH3 und NS5A(191-340) wurden beide Proteine isotopenmarkiert. Das NS5A(191-340) besteht aus den Bereichen LSC I und Domäne II. Die 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-BT-HNco-Spektren von [ $U\text{-}^{15}\text{N}$ ]-Bin1 Tandem-SH3 sind in Abbildung 41 und die von [ $U\text{-}^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ]-NS5A(191-340) in Abbildung 43 gezeigt. Zunächst wurden die Ausgangsspektren aufgenommen und dann schrittweise die Konzentration von Bin1 Tandem-SH3 erhöht.

In den 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-BT-HNco-Spektren von Bin1 Tandem-SH3 konnten lediglich geringe Unterschiede zwischen den chemischen Verschiebungen von der freien zur gebundenen Form erkannt werden. Beim vierfachen Konzentrationsüberschuss von NS5A(191-340) konnte anhand der Abbildung 41 kaum ein Unterschied festgestellt werden, aber die Volumina der Aminosäurereste in der RT- und N-Src-Schleife sowie der  $\beta$ -Stränge 4 und 5 verringern sich um bis zu 94 % bei W562.

In den 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-BT-HNco-Spektren von NS5A(191-340), s. Abbildung 43, konnten die Eigenschaften intrinsisch ungefaltener Proteine anhand der geringen Dispersion der chemischen Verschiebung der Protonen festgestellt werden. Des Weiteren konnten Veränderungen der chemischen Verschiebung zwischen freier und gebundener Form observiert werden. Durch Zugabe von Bin1 Tandem-SH3 ergab sich der generelle Trend einer erhöhten Stickstoff- und Protonenverschiebung. Auf der einen Seite konnte ein schneller Austausch  $k$  zwischen freier  $\delta_a$  und gebundenen  $\delta_b$  Form mit kontinuierlicher Änderung der chemischen Verschiebung festgestellt werden und auf der anderen Seite ein intermediärer Austausch, dabei verbreitern sich die Signale durch ihre Dynamik. Es wurden mindestens zwei Signalsätze erkannt, die sich durch die Titration veränderten, weitere Signale konnten entweder von der Interaktion, durch Dynamik, durch Artefakte oder vom Abbau des NS5A stammen.

Bin1 Tandem-SH3 band an die beiden transienten Helices H1 und H3 bei den Aminosäureresten T210-R220 und I296-F309. Neben dem langsamen Austausch fand bei Bin1 Tandem-SH3 ein schneller/intermediärer Austausch der selben Aminosäurereste statt, die chemische Verschiebung änderte sich dabei graduell und die Peaks verbreiterten sich im Titrationsverlauf, ohne dass eine Sättigung bei fünffachem Überschuss auftrat. Ein Signalsatz erreichte vollständige Sättigung bereits im ersten Titrationschritt, weitere Signalsätze erreichten diese Sättigung bis zum äquimolaren Verhältnis der Proteine unter langsamem Austausch. Dieser Austausch betraf beispielhaft die Aminosäurereste T204 der Helix H1 und S297 der Helix H3. Schneller Austausch betraf u. a. T204, K215, R217 der Helix H1 und S297, A317 und R318 der Helix H3, s. Abbildung 42. Eine Berechnung der Dissoziationskonstanten war nicht möglich, da erstens Titrationschritte bei kleinen Konzentrationsverhältnissen fehlten, zweitens eine vollständige Sättigung der Signale mit schnellem Austausch nicht erreicht wurde und drittens die präzise Bestimmung der an der Titration teilnehmenden NS5A-Moleküle durch Aggregieren erschwert war. Da mindestens zwei Signalsätze auf beiden Seiten der Proteine mit unterschiedlichem Austauschverhalten erreicht wurden, spricht dies für eine Assoziation im 1:1-Komplex unter Bindung der nieder- und hochaffinen transienten Helices.

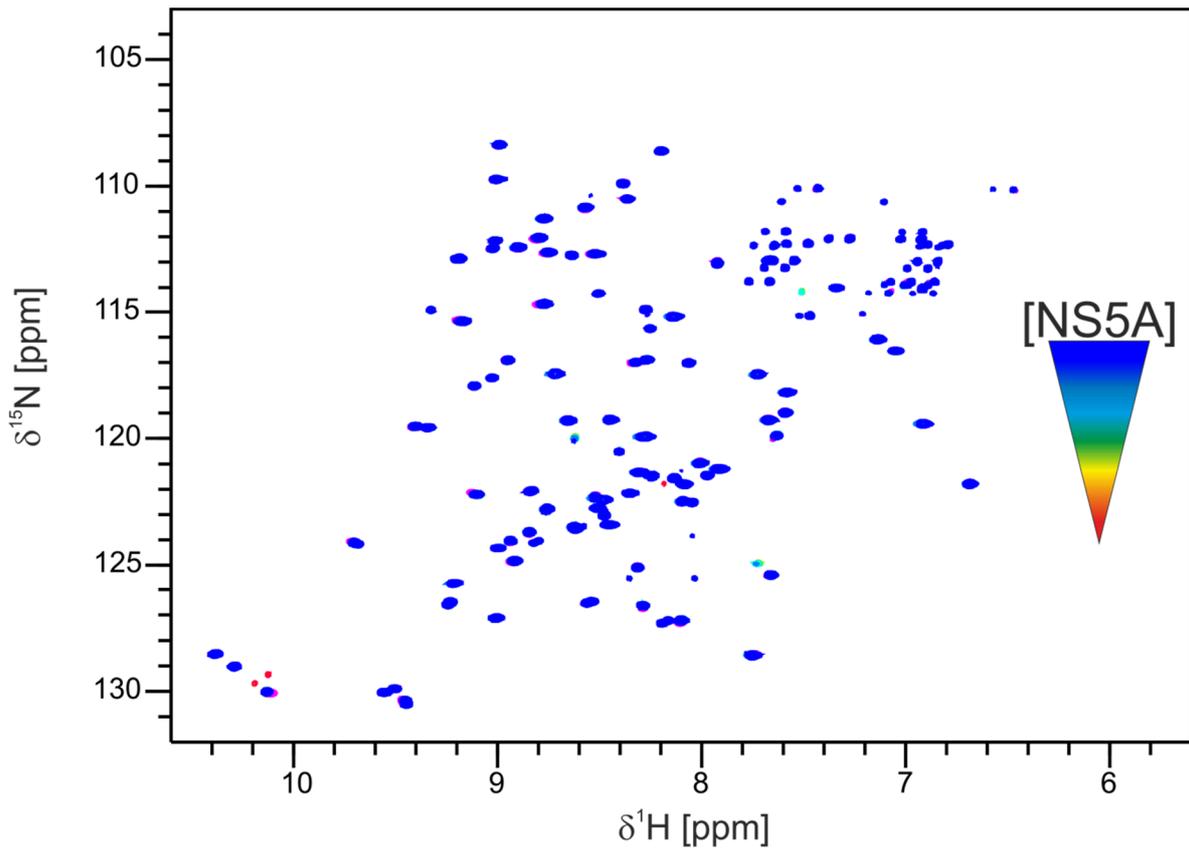


Abbildung 41. NMR-Titration von NS5A(191-340) zu Bin1 Tandem-SH3. Von [ $U\text{-}^{15}\text{N}$ ]-Bin1 Tandem-SH3 wurden [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-BT-HNco-Spektren während des Titrationsverlauf aufgenommen und um die Resonanzsignale von [ $U\text{-}^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ]-NS5A(191-340) subtrahiert. Die Bin1 Tandem-SH3-Konzentration wurde schrittweise erhöht auf Konzentrationsverhältnisse NS5A(191-340):Bin1 Tandem-SH3 von 0 (pink), 0,2 (rot), 0,5 (orange), 0,67 (gelb), 1 (grün), 1,3 (türkis), 2 (hellblau) und 4 (blau).

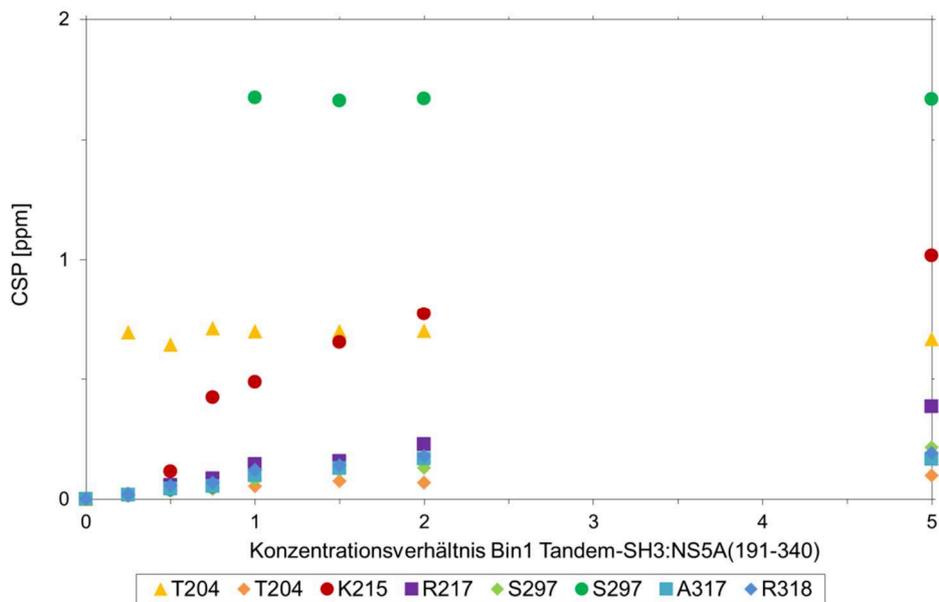


Abbildung 42. Austauschverhalten ausgewählter Aminosäurereste der Titration NS5A(191-340):Bin1 Tandem-SH3.

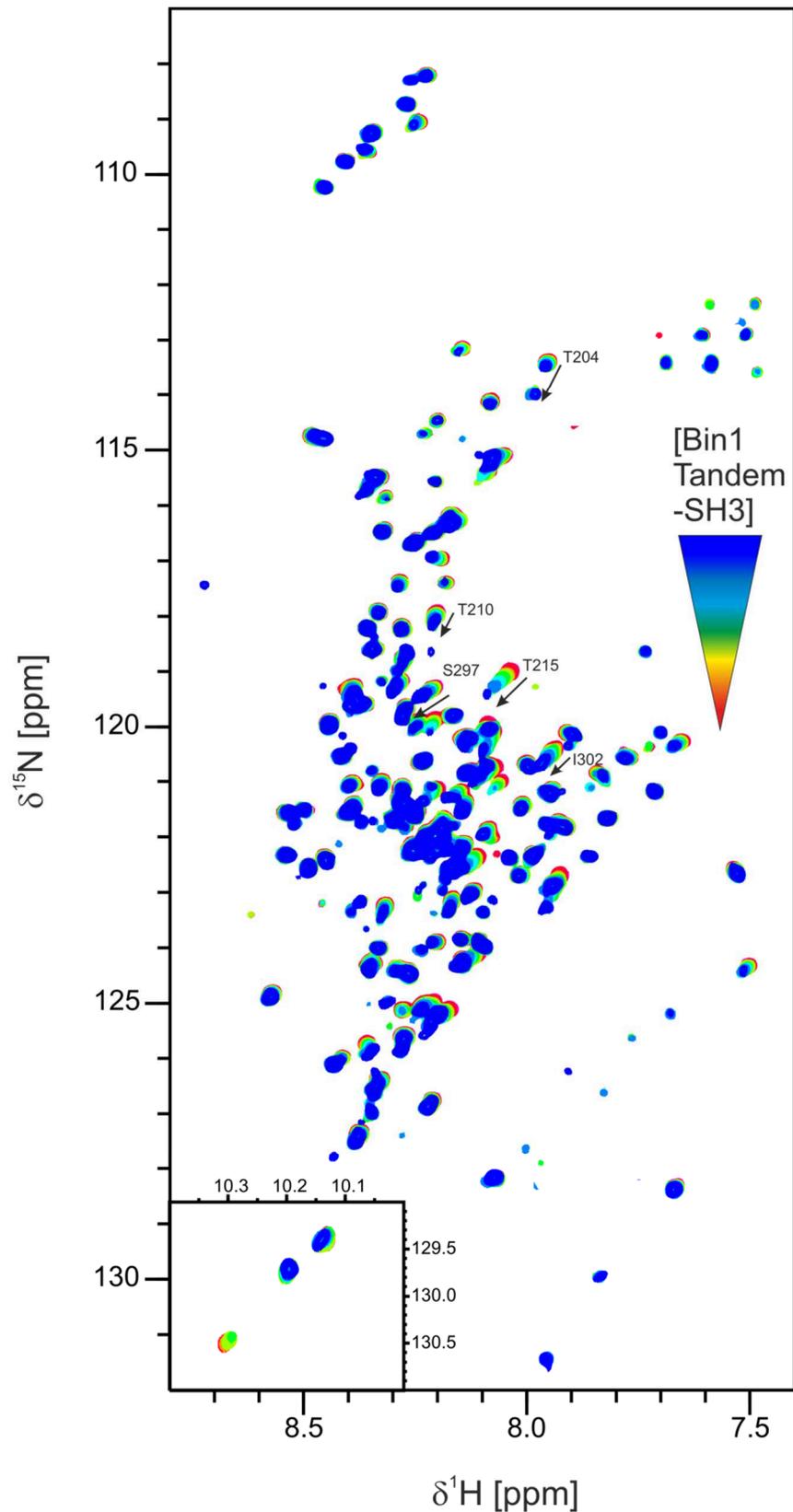


Abbildung 43. NMR-Titration von NS5A(191-340) zu Bin1 Tandem-SH3.

Von [ $U$ - $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ]-NS5A(191-340) wurden [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-BT-HNco-Spektren während des Titrationsverlauf aufgenommen und um die Resonanzsignale von [ $U$ - $^{15}\text{N}$ ]-Bin1 Tandem-SH3 subtrahiert. Die Bin1 Tandem-SH3-Konzentration wurde schrittweise erhöht auf Konzentrationsverhältnisse Bin1 Tandem-SH3:NS5A(191-340) von 0 (pink), 0,25 (rot), 0,5 (orange), 0,75 (gelb), 1 (grün), 1,5 (türkis), 2 (hellblau) und 5 (blau).

#### 4.4.3. NMR-Titration von Bin1 Tandem-SH3 und NS5A(191-447)

Die NMR-Titration von [ $U$ - $^{15}\text{N}$ ]-Bin1 Tandem-SH3 und NS5A(191-447) wurde durch Vorlage von Bin1 Tandem-SH3 und Addition von NS5A(191-447) durchgeführt. Die Titrationsschritte umfassten die Konzentrationsverhältnisse Bin1 Tandem-SH3: NS5A(191-447) von 0,25; 0,7 und 1,7 durch 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektren, s. Abbildung 44. Durch Zugabe von NS5A(191-447) spalteten die Resonanzsignale der an der Interaktion beteiligten Aminosäurereste von Bin1 Tandem-SH3 auf. Ein Signalsatz verblieb nahe der Ausgangsposition und ein weiterer zeigte intermediären Austausch zur Position des Bin1 Tandem-SH3 im gebundenen Zustand und wurde soweit verbreitert, dass die Amidresonanzsignale nicht detektierbar wurden. Folglich entstand ein heterogenes Gemisch aus Bin1 Tandem-SH3-Molekülen, die an die drei kanonischen und die beiden nicht-kanonischen Motive banden.

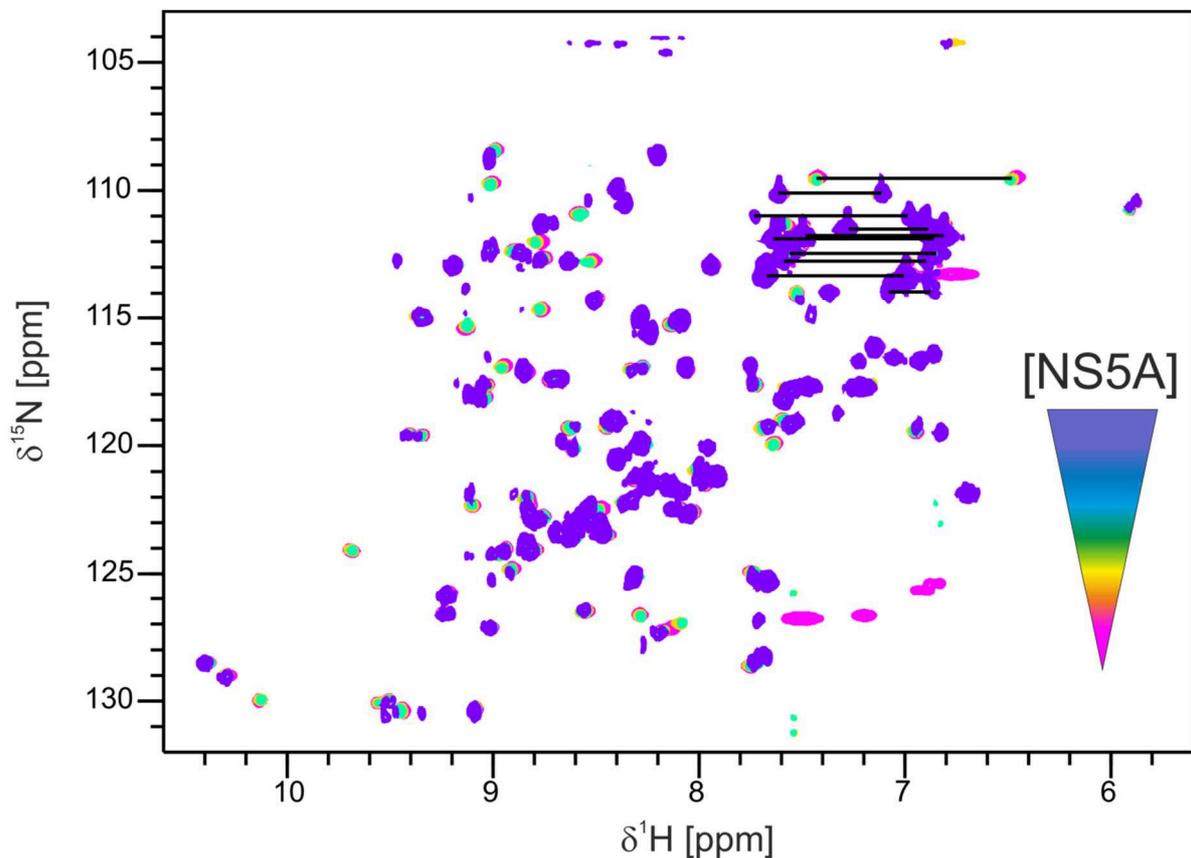


Abbildung 44. NMR-Titration von NS5A(191-447) zu Bin1 Tandem-SH3. Von [ $U$ - $^{15}\text{N}$ ]-Bin1 Tandem-SH3 wurden 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektren während des Titrationsverlauf aufgenommen. Die NS5A(191-447)-Konzentration wurde schrittweise erhöht auf Konzentrationsverhältnisse Bin1 Tandem-SH3:NS5A(191-447) von 0 (pink), 0,25 (gelb), 0,7 (grün) und 1,7 (violett).

## 4.5. Strukturelle Charakterisierung mit NMR

Das Protein Bin1 Tandem-SH3 wurde strukturell unter Verwendung NMR-spektroskopischer Methoden charakterisiert. Zusätzlich sollte eine Komplexstrukturbestimmung unter Verwendung eines 1:1-Komplexes aus Bin1 Tandem-SH3 und NS5A(341-361) erfolgen. Zunächst erfolgte die Zuordnung der Atome, anschließend die Bestimmung der Sekundärstruktur und abschließend – unter Verwendung von NOESY-Experimenten – die Strukturrechnung.

### 4.5.1. Zuordnung der Proteinrückgrad- und der Seitenkettenresonanzsignale

Die sequenzielle Zuordnungen der Rückgradsignale und die Zuordnungen der Seitenketten von Bin1 Tandem-SH3 wurden nach Kapitel 3.11.7 mit den Spektren aus Kapitel 3.11.6 durchgeführt. Dabei konnte die Zuordnung beider Domänen lediglich manuell erfolgen, da das Programm sonst die zweite SH3-Domäne nicht zugeordnet hätte. Ein 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] HSQC-Spektrum mit Signalzuordnung befindet sich in Abbildung 45 und die komplette Tabelle aller chemischen Verschiebungen ist im Kapitel 7.2.2.

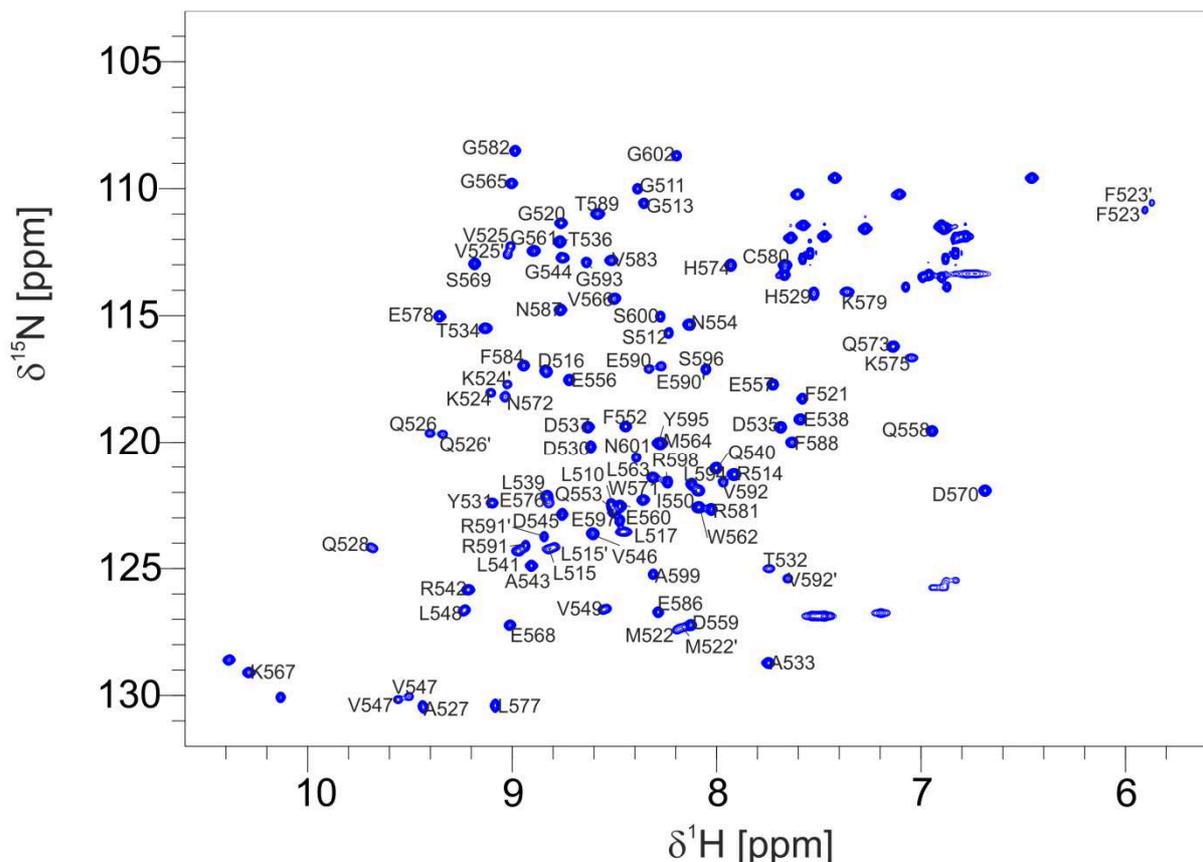


Abbildung 45. Zuordnung des Bin1 Tandem-SH3 im 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] HSQC.

Für die manuelle Zuordnung der Komplexstruktur Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361) wurde für Bin1 Tandem-SH3 lediglich ein 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ]-HcCH-COSY-Spektrum benötigt, damit

die an der Interaktion beteiligten Seitenkettenkohlenstoffe und  $\alpha$ -protonen in ihrer gebundenen Form zugeordnet werden konnten. Auch hier wurden sämtliche aliphatische Seitenketten zugeordnet, die komplette Liste aller Resonanzen befindet sich in Kapitel 7.2.2. In den Stickstoff- und Kohlenstoff-korrelierten 2D  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -NOESY-Spektren wurde zusätzlich ein Proton als T589  $\text{H}^{\text{V1}}$  über NOEs zu Protonen des Proteins identifiziert, das durch Bindung des Liganden nicht mehr mit dem Lösungsmittel austauschen konnte und somit NOEs auftraten.

Unterschiede der N- und C-terminalen SH3-Domänen konnten am einfachsten am 2D  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum anhand von Unterschieden in der chemischen Verschiebung von N- und C-terminalen Amidn verzeichnet werden. Ein Vergleich zusätzlich zu Bin1 SH3 (Zuordnung erfolgte von A. Aladag und M. Schwarten) ist in Abbildung 46 dargestellt.

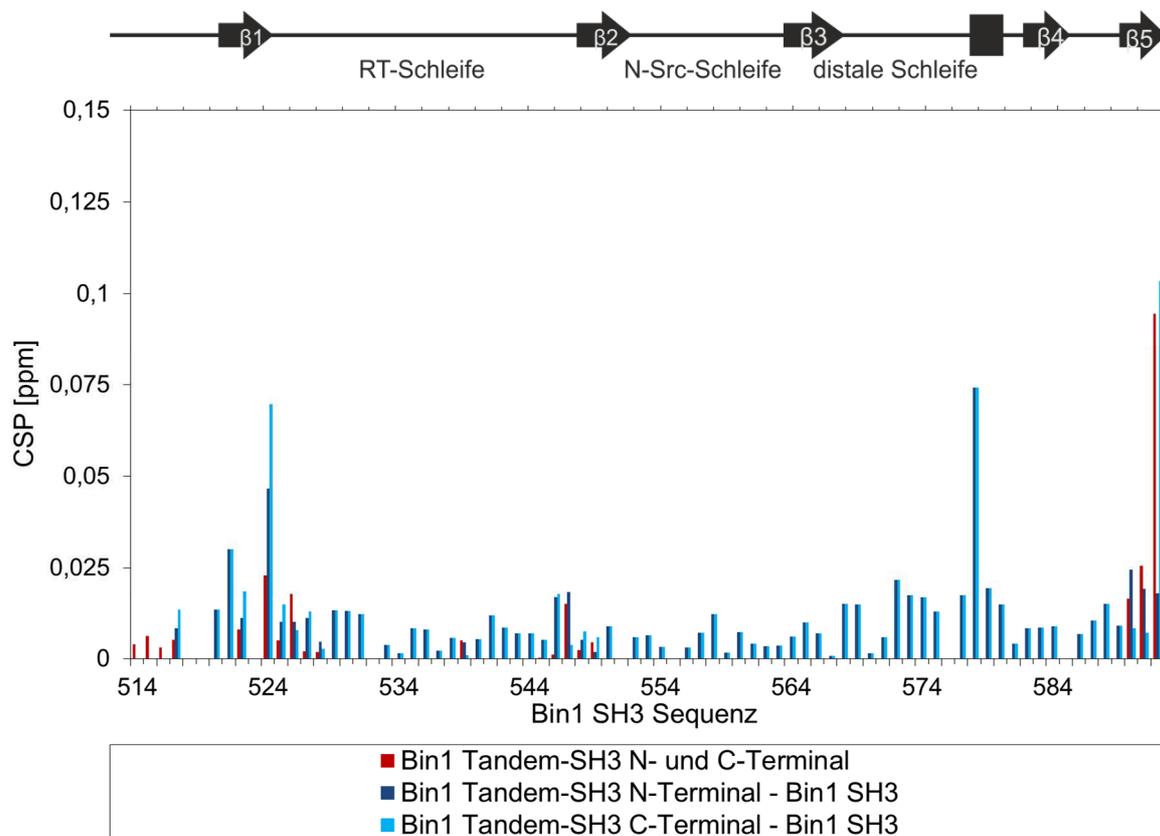


Abbildung 46. CSP der Bin1 (Tandem-)SH3-Domänen aus dem 2D  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$  HSQC.

Änderungen der chemischen Verschiebung zwischen der N- und C-terminalen SH3-Domäne aus Bin1 Tandem-SH3 (rot), N-terminale Domäne des Bin1 Tandem-SH3 zu Bin1 SH3 (dunkelblau) und C-terminale Domäne des Bin1 Tandem-SH3 zu Bin1 SH3 (hellblau) sind sequenzspezifisch dargestellt. Die Zuordnung von Bin1 SH3 erfolgte von A. Aladag und M. Schwarten (persönliche Kommunikation). Größere CSP wurden in den N- und C-terminalen Bereichen der Domäne, der  $\beta$ -Stränge 1, 2 und 5 und der distalen Schleife detektiert.

Neben den Unterschieden des Bin1 Tandem-SH3 im N-Terminus G508-L517 und dem Linker G593-N601 betraf das im apo-Zustand zusätzlich M522, F523, K524, V525, Q526, V547, L548, E590, R591 und V592 und im holo-Zustand M522, F523, K524, V525, Q526, V547, E590, R591 und V592. Diese Aminosäurereste bildeten den  $\beta$ 1- und  $\beta$ 5-Strang der

Kerndomäne aus und beeinflussten durch die interne Verbindung zum  $\beta$ 2-Strang die Aminosäuren V547 und L548. Alle weiteren Spektren zeigten für diese Aminosäurereste des Bin1 Tandem-SH3 eine Verbreiterung der  $H^\alpha$ - und  $H^\beta$ -Signale, jedoch konnte lediglich ein Maximum vom Analyseprogramm lokalisiert werden. Somit wurden die größten Differenzen bei den  $H^N$ -Protonen detektiert. Eine besondere Stellung nahm die Aufspaltung des Signals von H529  $H^{\epsilon 1}$  in der holo-Struktur ein, im Gegensatz zum Signal der apo-Form spaltete dieses Proton in der holo-Form in zwei Signale auf, die den beiden N- und C-terminalen Histidinresten zugeordnet wurden. Der Vergleich zu Bin1 SH3 bestätigte Abweichungen der chemischen Verschiebungen der Aminosäurereste des N- und C-Terminus, außerdem divergierten Aminosäurereste der distalen Schleife.

Die Zuordnung des gebundenen Peptides NS5A(341-361) erfolgte anhand von Stickstoff- und Kohlenstoff-gefilterten 2D [ $^1H$ ,  $^1H$ ]-TOCSY und NOESY-Spektren, s. Abbildung 47 und Abbildung 48. Bedingt durch die unterschiedlichen Pulssequenzen entstand eine Temperaturdifferenz zwischen beiden Spektren. Das TOCSY-Experiment führte durch die Radiofrequenzpulse der isotropischen Mixsequenz zu einer erhöhten Temperatur in der Probe. Im Vergleich beider Spektren, die bei unterschiedlicher lokaler Proben temperatur gemessen wurden, traten Änderungen der chemischen Verschiebung auf. Vertikale und horizontale Pseudosignale erschwerten die Zuordnung zusätzlich. Ein Ausschnitt beider Spektren des Liganden ist in Abbildung 49 gezeigt. Darin enthalten sind alle nicht-Proline  $H^N$ - $H^\alpha$ -Korrelationen des Peptides aus dem TOCSY-Spektrum und die NOE-Signale aus dipolaren Kopplungen im NOESY-Spektrum. Die chemischen Verschiebungen der Protonen divergierten kaum, darum wurde eine Zuordnung erschwert. Besonders herausfordernd waren die Abschnitte mit mehreren Prolinen und Argininen in unmittelbarer Sequenzfolge. Die Dispersion der Protonenverschiebung ist in Tabelle 26 dargestellt, die komplette Tabelle der zugeordneten Resonanzen befindet sich in Kapitel 7.2.2. Die größte Differenz in der chemischen Verschiebung aller Protonen der Proline erreichte P345, während Arginine die maximale Dispersion der  $H^N$ -Protonen erlangten. Zur Kontrolle wurden molekulardynamische Rechnungen des Peptides mit ARIA2, s. Abbildung 50, erzeugt, die die Zuordnung der acht Proline und drei Arginine in der 21 Aminosäuresequenz erleichterten. Gut definiert war die linksgängige Polyprolinhelix, PPII-Helix, im Bereich der Aminosäurereste von P345-I352. Die Abbildung 50 zeigt NOEs des gefilterten 2D [ $^1H$ ,  $^1H$ ]-NOESY-Spektrums zwischen benachbarten Aminosäureresten. Anhand der NOEs könnte sich eine kleine  $\alpha$ -Helix am C-Terminus des Peptides befinden, die jedoch nicht durch die molekulardynamische Rechnung bestätigt werden konnte.

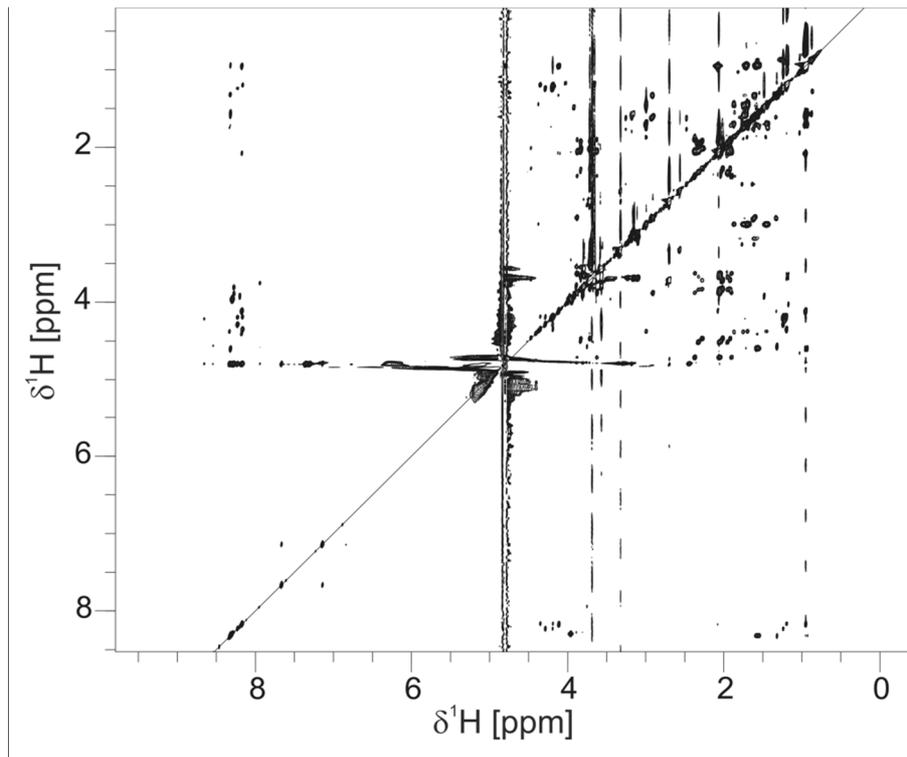


Abbildung 47. CN-gefiltertes 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ]-TOCSY von NS5A(341-361) im Komplex mit Bin1 Tandem-SH3. Geringe chemische Diversität des Peptides zusammen mit Artefaktssignalen erschwerten die Zuordnung.

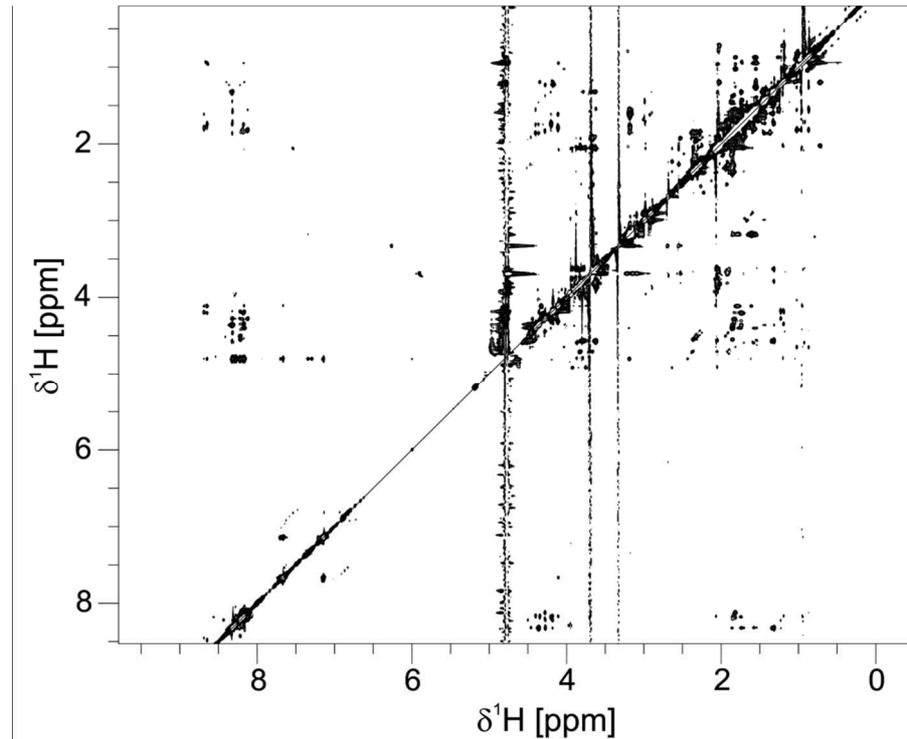


Abbildung 48. CN-gefiltertes 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ]-NOESY von NS5A(341-361) im Komplex mit Bin1 Tandem-SH3. Die geringe Dispersion des Peptides zusammen mit Artefaktssignalen erschwerte die Auswertung der NOEs.

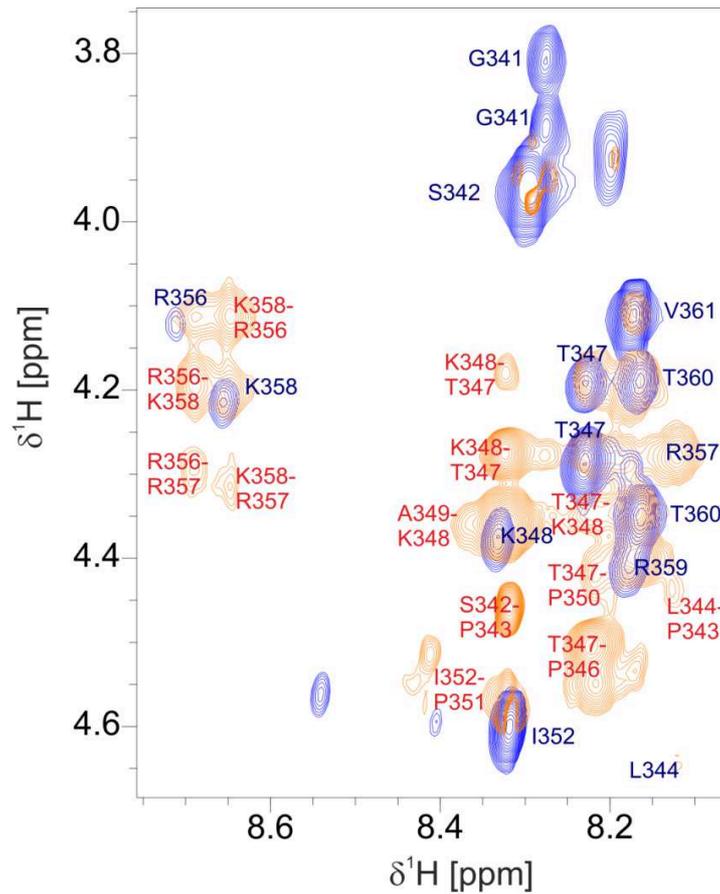


Abbildung 49. Abweichungen der H<sup>N</sup>- und H<sup>α</sup>-Protonen chemischen Verschiebung in den Spektren von NS5A(341-361).

Das TOCSY-Spektrum (blaue Signale) zeigt über J-Kopplungen korrelierte Protonen des Peptides mit blauer Beschriftung an, das NOESY (rote Signale) die dipolaren Kopplungen mit roter Beschriftung.

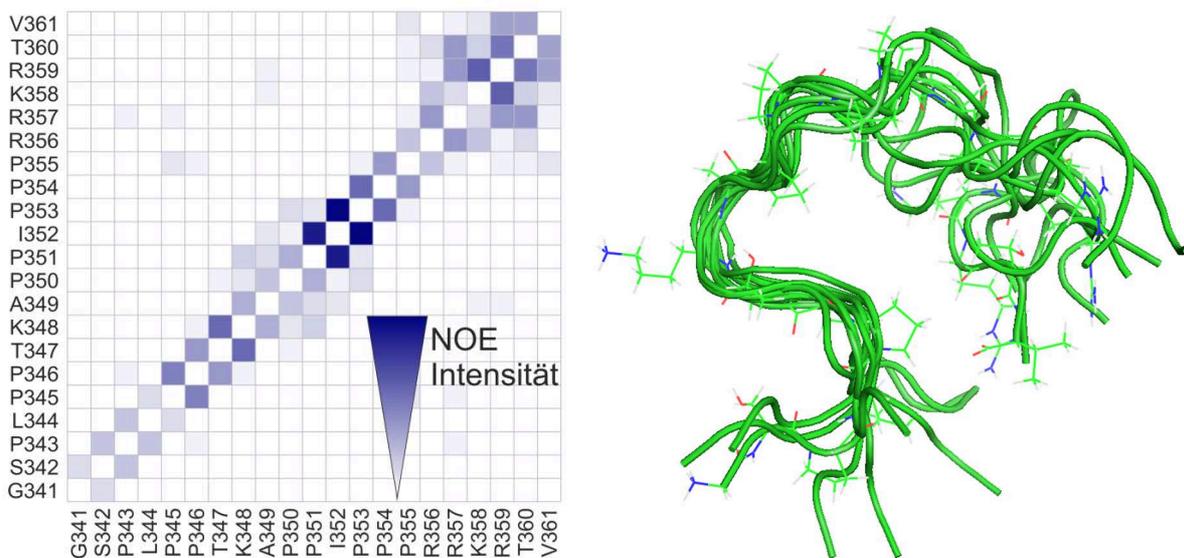


Abbildung 50. Relative Intensitäten der NOEs und Strukturensamble von NS5A(341-361).

Die Abbildung der Intensitäten wurden aus dem Programm CcpNmr analysis entnommen, anhand derer eine kleine C-terminale Helix ausgebildet werden könnte. Das Ensemble wurde mit Theseus geordnet und beinhaltet eine linksgängige Polyprolinhelix zwischen den Aminosäureresten P345-I352.

Tabelle 26. Divergenz der chemischen Verschiebung der Protonen in NS5A(341-361).

Sowohl die minimalen und maximalen chemischen Verschiebungen aller Protonen, als auch die der Prolin und Arginine sind angegeben.

Typ	Minimum $\delta$	Maximum $\delta$	Prolin $\Delta\delta$	Arginin $\Delta\delta$
H <sup><math>\alpha</math></sup>	3,79	4,92	4,40-4,92	4,11-4,28
H <sup><math>\beta</math></sup>	1,20	4,28	1,72-2,37	1,74-1,86
H <sup><math>\gamma</math></sup>	0,72	2,23	0,71-2,23	1,36-1,62
H <sup><math>\delta</math></sup>	0,87	3,87	2,53-3,87	2,25-3,18
H	8,12	8,70		8,14-8,70

Zusammengefasst für freie und Komplexstruktur wurden folgende Atome zugeordnet, s. Tabelle 27. Aus der Rechnung sind Kohlenstoff- und Stickstoffatome des Peptides aufgrund seiner nicht vorhandenen Isotopenmarkierung herausgelassen. Zusätzlich wurden solche Atome aus der Rechnung genommen, die nicht durch aufgenommene Experimente adressiert wurden wie Sauerstoffe, C <sup>$\gamma$</sup>  der Aromaten oder Prolin-Stickstoffe. Die Zuordnung der apo-Struktur erreichte eine Vollständigkeit von 99,7 %, während die der holo-Struktur 99,1 % erreichte. Die Zuordnung der Rückgrad- und Seitenkettenprotonen des NS5A(341-361) erfolgte gänzlich. Durch Bindung fixierte Argininseitenkettenprotonen wurden ebenfalls erkannt und für Bin1 Tandem-SH3 bzw. für NS5A(341-361) zugeordnet.

Tabelle 27. Status der Zuordnung des freien Bin1 Tandem-SH3 und des Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361)-Komplexes.

Neben dem Atomtyp sind die gesamten Atome und solche, die durch die aufgenommenen Experimente detektierbaren Atome, aufgelistet. Zunächst erfolgt die Nennung der Atome des Bin1 Tandem-SH3 und anschließend, mit dem Plus signalisiert, die Nennung der Atome in NS5A(341-361). Es folgt die Anzahl und der Prozentsatz der Zuordnungen im apo- und holo-Zustand.

Typ	Gesamtatomanzahl		apo-Zustand		holo-Zustand	
	Alle Protein+Peptid	Atome Zuordbare Atome	Anzahl	Prozent [%]	Anzahl	Prozent [%]
N	174+21	162	162	100	162	100
N <sup><math>\delta</math></sup>	7	7	7	100	7	100
N <sup><math>\epsilon</math></sup>	29+3	22	22	100	22	100
N <sup><math>\zeta</math></sup>	8+2	0	0		0	
N <sup><math>\eta</math></sup>	18+6		2	11,1	0	
H	162+12	162+12	162	100	174	100
H <sup><math>\alpha</math></sup>	189+22	189+22	189	100	211	100
H <sup><math>\beta</math></sup>	287+35	287+35	287	100	322	100
H <sup><math>\gamma</math></sup>	186+34	186+34	186	100	218	99,1
H <sup><math>\delta</math></sup>	125+29	125+29	125	100	154	100
H <sup><math>\epsilon</math></sup>	78+7	78+7	77	98,7	84	98,8
H <sup><math>\zeta</math></sup>	18	18	18	100	18	100
H <sup><math>\eta</math></sup>	4	4	4	100	4	100
C	174+21	162	160	98,8	162	100
C <sup><math>\alpha</math></sup>	174+21	174	173	99,4	173	99,4
C <sup><math>\beta</math></sup>	159+20	159	159	100	159	100
C <sup><math>\gamma</math></sup>	161+20	126	126	100	119	94,4
C <sup><math>\delta</math></sup>	118+16	96	95	99,0	83	86,5
C <sup><math>\epsilon</math></sup>	37+2	36	33	91,7	33	91,7
C <sup><math>\zeta</math></sup>	30+3	18	18	100	18	100
C <sup><math>\eta</math></sup>	4	4	4	100	4	100
<b>Summe</b>	<b>2142+263</b>	<b>2015+132</b>	<b>2007+2</b>	<b>99,7</b>	<b>2127</b>	<b>99,1</b>

#### 4.5.2. Sekundärstrukturbestimmungen

Die Rückgradtorsionswinkel  $\phi$  und  $\psi$  wurden anhand von chemischen Verschiebungen der  $H^N$ ,  $H^\alpha$ ,  $C^\alpha$ ,  $C^\beta$ ,  $C^O$  und N-Atome mit TALOS-N, s. Kapitel 3.11.9, vorhergesagt. Aus dem Programm wurden der Strukturparameter  $S^2$  und die Sekundärstrukturelemente jeder Aminosäure ermittelt. Keine chemische Verschiebung wurde außerhalb der Programm-internen Limitierungen gefunden und PROMEGA zeigte, dass keine cis-Proline in den apo- und holo-Zuständen des Proteins vorlagen.

Eine Überlagerung der Strukturparameter  $S^2$  von Bin1 SH3 (Zuordnung von A. Aladag und M. Schwarten, persönliche Kommunikation) mit apo- und holo Bin1 Tandem-SH3 zeigte für die N-terminale Domäne eine gute Übereinstimmung, apo- und holo-Form des Bin1 Tandem-SH3 zeigten diese auch für die C-terminale SH3-Domäne, s. Abbildung 51. Die strukturierten Bereiche entsprachen den für SH3-Domänen erwarteten Positionen. Die Flexibilität des N-Terminus, des Linkers, der RT- und der N-Src-Schleifen war in der holo-Form geringer als in der apo-Form. Generell gilt jedoch für das Bin1 Tandem-SH3-Konstrukt eine hohe Flexibilität sowohl am N-terminalen Linker, Aminosäurereste G508-F521, als auch am Linker, Aminosäurereste G593-F521' zwischen den beiden SH3-Domänen. Somit können die beiden Domänen sich unabhängig voneinander bewegen und agieren.

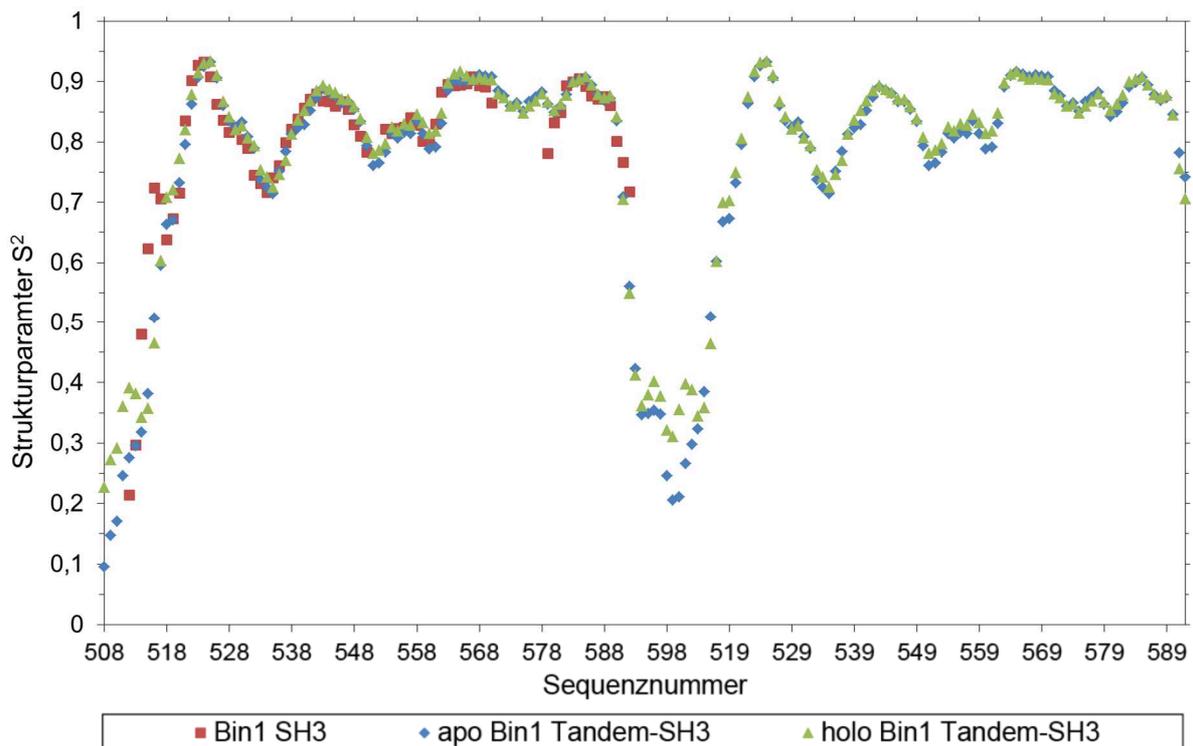


Abbildung 51. Übereinstimmung des Strukturparameters  $S^2$  für Bin1 SH3 und apo- und holo-Zustand des Bin1 Tandem-SH3.

$S^2$  als Maß für Rückgradflexibilität in Proteinen wurde mit Talos-N berechnet. Bin1 SH3 ist als rotes Quadrat, apo Bin1 Tandem-SH3 als blaue Raute und holo Bin1 Tandem-SH3 als grünes Dreieck dargestellt. Bin1 SH3 Zuordnung stammt von A. Aladag (Dissertation).

Die Sekundärstrukturelementanalyse von Bin1 Tandem-SH3 in apo- und holo-Zustand resultierte in definierten Bereichen mit  $\beta$ -Strängen und  $\alpha$ -Helices im Ramachandran-Diagramm. Eine Klassifizierung in dynamische, uneindeutige, großzügig-gute und gute Bereiche wurde vorgenommen. Dabei wird die Klassifizierung gut definiert mit einer einheitlichen Lokalisation im Ramachandran-Diagramm mit 25 Datenbank-Übereinstimmungen und großzügig-gut mit 10 Übereinstimmungen. Somit zeigen uneindeutige mehrere Populationen im Ramachandran-Diagramm und dynamische haben zusätzlich eine erniedrigten Strukturparameter  $S^2 < 0,6$ . Dynamische Bereiche des apo-Zustands wurden in den Bereichen L510-L517 sowie V592-D516 lokalisiert, die Aminosäurereste T534, P551, F552, G565, C580, R581 und G582 erhielten die Klassifizierung uneindeutig und die Aminosäurereste A543, K575 und F588 großzügig-gut. Dynamische Bereiche des holo-Zustands entsprachen ebenfalls den zu erwartenden Sequenzen am N-Terminus L510-D516 und im Linker V592-D605. Die Klassifizierung uneindeutig erhielten die Aminosäurereste T534, F552, C580, E586, F588 und in die Klasse großzügig-gut kamen die Aminosäurereste G544, V549, P551, K575, N587. Alle anderen Aminosäurereste wurden als gut definiert und für die Strukturrechnungen verwendet. Zusammenfassend wurde eine einheitliche Klassifizierung der beiden Zustände von Bin1 Tandem-SH3 allein und im Komplex erzielt. Die erzeugten Torsionswinkelschränkungen wurden bei guter Klassifizierung, das betraf 87 % der Aminosäurereste, und gültigen Positionen im Ramachandran-Diagramm in die Strukturrechnung eingeladen.

Folgende Sekundärstrukturelemente wurden für die apo-Struktur ermittelt: F523-A527  $\beta$ -Strang, E538-R542  $\beta$ -Strang, V546-V549  $\beta$ -Strang, L563-K567  $\beta$ -Strang, E568-N572  $\alpha$ -Helix, L577-K579  $\alpha$ -Helix, R581-V583  $\beta$ -Strang und T589-R591  $\beta$ -Strang, s. Abbildung 52. Für die holo-Struktur betragen sie F523-A527  $\beta$ -Strang, E538-R542  $\beta$ -Strang, V546-V549  $\beta$ -Strang, L563-K567  $\beta$ -Strang, E568-N572  $\alpha$ -Helix, L577-K579  $\alpha$ -Helix, C580-G582  $\beta$ -Strang und T589-R591  $\beta$ -Strang, s. Abbildung 53.

Unterschiede der Sekundärstrukturen zwischen den N- und C-terminalen SH3-Domänen in der apo-Form waren signifikant bei den Aminosäureresten G565, V566, K567, R581, G582, R591 und in der holo-Form lediglich bei Aminosäureresten E590 und R591. Signifikante Abweichungen zwischen den Sekundärstrukturelementen der apo- und holo-Form von Bin1 Tandem-SH3 wurden für die Aminosäurereste T532, I555, G565, V566, K567, W571, N572 und E586 verzeichnet. Diese Aminosäurereste befinden sich vorwiegend am C-terminalen Ende der N-*Src*-Schleife sowie  $\beta$ -Strang 3.

Die Strukturmerkmale von NS5A(341-361) wurden ebenfalls anhand der chemischen Verschiebung und den zusätzlich durch die ermittelten intramolekularen NOEs  $d_{\alpha N}^{i,i+2}$  definiert. Zwischen den Aminosäureresten R356-R359 wurde eine  $3_{10}$ -Helix lokalisiert. Eine linksgängige Polyprolinhelix konnte anhand der NOEs und der chemischen Verschiebungen nicht bestätigt werden. Da diese Struktur relativ offen ist und keine internen Wasserstoffbrückenbindungen besitzt, ist deren Nachweis mit TALOS-N oder durch NOEs erschwert. Jedoch trat sie in der Strukturrechnung bei den Aminosäureresten P345-I352 auf.

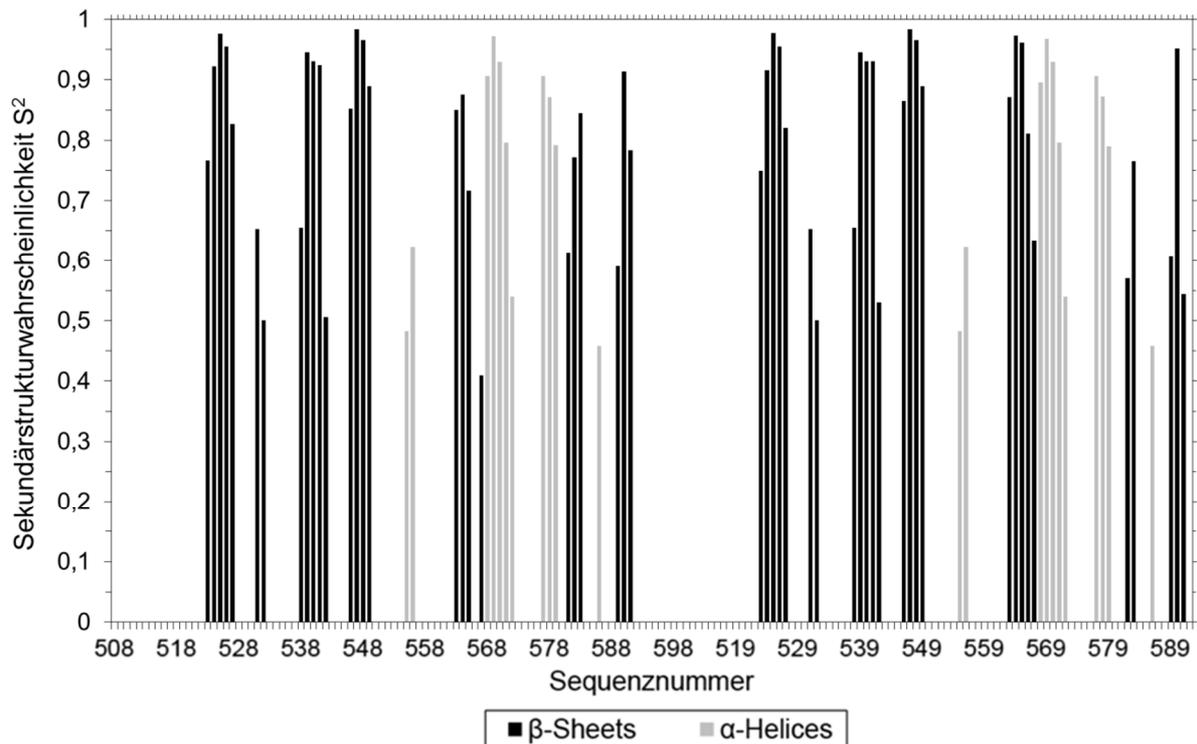


Abbildung 52. Bestimmung der Sekundärstrukturelemente für Bin1 Tandem-SH3 aus Talos-N. Schwarze Balken repräsentieren Aminosäurereste mit vorrangiger Ausprägung eines  $\beta$ -Strangs, hellgraue Balken zeigen  $\alpha$ -Helices.

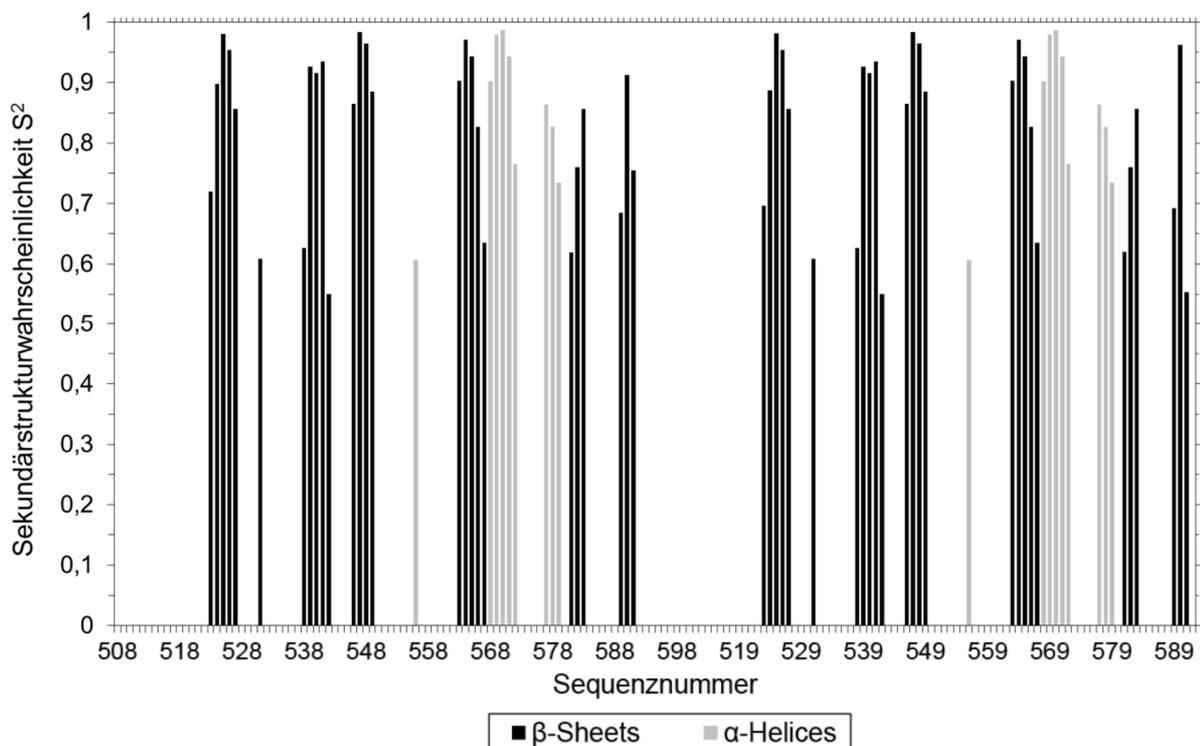


Abbildung 53. Bestimmung der Sekundärstrukturelemente für Bin1 Tandem-SH3 im Komplex mit NS5A(341-361) aus Talos-N. Schwarze Balken repräsentieren Aminosäurereste mit vorrangiger Ausprägung eines  $\beta$ -Strangs, hellgraue Balken zeigen  $\alpha$ -Helices.

### 4.5.3. Protonen-Protonen-Abstände

Für das freie Bin1 Tandem-SH3 wurden Protonen-Protonen-Abstände durch die drei aufgenommenen NOESY-Spektren: aliphatisches und aromatisches 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ] HSQC-NOESY- und 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] NOESY-HSQC-Spektrum ermittelt. Dazu wurden manuell alle Resonanzsignale zugeordnet. Eine automatisierte Zuordnung war nicht möglich, da das Programm die Überlagerung zweier Domänen, die zu gleichen chemischen Verschiebungen neigten, nicht erfasste. Das Programm PyRFT wurde zur Validierung genutzt, da es Protonen-Protonen-Abstände sucht und nicht erfasste NOE-Signale aufzeigt.

Um die Komplexstruktur Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361) rechnen zu können, wurden neben den drei genannten NOESY-Spektren, die auch für den Komplex aufgenommen wurden, zusätzlich die beiden Stickstoff- und Kohlenstoff-gefilterten 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ]-HSQC-NOESY-Spektren verwendet. Diese Spektren zeigten intermolekulare NOEs zwischen Protein und Peptid und machten damit den wertvollsten Bestandteil der Strukturrechnung aus. Die drei 3D HSQC-NOESY-Spektren zeigten neben den hauptsächlich intramolekularen zwar auch intermolekulare NOEs, durch Überlagerung einiger chemischen Verschiebungen war alleine damit eine Zuordnung der intermolekularen NOEs nicht möglich. Auch bei diesen insgesamt fünf NOESY-Spektren wurde eine manuelle Zuordnung der NOEs gewählt, da eine automatisierte Zuordnung nicht möglich war.

Die beiden nachfolgenden Abbildungen zeigen die beiden 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ]-HSQC-NOESY-Spektren mit intermolekularen NOEs. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis dieser Spektren war gering, auch war die Wasserunterdrückung im Kohlenstoff-gefilterten 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ]-HSQC-NOESY-Spektren nicht ausreichend, um weitere NOEs sicher zu unterscheiden. Darum konnten nur die stärksten Signale in die Auswertung mit einbezogen werden. NOEs, die lediglich in den 3D-Spektren und nicht in den 2D-Spektren observiert wurden, waren somit nicht eindeutig. Es wurden 17 NOEs im 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ ]-HSQC-NOESY und 22 NOEs im 2D [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ]-HSQC-NOESY detektiert, die in den 3D Spektren verifiziert wurden und die eine zweideutige Zuordnung auf Seiten des Proteins besitzen, da die chemischen Verschiebungen der Atome der N-terminalen mit der C-terminalen Domäne übereinstimmten. NOEs in den 2D intermolekularen NOESY-Spektren wurden in Tabelle 28 zusammengestellt.

Die Zuordnung wurde erschwert durch die Überlagerung der Resonanzen der N- und C-terminalen Domäne im Bin1 Tandem-SH3. Folglich waren auf der Seite des Proteins jeweils zwei unbekannte Parameter. Darunter fielen auch die NOEs von H529 bzw. H529', der einzigen im Bezug zur apo-Struktur neu auftretenden Aufspaltung der chemischen Verschiebung eines Resonanzsignals. Jedoch sind die NOEs von H529 auch nicht uneindeutig. Außerdem wurden, wie in der Zuordnung erwähnt, intramolekulare NOEs zum T589 H<sup>v1</sup> observiert.

Wie beschrieben war auch die Dispersion der Resonanzsignale im Liganden gering, dadurch wurde eine Zuordnung der NOEs zusätzlich erschwert. Einzelne NOEs hätten zwei bis sieben Aminosäureresten des Liganden zugeordnet werden können, die sich in ihrer Sequenzposition deutlich unterscheiden. Ebenso waren die NOEs zu den Seitenketten der Arginine im Liganden zu behandeln, sie hätten eine der beiden Domänen im Protein binden

können und wären für eine Strukturrechnung von vorangiger Bedeutung. Außerdem hatten auch die Lysine ähnliche chemische Verschiebungen, anhand derer daher auch keine Unterscheidung vorgenommen werden konnte, welche der beiden Domänen des Bin1 Tandem-SH3 diese bindet.

Hydrophobe Interaktionen, die bei SH3-Domänen eine besondere Rolle spielen, erlaubten keine Unterscheidung, welches der drei PxxP-Motive an der Interaktion beteiligt war. Es konnte auf Seiten des Proteins jedoch eindeutig bewiesen werden, dass die Aminosäurereste NOEs ausbilden, die in den vorangegangenen Titrationen eine Änderung der chemischen Verschiebung zeigten. Aufgrund der Vielzahl möglicher interagierender Ligandaminosäurereste war eine eindeutige Zuordnung zur Strukturrechnung nicht möglich.

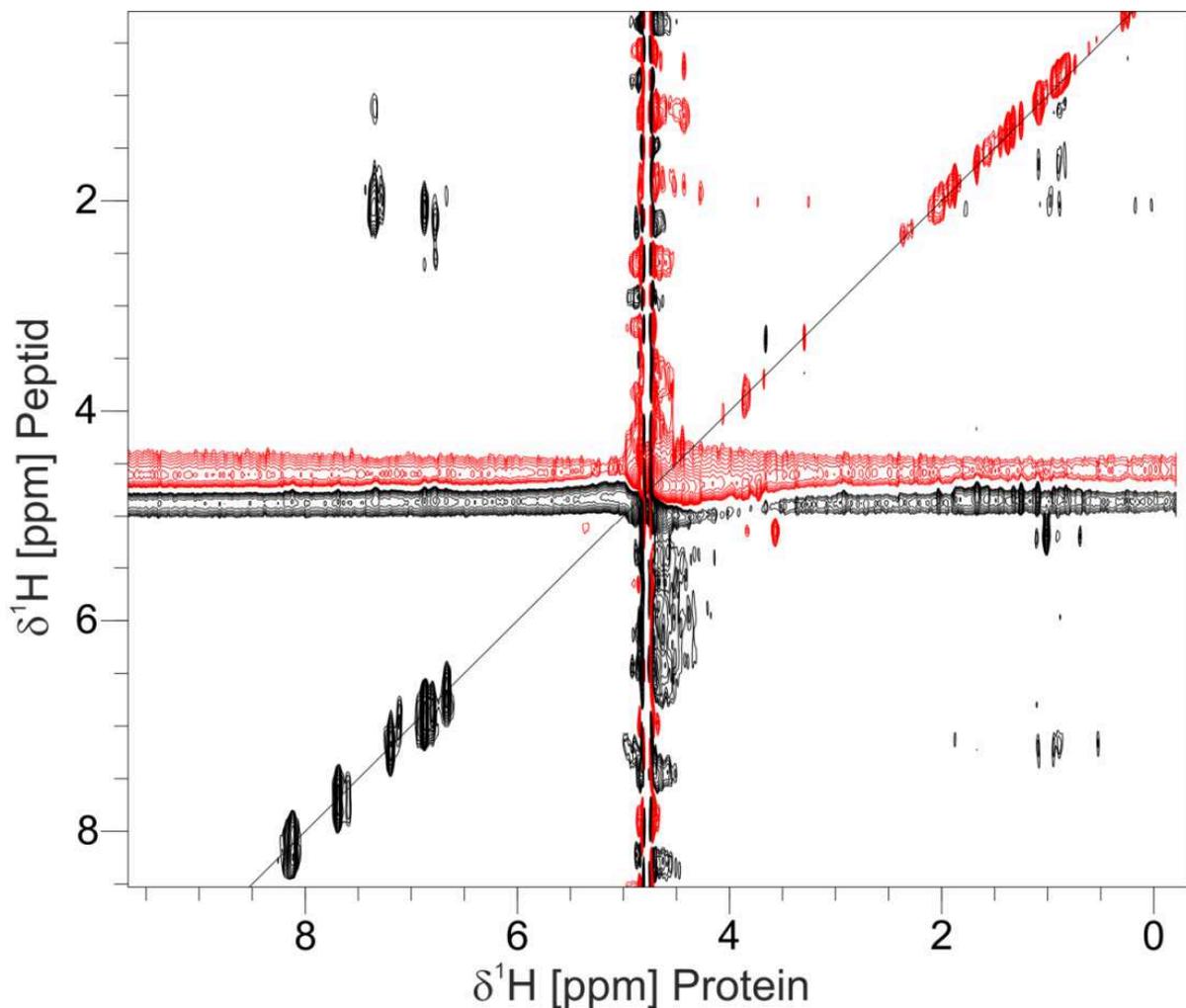


Abbildung 54. 2D HSQC-NOESY über  $^{13}\text{C}$ -markierte Kohlenstoffe zeigt eine geringe Anzahl an NOEs. Das Spektrum zeigt NOEs zwischen  $[U\text{-}^{13}\text{C}/^{15}\text{N}]$ -Bin1 Tandem-SH3 und NS5A(341-361), dabei sind Protonen des Proteins auf der horizontalen Achse mit denen des Peptides auf der vertikalen Achse korreliert.

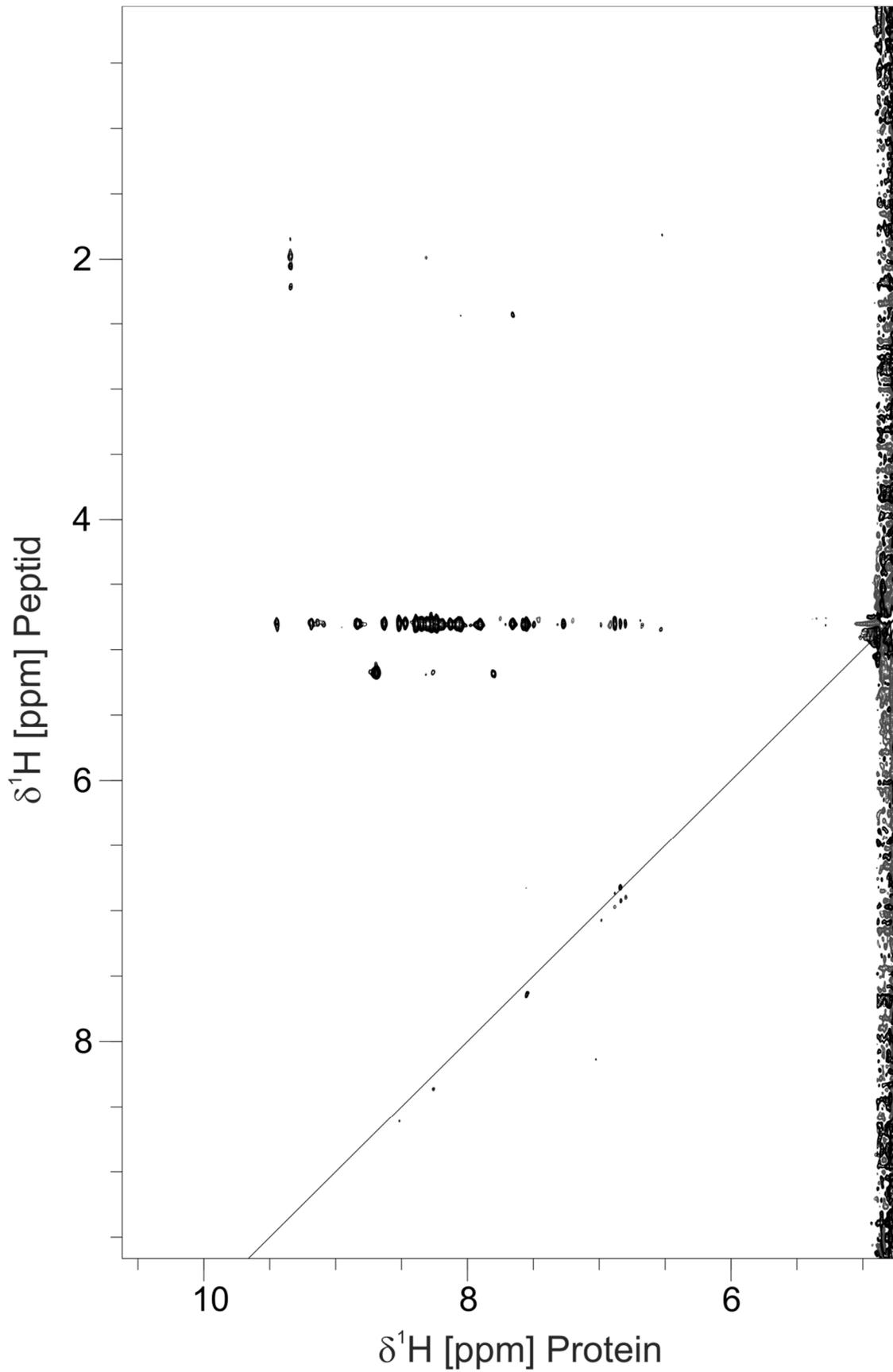


Abbildung 55. 2D HSQC-NOESY über  $^{15}\text{N}$ -markierte Stickstoffe zeigt eine geringe Anzahl an NOEs. Das Spektrum zeigt NOEs zwischen  $[U\text{-}^{13}\text{C}/^{15}\text{N}]$ -Bin1 Tandem-SH3 und NS5A(341-361), dabei sind Protonen des Proteins auf der horizontalen Achse mit denen des Peptides auf der vertikalen Achse korreliert.

Tabelle 28. Mögliche intermolekulare Zuordnungen der NOEs in den gefilterten NOESY-Spektren. Die erste Tabelle umfasst NOEs von Bin1 Tandem-SH3 zu NS5A(341-361) im 2D [ $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ]-NOESY-, die zweite die im 2D [ $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ ]-NOESY-Spektrum mit jeweils 0,025 ppm Abweichung. Aminosäuren mit Sternchen wurden nicht in den dreidimensionalen Spektren wiedergefunden und sind damit nicht eindeutig.

Bin1 Tandem-SH3	NS5A(341-361)
D530/D530' H	P343 H <sup>va</sup> , P346 H <sup>va</sup> , P353 H <sup>va</sup> , P353 H <sup>vb</sup> , P354 H <sup>va</sup> , P355 H <sup>vb</sup>
D530/D530' H	P346 H <sup>vb</sup> , P353 H <sup>βa</sup> , P355 H <sup>βa</sup>
D535/D535' H	L344 H <sup>oa</sup> , P350 H <sup>va</sup> , I352 H <sup>o1</sup> , I352 H <sup>v2</sup> , V361 H <sup>va</sup>
Q540/Q540' H <sup>ε2b</sup>	K648 H <sup>βa</sup> , K348 H <sup>oa</sup> , P351 H <sup>βa</sup> , I352 H <sup>β</sup> , K358 H <sup>βa</sup> , K358 H <sup>βb</sup> , R359 H <sup>βa</sup>
G561/G561' H	P343 H <sup>va</sup> , P343 H <sup>vb</sup> , P345 H <sup>βb</sup> , P346 H <sup>va</sup> , P355 H <sup>vb</sup>
W562/W562' H	P343 H <sup>vb</sup> , P345 H <sup>βb</sup> , P346 H <sup>va</sup> , P355 H <sup>βa</sup>
W562/W562' H	P346 H <sup>vb</sup> , P353 H <sup>βa</sup> , P355 H <sup>βa</sup> , V361 H <sup>β</sup>
W562/W562' H <sup>ε1</sup>	L344 H <sup>βa</sup> , K348 H <sup>βb</sup> , P354 H <sup>va</sup> , R357 H <sup>βa</sup> , R359 H <sup>βb</sup>
W562/W562' H <sup>ε1</sup>	P343 H <sup>vb</sup> , P345 H <sup>βb</sup> , P346 H <sup>va</sup> , P355 H <sup>vb</sup>
W562/W562' H <sup>ε1</sup>	P345 H <sup>βb</sup> , P346 H <sup>vb</sup> , P353 H <sup>βa</sup> , P355 H <sup>βa</sup>
W562/W562' H <sup>ε1</sup>	P354 H <sup>vb</sup> , P355 H <sup>βb</sup> , R357 H <sup>oa</sup>
W562/W562' H <sup>ε1</sup>	G341 H <sup>ob</sup> , S342 H <sup>a</sup>
W562/W562' H <sup>ε1</sup>	T347 H <sup>a</sup> , K348 H <sup>a</sup> , T360 H <sup>β</sup>
R581/R581' H	P345 H <sup>oa</sup> , P353 H <sup>βb</sup> , R357 H <sup>ob</sup>
G582/G582' H	P346 H <sup>a</sup> , P351 H <sup>a</sup> , I352 H <sup>a</sup>
N587/N587' H <sup>o2a</sup>	L344 H <sup>βa</sup> , K348 H <sup>βb</sup> , R356 H <sup>βa</sup> , R357 H <sup>βa</sup> , R359 H <sup>βb</sup>
N587/N587' H <sup>o2b</sup>	L344 H <sup>βa</sup> , K348 H <sup>βb</sup> , R356 H <sup>βa</sup> , R357 H <sup>βa</sup> , R359 H <sup>βb</sup>

Bin1 Tandem-SH3	NS5A(341-361)
Y531/Y531' H <sup>ε</sup>	P343 H <sup>βa</sup> , P350 H <sup>βb</sup> , P354 H <sup>vb</sup> , P355 H <sup>βb</sup> , R357 H <sup>oa</sup>
Y531/Y531' H <sup>ε</sup>	P345 H <sup>oa</sup> , R357 H <sup>ob</sup>
G561/G561' H <sup>ob</sup>	P343 H <sup>va</sup> , P346 H <sup>va</sup> , P353 H <sup>va</sup> , P354 H <sup>va</sup> , P355 H <sup>vb</sup>
W562/W562' H <sup>o1</sup>	P343 H <sup>vb</sup> , P345 H <sup>βb</sup> , P346 H <sup>vb</sup> , P353 H <sup>βa</sup> , P355 H <sup>βa</sup> , V361 H <sup>β</sup>
W562/W562' H <sup>η2</sup>	P343 H <sup>vb</sup> , P345 H <sup>βb</sup> , P346 H <sup>vb</sup> , P353 H <sup>βa</sup> , P355 H <sup>βa</sup> , V361 H <sup>β</sup>
W562/W562' H <sup>ζ3</sup>	P343 H <sup>va</sup> , P346 H <sup>va</sup> , P355 H <sup>vb</sup>
W562/W562' H <sup>ζ3</sup>	K348 H <sup>βb</sup> , P353 H <sup>va</sup> , P354 H <sup>va</sup> , R357 H <sup>βa</sup> , R359 H <sup>βb</sup>
W562/W562' H <sup>ζ3</sup>	P343 H <sup>βa</sup> , P345 H <sup>βa</sup> , T347 H <sup>v2</sup> , P355 H <sup>va</sup> , T360 H <sup>v2</sup>
V583/V583' H <sup>va</sup>	P343 H <sup>vb</sup> , P345 H <sup>βb</sup> , P346 H <sup>vb</sup> , P353 H <sup>βa</sup> , P355 H <sup>βa</sup> , V361 H <sup>β</sup>
V583/V583' H <sup>va</sup>	K348 H <sup>oa</sup> , R356 H <sup>va</sup> , K358 H <sup>oa</sup>
V583/V583' H <sup>vb</sup>	P343 H <sup>vb</sup> , P345 H <sup>βb</sup> , P346 H <sup>vb</sup> , P353 H <sup>βa</sup> , P355 H <sup>βa</sup> , V361 H <sup>β</sup>
V583/V583' H <sup>vb</sup>	K348 H <sup>oa</sup> , R356 H <sup>va</sup> , K358 H <sup>oa</sup>
P585/P585' H <sup>a</sup>	P343 H <sup>vb</sup> , P345 H <sup>βb</sup> , P346 H <sup>vb</sup> , P353 H <sup>βa</sup> , P355 H <sup>βa</sup>
P585/P585' H <sup>βa</sup>	P343 H <sup>vb</sup> , P345 H <sup>βb</sup> , P346 H <sup>vb</sup> , P353 H <sup>βa</sup> , P355 H <sup>βa</sup> , V361 H <sup>β</sup>
P585/P585' H <sup>βb</sup>	P343 H <sup>vb</sup> , P345 H <sup>βb</sup> , P346 H <sup>vb</sup> , P353 H <sup>βa</sup> , P355 H <sup>βa</sup> , V361 H <sup>β</sup>
P585/P585' H <sup>va</sup>	P343 H <sup>vb</sup> , P345 H <sup>βb</sup> , P346 H <sup>vb</sup> , P353 H <sup>βa</sup> , P355 H <sup>βa</sup> , V361 H <sup>β</sup>
P585/P585' H <sup>vb</sup>	P343 H <sup>vb</sup> , P345 H <sup>βb</sup> , P346 H <sup>vb</sup> , P353 H <sup>βa</sup> , P355 H <sup>βa</sup>
F588/F588' H <sup>o</sup>	P343 H <sup>vb</sup> , P345 H <sup>βa</sup> , P355 H <sup>va</sup> , T360 H <sup>v2</sup>
F588/F588' H <sup>o</sup>	P343 H <sup>vb</sup> , P345 H <sup>βb</sup> , P353 H <sup>βa</sup> , P355 H <sup>βa</sup>
F588/F588' H <sup>o</sup>	A549 H <sup>β</sup> , P351 H <sup>va</sup> , R357 H <sup>va</sup> , K358 H <sup>va</sup>
F588/F588' H <sup>ε</sup>	L344 H <sup>βa</sup> , K348 H <sup>βb</sup> , R357 H <sup>βa</sup> , R359 H <sup>βb</sup>
F588/F588' H <sup>ζ</sup>	T347 H <sup>a</sup> , R356 H <sup>a</sup> , K358 H <sup>a</sup> , T360 H <sup>β</sup>
T532/T532' H <sup>v2</sup> / V583/V583' H <sup>vb</sup> *	R357 H <sup>η</sup>
T532/T532' H <sup>β</sup> / G561/G561' H <sup>oa</sup> *	P343 H <sup>vb</sup> , P345 H <sup>βb</sup> , P346 H <sup>vb</sup> , P353 H <sup>βa</sup> , P355 H <sup>βa</sup>
T534/T534' H <sup>a</sup> / T536/T536' H <sup>β</sup> *	P345 H <sup>βa</sup> , T347 H <sup>v2</sup> , P355 H <sup>va</sup> , T360 H <sup>v2</sup>
V583/V583' H <sup>va</sup> *	R357 H <sup>η</sup>
V583/V583' H <sup>va</sup> *	R359 H <sup>η</sup>
V583/V583' H <sup>vb</sup> / T532/T532' H <sup>v2</sup> *	R357 H <sup>η</sup>
H529' H <sup>ε1</sup> *	G341 H <sup>oa</sup> , P343 H <sup>ob</sup> , P346 H <sup>ob</sup> , P351 H <sup>ob</sup> , P354 H <sup>oa</sup>
H529' H <sup>ε1</sup> *	P343 H <sup>va</sup> , P346 H <sup>va</sup> , P353 H <sup>va</sup> , P354 H <sup>va</sup> , P355 H <sup>vb</sup>
H529/H529' H <sup>o2</sup> *	L344 H <sup>oa</sup> , P350 H <sup>va</sup> , I352 H <sup>o1</sup> , V361 H <sup>va</sup>
H529/H529' H <sup>o2</sup> *	P345 H <sup>βa</sup> , P355 H <sup>va</sup> , T360 H <sup>v2</sup>

#### 4.5.4. Strukturrechnung

Das Programm, das zur Strukturrechnung benutzt wurde, ARIA2, verwendet Daten wie Spektren, Torsionswinkel und ein- und mehrdeutigen NOE-Listen. Da auch hier das Problem bestand, dass die beiden Domänen des Bin1 Tandem-SH3 äquivalent waren, konnten keine Spektren importiert werden, weil damit lediglich eine Domäne berechnet wurde und die zweite Domäne im expandierten Ausgangszustand verblieb. Deshalb wurden Torsionswinkel aus TALOS-N generiert und mit CcpNmr analysis erzeugte NOE-Restraints importiert. Die Restraints wurden für Bin1 Tandem-SH3 separat für die N- und C-terminale SH3-Domäne aus den drei jeweiligen NOESY-Spektren erzeugt und die Listen zusammengeführt.

Dieses Verfahren wurde auch auf Seiten des gebundenen Bin1 Tandem-SH3 wiederholt. Zuerst erfolgte die Strukturrechnung des Proteins ohne Betrachtung des Liganden in gleicher Weise wie bei der apo-Form. Eine Zusammenfassung der in der Strukturrechnung genutzten Parameter aus Torsionswinkeleinschränkungen und Protonen-Protonen-Abständen ist in Tabelle 29 gezeigt. Dabei ist zubeachten, dass viele Einschränkungen durch die Übereinstimmungen der Torsionswinkel und chemischen Verschiebungen der N- und C-terminalen Domäne doppelt gezählt wurden. Auffällig ist, dass die Anzahl der NOEs des aliphatischen 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ] HSQC-NOESY- und des 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] NOESY-HSQC-Spektrums der holo-Form geringer war als die Anzahl der NOEs beider Spektren der apo-Form, obwohl sowohl die Anzahl der Transienten jedes Spektrums als auch die Anzahl der NOEs des aromatischen 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ] HSQC-NOESY-Spektrums gleich blieb. Damit blieb der hydrophobe Kern der SH3-Domäne durch die Interaktion gut definiert, während sich NOEs der Protonen im äußeren Bereich der Domänen durch Dynamik verbreiterten und teilweise nicht mehr detektiert wurden.

Tabelle 29. Zur Strukturrechnung einbezogene Torsionswinkel- und Distanzeinschränkungen. Für die beiden Proteine Bin1 Tandem-SH3 und den Komplex ohne Ligand wurden folgende Torsionswinkel- und Distanzeinschränkungen (Summe, Anzahl aus Aromaten-C-NOESY, N-NOESY und Aliphaten-C-NOESY) benutzt.

<b>Strukturrechnung</b>	<b>Torsionswinkel- einschränkungen</b>	<b>Distanzeinschränkungen</b>
Bin1 Tandem-SH3	260	12375 (976+2804+8595)
Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361)	280	9276 (954+2256+6066)

Die in der Strukturrechnung eingesetzten Distanzeinschränkungen werden klassifiziert in eindeutig und uneindeutig. Die eindeutigen werden weiter unterteilt in intraresiduale NOEs, sequenzielle NOEs<sub>i, i±1</sub>, kurzreichweitige NOEs<sub>i, i2-3</sub>, mittellangreichweitige NOEs<sub>i, i4-5</sub> und langreichweitige NOEs<sub>i, i>5</sub>. Die nachfolgende Tabelle veranschaulicht die klassifizierten NOEs der Strukturen von Bin1 Tandem-SH3 in apo- und holo-Zustand. Besonders aussagekräftig sind langreichweitige NOEs, da sie die Proteinstrukturen in der Strukturrechnung zur endgültigen Form kondensierten. Anhand der nachfolgenden Tabelle kann festgestellt werden, dass in den beiden Strukturrechnungen von Bin1 Tandem-SH3 gerade diese einen hohen Prozentsatz aller NOEs von 36,8 % in der apo-Form und 29,3 % in der holo-Form ausmachten.

Tabelle 30. Klassifizierung der NOEs, die für die Strukturrechnungen von Bin1 Tandem-SH3 in apo- und holo-Zustand ohne Ligand verwendet wurden.

Rechnung	apo Bin1 Tandem-SH3	holo Bin1 Tandem-SH3
<b>Eindeutige NOEs</b>	8380	4986
<b>Intraresiduale NOEs</b>	1965	1843
<b>Sequenzielle NOEs</b>	1751	992
<b>Kurzreichweitige NOEs</b>	1199	529
<b>Mittellangreichweitige NOEs</b>	380	163
<b>Langreichweitige NOEs</b>	3085	1459
<b>Uneindeutige NOEs</b>	1313	703

Die zehn niederenergetischsten Proteinstrukturen wurden mit Theseus jeweils für die N- und separat für die C-terminale Domäne überlagert und Sekundärstrukturelemente wurden mit dem KSDSSP-Algorithmus bestimmt. Die Strukturensamples in Abbildung 56 wurden somit zweimal, für die N- und C-terminale Domäne getrennt, dargestellt. Die beiden Abbildungen zeigen, dass während die einzelne SH3-Domäne strukturell übereinstimmte durch den Linker eine sehr große Flexibilität erzeugt wurde, die zu einer asymmetrischen Orientierung beider SH3-Domänen führte.

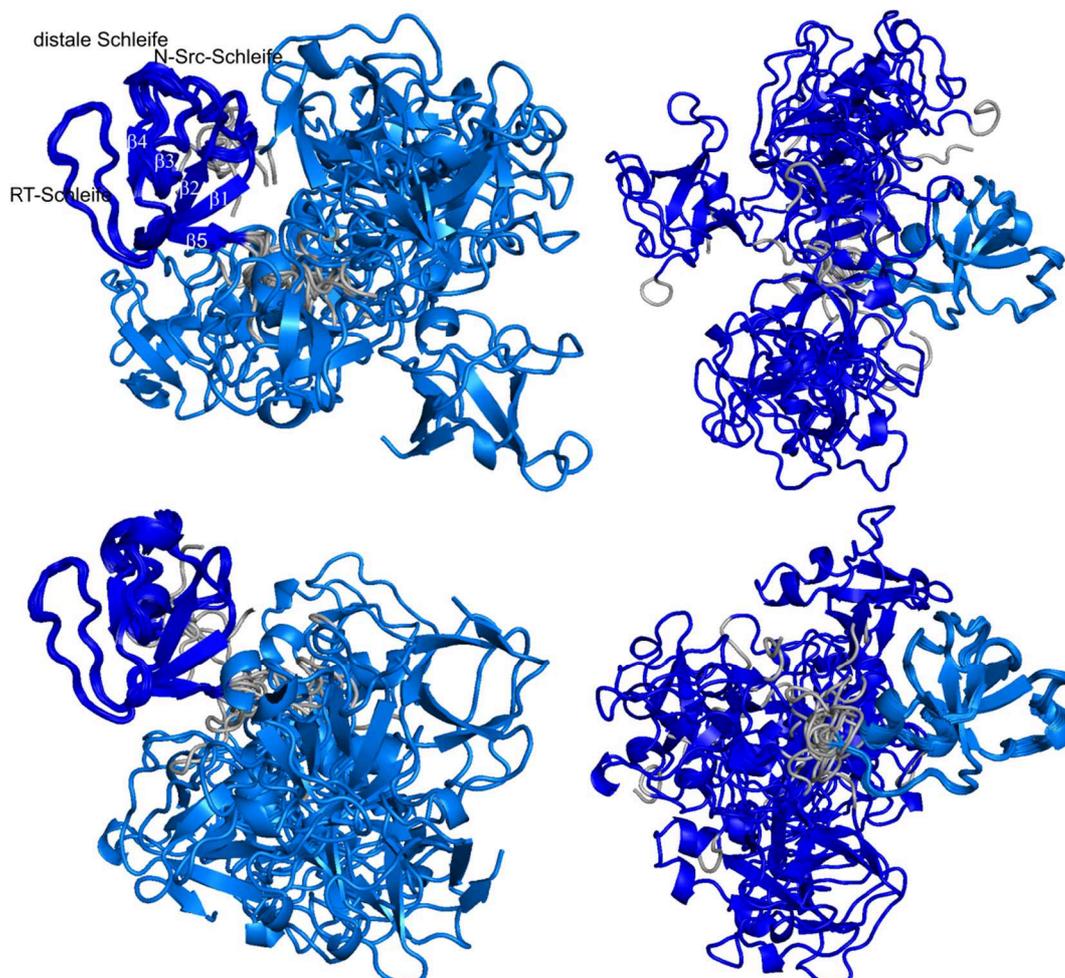


Abbildung 56. Strukturensample für Bin1 Tandem-SH3 in der apo- und holo-Form. Das linke Ensemble gibt die Überlagerung der zehn niederenergetischsten Strukturen der N-terminalen Domäne (dunkelblau) und das rechte die der C-terminalen Domänen (hellblau) wieder. Der Linker ist grau markiert. Oben ist Bin1 Tandem-SH3 der apo- und unten der holo-Form

Wie bei der Röntgenstrukturanalyse bestanden die SH3-Domänen aus 70 Aminosäuren und bildeten die zuvor beschriebenen fünf  $\beta$ -Stränge im „ $\beta$ -barrel“ aus. Die drei Aminosäurereste N-terminal des  $\beta$ -Stranges 3 bildeten eine  $3_{10}$ -Helix, eine Helix folgte nach  $\beta$ -Strang 3 aus vier Aminosäureresten und ebenso eine  $3_{10}$ -Helix. Damit unterschieden sich die Sekundärstrukturelemente zwischen der Bestimmung mit TALOS-N und der Strukturrechnung. In TALOS-N wurden zwei weitere anti-parallele  $\beta$ -Stränge in der RT-Schleife bestimmt, die nicht in den Strukturensambles nach KSDSSP auftraten.

Zur Strukturrechnung des Komplexes Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361) mit einbezogenem Liganden wurden zunächst eindeutige intermolekulare NOEs zwischen der N-terminalen oder C-terminalen SH3-Domäne von Bin1 Tandem-SH3 und dem Peptid gesucht. Jedoch konnte keine eindeutige Zuordnung gefunden werden. Es war keine anfängliche Zuordnung gegeben und alle möglichen NOEs zum Peptid bzw. zum Protein wurden anhand der Abweichung der chemischen Verschiebung von 0,25 ppm eingeladen. Das führte zu keinem Ergebnis. Der Ligand befand sich in allen möglichen Konformationen an Oberflächen des Proteins. Jedoch konnte kein einheitliches Komplexensemble generiert werden. Es wurde außerdem versucht, zunächst den Liganden an eine der beiden SH3-Domänen zu fixieren. Da eine zweideutige Zuordnung auf Seiten des Proteins vorhanden war, wurde diese anschließend ohne Zuordnung auf Seiten des Peptides molekulardynamisch gerechnet und validiert. Die Rechnungen wiederholten sich durch die Austauschbarkeit der beiden Zuordnungen der SH3-Domänen in Bin1 Tandem-SH3, darum wurde die Zuordnung invertiert. Beide Arten der molekulardynamischen Rechnung führten zu Ensembles, die den Liganden auch innerhalb des hydrophoben Kerns einer SH3-Domäne zeigten und damit einer erfolgreichen Strukturrechnung widersprachen. Außerdem wurden dann solche Aminosäuren, die nicht von der einen SH3-Domäne gebunden wurden, der jeweils anderen SH3-Domäne zugeschrieben. Hier wurden sämtliche Orientierungen des Liganden zwischen den beiden SH3-Domänen erhalten. Sowohl Spektren als auch Listen mit möglicher Zuordnung bzw. mit Abweichungen der chemischen Verschiebung wurden benutzt. Zwischen all diesen Herangehensweisen wurde jedoch kein Unterschied festgestellt, stets bildeten sich divergierende Strukturensambles aus. Außerdem wurden Rechnungen durchgeführt, die auf Grundlage von veröffentlichten Interaktionsstudien, die Positionierung des Liganden auf einer SH3-Domäne erlaubten. Jedoch führte keine Strukturrechnung zu einer eindeutigen Orientierung des Liganden auf beiden SH3-Domänen. Dabei wurden von den insgesamt 50.000 gerechneten Komplexstrukturen sämtliche Orientierung der beiden SH3-Domänen des Proteins, des Liganden auf einer oder auf beiden SH3-Domänen an sämtlichen Positionen an der Proteinoberflächen oder interkalierend erhalten. Es wurden auch Komplexstrukturen erzeugt zu Proteinoberflächen, die laut NMR-Titration und NOEs nicht an der Interaktion teilnehmen sollten.

## 5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Interaktion von HCV NS5A-Fragmenten an das humane Protein Bin1 SH3 charakterisiert. Von zentraler Bedeutung war das artifizielle Konstrukt des Bin1 SH3, das aus zwei sequenzgleichen SH3-Domänen sowie einem Linker bestand, Bin1 Tandem-SH3. Dieses Konstrukt sollte die *in vivo* Bildung eines Bin1-Homodimers mimetisch *in vitro* widerspiegeln. Zur Charakterisierung wurden unterschiedliche biophysikalische Methoden angewandt, die die Bindeeigenschaften der NS5A-Konstrukte an Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3 analysieren sollten. Darunter fielen Messungen der Bindeaffinität und -dynamik mit SPR, BLI, ITC und NMR. Ein Vergleich der NS5A-Konstrukte zur Kartierung der Bindestellen in der polyprolinreichen Sequenz des NS5A wurde angestrebt. Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war die Erörterung, welches der untersuchten NS5A-Konstrukte einen Bin1 Tandem-SH3:NS5A-Komplex generierte, der strukturell stabil und homogen war. Dieser Komplex sollte mit Röntgenstrukturanalyse in seiner dreidimensionalen Struktur aufgeklärt werden, um das NS5A-Fragment an den beiden SH3-Domänen des Bin1 Tandem-SH3 zu positionieren. Zusätzlich sollten NMR-Experimente vom Komplex aufgenommen werden, die zur Zuordnung des apo- und holo-Zustandes von Bin1 Tandem-SH3, sowie des NS5A-Konstruktes, und anschließender Strukturaufklärung führten.

### 5.1. Rekombinante Proteinexpression und Reinigung

#### 5.1.1. Expression und Reinigung von SH3-Domänen liefert ausreichende Menge Protein

Die humanen Proteine Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3 wurden in Expressionsvektoren zur Transformation von *E. coli* verwandt. Beide Proteine wurden unter Verwendung standardisierter Expressions- und Reinigungsprotokolle für GST-Fusionsproteine, s. Kapitel 3.3.4, gereinigt (Schmidt *et al.* 2007). Dabei war die Expression und Reinigung für Bin1 SH3 bereits etabliert und wurde für Bin1 Tandem-SH3 weiter optimiert. Für biophysikalische Experimente, die keine Isotopenmarkierung benötigten, wurden die Proteine in LB-Medium exprimiert. Für NMR-Experimente wurden die Proteine hingegen in Minimalmedium exprimiert, dem je nach Experimenttyp <sup>15</sup>N-Ammoniumchlorid und/oder <sup>13</sup>C-Glukose zugesetzt wurde. Während der Reinigung wurde der N-terminale GST-Tag des GST-Fusionsproteins mit PreScission-Protease hydrolysiert. Nach abschließender Größenausschlusschromatographie wurden beide Proteine sowohl aus LB-Medium als auch aus Minimalmedium rein und im 10 mg/l Maßstab erhalten, s. Kapitel 4.1.1. Bin1 Tandem-SH3 konnte ohne Präzipitation bis zu einer Konzentration von 6 mM mit Ultrazentrifugation konzentriert werden. Diese Konzentration wurde zur Durchführung von Kristallisationsstudien benötigt.

### 5.1.2. Erfolgreiche Expression und Reinigung von NS5A-Konstrukten

Fünf Fragmente des viralen Proteins NS5A wurden in dieser Arbeit verwendet. Davon waren zwei synthetische Peptide, NS5A(347-361) und NS5A(341-361), die als lyophilisierte Peptide vorlagen und die keine weiteren Reinigungsschritte benötigten, s. Kapitel 2.6. Die anderen drei Konstrukte NS5A(333-369), NS5A(191-340) und NS5A(191-447) wurden bereits im „Institute of Complex Systems“ oder am „Institute de Biologie Structurale“ in Grenoble verwendet und ihre Expressions- und Reinigungsprotokolle wurden übernommen.

NS5A(333-369) wurde als His<sub>10</sub>-Ubiquitin-Konstrukt in *E. coli* exprimiert und mit IMAC und Größenausschlusschromatographie gereinigt (Glück *et al.* 2011). Davon wurden einige mg pro Liter Expressionskultur erhalten, s. Kapitel 3.3.5 und 4.1.2.

Das GST-Fusionsprotein NS5A(191-340) wurde nach vorhandenem Protokoll als [<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N]-isotopenmarkiertes Protein exprimiert und nativ unter Hydrolyse des N-terminalen GST-Tags durch PreScission-Protease gereinigt (Schwarten *et al.* 2013), s. Kapitel 3.3.6. Da NS5A RNA bindet (Huang *et al.* 2005), wurde dem Lyse-Puffer RNase beigefügt. Eine abschließende Größenausschlusschromatographie wurde benötigt, um nieder- und höhermolekulare Verunreinigungen abzutrennen. Das Protein konnte bis zu 200 µM per Ultrafiltration konzentriert werden und die Ausbeute betrug 1 mg pro 1 l Expressionskultur, s. Kapitel 4.1.3.

NS5A(191-447) war als His<sub>6</sub>-Konstrukt kloniert und wurde in LB-Medium exprimiert und denaturierend mit einer IMAC gereinigt, s. Kapitel 3.3.7. Der His-Tag konnte mit TEV-Protease hydrolytisch gespalten werden. Sämtlichen Puffern wurden nach der denaturierenden Reinigung zusätzlich Proteaseinhibitoren und RNase beigesetzt. Dies erfolgte zum einen durch die Exposition möglicher Proteolysestellen im IDP, als auch durch die RNA-bindenden Eigenschaften von NS5A (Huang *et al.* 2005). Nach abschließender Größenausschlusschromatographie und Ultrafiltration konnte NS5A(191-447) mit einer Konzentration von bis zu 120 µM und einer Ausbeute von 1 mg/l Expressionskultur erhalten werden, s. Kapitel 4.1.4. Damit verhält sich dieses Protein wie bei Reinigungen im „Institute de Biologie Structurale“ in Grenoble (M. Schwarten, persönliche Kommunikation).

## 5.2. Interaktionsstudien

### 5.2.1. Bindemodi der Bin1 (Tandem-)SH3-Proteine

Zunächst soll die Bindung mit immobilisierenden Methoden analysiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl SPR- als auch BLI-Messungen durchgeführt. Bei beiden Methoden wurden die Konstrukte Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3 mit dem Liganden NS5A(333-369) eingesetzt, s. Kapitel 3.6 und 3.7. Nach erfolgreicher Immobilisierung des Liganden His-Ubiquitin-NS5A(333-369) an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sensoren (Nieba *et al.* 1997) wurden die Bindungskurven global-kinetisch und nach der Gleichgewichtsmethode ausgewertet, s. Kapitel 4.2.1 und 4.2.2. In Kontrollexperimenten konnte gezeigt werden, dass Bin1 SH3 nicht

an Bin1 SH3 bindet, es zeigte sich keine SPR-Antwort (Andresen *et al.* 2012). Eine Zusammenfassung der Bindungsstudien mit immobilisierten Liganden ist in der nachfolgenden Tabelle 31 gezeigt. Die durchgeführten Bindungsstudien und die verschiedenen Analysemethoden zeigen ein eindeutiges und übereinstimmendes Verhalten beider Analyten an.

Tabelle 31. Zusammenfassung der SPR und BLI-Messungen von Bin1 (Tandem-)SH3.

Bin1-Protein	Temperatur [°C]	Methode	$K_D$ [nM]	$k_a$ [1/Ms]	$k_{a2}$	$k_d$ [1/s]	$k_{d1}$ [1/s]	$R_{max1}$
<b>SH3</b>	25	SPR	535	12,3e5	37 1/Ms	0,654	3,3e-4	34
		SPR	498					36
	30	BLI	376	4,3e5	76,4 1/Ms	0,16	3,6e-3	0,3
		BLI	170					0,2
<b>Tandem-SH3</b>	25	SPR	18	10,4e5	1,6e-2 1/RUs	0,02	0,02	37
		SPR	34					67
	30	BLI	10	0,6e5	9,8e-5 1/δnms	6,2e-4	0,01	0,37
		BLI	95					0,36

Anhand der durchgeführten Interaktionsstudien wurden folgende Bindemodelle vorgeschlagen: Bin1 SH3 wurde bei niedrigen Konzentrationen gut mit dem 1:1-Bindemodell beschrieben, sodass dies für eine einzige Assoziation des Bin1 SH3 an den Liganden NS5A(333-369) sprach. Jedoch trat neben der schnellen Assoziation eine weitere langsamere Assoziation besonders bei höheren Konzentrationen auf, die für eine weitere Assoziation des Analyten stand. Das heterogene Analyt-Bindemodell unter Verwendung zweier konkurrierender SH3-Domänen war deswegen am besten zur Beschreibung des Bin1 SH3-Kinetik geeignet. Die Dissoziationskonstanten aus SPR- und BLI-Messungen nach kinetischer Auswertung betragen für Bin1 SH3 nach dem heterogenen Analyt-Bindemodell  $K_{D(SPR)}=535$  nM bzw.  $K_{D(BLI)}=376$  nM. Eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen SPR und BLI-Dissoziationskonstante von 70 % ist, dass bei SPR-Experimenten die Bindekinetik, besonders wenn die intrinsische Reaktionsrate größer als  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  ist, vom Massentransport der Analyten auf die hydratisierte Matrix mit dem Liganden und der Diffusion des Analyten innerhalb der Phase bestimmt wird. Deshalb werden die richtigen kinetischen Parameter durch SPR auch um einige Größenordnungen unterschätzt (Schuck *et al.* 1996). Von Feuerstein wurde die Dissoziationskonstante von Bin1 SH3 und NS5A(333-369) auch aus SPR-Experimenten mit  $K_D=0,1 \mu\text{M}$  bestimmt (Feuerstein *et al.* 2012b). Geringe Differenzen dieses heterogenen Analyt-Modells mit den experimentellen Daten können anhand einer Konformationsänderung beschrieben werden, die zu keiner weiteren Zunahme der Masse an der Matrix führte. Diese Konformationsänderung des 1:1-Komplexes der SH3-Domäne an den drei PxxP-Motiven war verbunden mit einer langsamer Assoziation, hohen Dissoziationskonstanten und hohen Bindekapazitäten, welche in den durchgeführten SPR-/BLI-Messungen nicht erreicht wurden. Es entstand folglich ein 2:1-Bin1 SH3:NS5A(333-369)-Komplex, s. Abbildung 57. Dies spiegelte sich in nicht nur in den SPR- und BLI-Messungen, sondern auch in den ITC- und NMR-Messungen, wider. Da jedoch ITC- und NMR-Messungen bei Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt wurden und die Konzentrationen bei diesen Messungen um etwa das 10fache erhöht waren, wurden die

Kinetiken bei diesen Messungen nicht erfasst. Bei ITC-Messungen wurde stets die Stöchiometrie  $N=2$  aus dem molaren Verhältnis Bin1 SH3:NS5A erhalten.

Die Auswertung für Bin1 Tandem-SH3 mit seinen beiden SH3-Domänen beruht auf den Beobachtungen des NMR-Strukturparameters und der molekulardynamischen Strukturrechnungen, die belegten, dass beide SH3-Domänen äquivalent sind und somit unabhängig Liganden binden. In den SPR- und BLI-Messungen wurde analog zu Bin1 SH3 zunächst eine einfache Assoziation einer SH3-Domäne an den Liganden erfasst, die zu einer linearen Zunahme der Schichtdicke bzw. Masse bei niedrigen Konzentrationen führte. Anschließend wurde eine veränderte Bindekinetik beobachtet, die sich durch eine verlangsamte Assoziation äußerte. Dabei konnten die beiden äquivalenten Bindestellen des Bin1 Tandem-SH3 gleichzeitig an Liganden binden. Nach der einfachen Sättigung des Liganden an der Bindestelle mit der höchsten Affinität, erfolgte die Bindung niederaffiner Bindestellen. Diese Assoziation konnte mit dem bivalenten Analyt-Bindemodell am geeignetsten beschrieben werden, da die beiden SH3-Domänen laut NMR-Titration identische Bindestellen haben, die zu einer Komplexstabilisierung führten. Nach dem bivalenten Analyt-Bindemodell wurde Bin1 Tandem-SH3 ausgewertet und Dissoziationskonstanten von  $K_{D1(\text{SPR})}=18 \text{ nM}$  bzw.  $K_{D1(\text{BLI})}=10 \text{ nM}$  erhalten. Folglich trat nach der ersten Assoziation eine Umorganisation des Komplexes durch Verschiebung der SH3-Domäne auf den drei PxxP-Motiven auf, gefolgt mit einer weiteren Assoziation der benachbarten SH3-Domäne an den gleichen Liganden. Dieses Komplexverhalten trat auch bei ITC-Messungen auf, da für jedes NS5A-Konstrukt die Stöchiometrie  $N=1$  erhalten wurde. Damit erhöhte sich die Affinität nicht linear mit einer weiteren SH3-Domäne zwischen Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3.

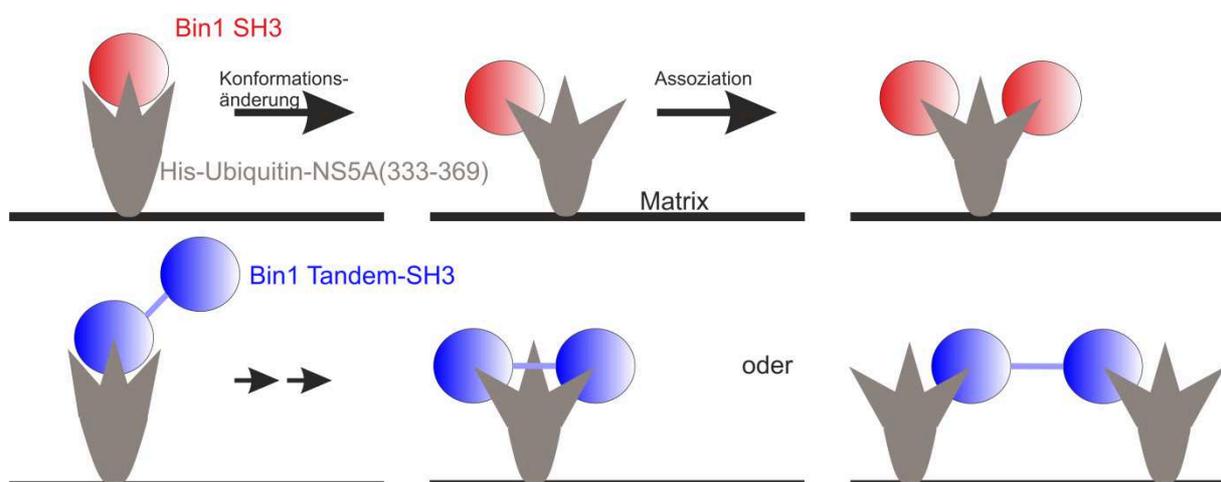


Abbildung 57. Bindung von Bin1 (Tandem-)SH3 an His-Ubiquitin-NS5A(333-369).

Bei Bin1 SH3 erfolgt eine einfache Bindung eines Bin1 SH3 an den Liganden an das hochaffine PxxP-Motiv. Es erfolgt eine Umorganisation des Komplexes, indem sich die SH3-Domäne auf den drei PxxP-Motiven verschiebt. Danach wird eine weitere Assoziation eines Bin1 SH3 ermöglicht. Bei Bin1 Tandem-SH3 assoziiert zunächst eine Domäne an den Liganden, nach Konformationsänderung wird entweder die benachbarte Domäne an den gleichen oder an einen nahegelegenen Liganden assoziiert.

### 5.2.1.1. Proteinkomplexe bei hohen lokalen Konzentrationen

SPR und BLI-Messungen zeigten, dass besonders bei hohen lokalen Konzentrationen der beiden Interaktionspartner die langsamen zweiten Assoziationen hervortraten. Bin1 Tandem-SH3 war, bedingt durch die beiden verlinkten SH3-Domänen, in der Lage, mehrere NS5A-Liganden oder Ligandenpositionen zu binden. In der SPR korreliert die Geräteantwort mit der Masse der gekoppelten Liganden bzw. Analyten. Da aus den kinetischen Auswertungen die gleiche maximale Bindekapazität für Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3 erhalten wurde, spricht dies ebenfalls für eine 2:1-Komplexierung des Bin1 SH3 und für einen 1:1-Komplex im Fall des Bin1 Tandem-SH3. In BLI-Messungen, deren Antwort von der Schichtdicke abhängig ist, wurde für beide Bin1-Proteine in den Gleichgewichtsanalysen ähnliche Bindekapazitäten erhalten. Das spricht zusätzlich dafür, dass Bin1 Tandem-SH3 mit beiden Domänen zwei nahe-gelegene PxxP-Motive band. Zudem unterschieden sich die Aktivitäten beider Proteine, da sie für Bin1 Tandem-SH3 jeweils in Bezug zu Bin1 SH3 halbiert sind, bedeutet dies, dass jeweils zwei Ligandenstellen durch Bin1 Tandem-SH3 gebunden wurden und nicht mehr weiteren Analytmolekülen zur Verfügung standen. Das Verhältnis wurde validiert, indem von Bin1 SH3 doppelt so viel Analyt wie von Bin1 Tandem-SH3 benötigt wurde, um eine vollständige Sättigung zu erreichen.

Mit Hilfe beider äquivalenter SH3-Domänen und dem neun-Aminosäuren-langen Linker banden und vernetzten beide Domänen des Bin1 Tandem-SH3 einen oder nahegelegene Liganden. Kinetisch konnte dieser Effekt durch den langsamen, nicht einfach-exponentiellen Abfall in der Dissoziationsphase und durch die mit  $K_D \sim 10$  nM sehr hohe Affinität erklärt werden. Dissoziierte eine der beiden SH3-Domänen vom Liganden – vorwiegend die niederaffine Bindestelle – erfolgte durch die kovalente Verlinkung zweier SH3-Domänen meist eine Wiederassoziation. Zwar sollten Wiederbindeeffekte durch die hohe Flussrate von 50  $\mu$ l/min bei SPR verhindert werden, aber trotzdem konnte dieser Effekt beim Bin1 Tandem-SH3 auftreten, da es im Rahmen der Messungen zu keiner vollständigen Dissoziation des Komplexes kam. Der Fall, dass beide SH3-Domänen zeitgleich dissoziieren, wurde in allen SPR-Messungen bedingt durch hohe Flussraten observiert. In BLI-Messungen dissoziierte der Komplex dennoch nicht innerhalb der Experimentdauer, sodass davon ausgegangen werden muss, dass einzelne, dissoziierte SH3-Domänen durch die noch bestehende Assoziation der Tandem-Domäne wiedergebunden wurden. Eine Dissoziation erfolgte lediglich für die Hälfte der eingesetzten Konzentrationen. So ist das Vorhandensein einer zweiten SH3-Domäne in unmittelbarer Nähe in der Lage, einen extrem stabilen Komplex zu generieren, der die Erwartungen der Komplexaffinität bei Weitem übertrifft, da in der Literatur bislang keine dimerisierte SH3-Domäne dieser Affinität gefunden wurde. Deshalb kann gerade das Bin1 Tandem-SH3 für die Bestimmung einer Komplexstruktur verwendet werden.

Anhand der Bindeaffinität – unter Verwendung dieses einen NS5A-Konstrukts – kann spekuliert werden, dass mehrere Bindestellen des NS5A(333-369) von den SH3-Domänen gebunden werden. Jedoch können unter Verwendung eines Konstruktes keine Rückschlüsse gezogen werden, welches oder welche der drei PxxP-Motive dieses Konstruktes assoziiert werden. Damit binden beide Domänen des Bin1 Tandem-SH3 den oder die Liganden, und es bildet sich, wie bei Feuerstein geschlussfolgert (Feuerstein *et al.* 2012b), ein multivalenter Komplex aus. Aus den Messungen ergab sich bei Bin1 Tandem-SH3 ein ähnliches Verhalten

wie bei Grb2 mit seinen beiden SH3-Domänen (Simon *et al.* 1995, Tan *et al.* 1999). Grb2 bindet mit seiner N-terminalen SH3-Domäne einige der PxxP-Motive im Liganden Sos, während die C-terminale SH3-Domäne diesen Komplex stabilisiert (Simon *et al.* 1995). Ebenso verhält sich die Nck mit ihren drei SH3-Domänen und einer SH2-Domäne, da die C-terminale SH3-Domäne den Liganden Sos oder Dynamin affiner bindet als ihre anderen Domänen. Diese anderen Domänen stabilisieren den Komplex (Wunderlich *et al.* 1999). Da diese Effekte nur mit dem Bin1 Tandem-SH3 und nicht mit dem Bin1 SH3 auftraten, kann geschlussfolgert werden, dass homodimerisierende Bin1-Moleküle an Membranen ebenfalls diese Komplexeigenschaften besitzen.

Eine multivalente Bindung kann Vorteile bei einer hohen Zahl an Mutationen bieten. Besonders bei HCV mit großen Sequenzunterschieden zwischen den Genotypen, der Ausbildung von Quasispezies und der hohen Mutationsrate der RNA-Polymerase (Bartenschlager *et al.* 2000) kann die Bindung von NS5A an viele zelluläre Proteine gewährleistet werden. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse scheint die Aufrechterhaltung der Bindung von NS5A zu Bin1 eine zentrale Rolle zu spielen. Gerade die hochaffine Interaktion des Bin1 Tandem-SH3 zu NS5A indiziert eine wichtige Einflussnahme bei hohen lokalen Konzentrationen.

#### 5.2.1.2. Akkumulation an biologischen Membranen

Es wird diskutiert, ob spezifische paarweise SH3:Liganden-Interaktionen auftreten, die vielfältigere Interaktionsmöglichkeiten besitzen. SH3-Domänen beeinflussen eine große Vielfalt zellulärer Prozesse: Sie nehmen an der Mitogenese, T-Zell-Aktivierung und Zellpolarisation durch Komplexbildung teil (Mayer 2001). Wechselwirkungen zwischen SH3-Domänen und PPR-Sequenzen führen zur Zellsignalübertragung und zur Lokalisierung der SH3-Domänen-haltigen Proteine zu zellulären Kompartimenten wie dem Zytoskelett oder den Membranen. Eine Kontrolle des Oligomerisierungsstatus tritt an Interaktionsoberflächen unter zeitlicher und örtlicher Kolo-kalisation auf. Diese Protein-Protein-Assoziation wird in speziellen Kompartimenten, z. B. bei intrazellulären Signalisationskomplexen, und Änderung der lokalen Konzentration durch Genexpression, Sekretion, Degradation, Lagerung, molekulare Umgebung, Diffusion und Viskosität geregelt. Besonders die Verankerung der Proteine in oder an einer Membran, Kompartimentierung oder Ausbildung eines Multidomänenproteinkomplexes erhöhen die lokale Konzentration (Nooren *et al.* 2003). Durch die Veränderung dieser Parameter, besonders der räumlichen Kolo-kalisation, treten Effekte auf, die den Stoffwechsel in der Zelle regulieren.

Generell sind die Bindeaffinitäten zwischen SH3-Domänen und ihren Peptiden relativ schwach, bedenkend ihrer Wichtigkeit in zellulärer Kontrolle, jedoch kann eine konkurrierende Wechselwirkung zusätzliche Interaktionsmechanismen offenbaren (Mayer 2001). Dennoch kann sich die geringe Affinität zum Vorteil umkehren, da intermolekulare und intramolekulare Bindestellen dissoziieren sollen, sobald die Signalwirkung beendet sein soll (Dyson *et al.* 2005). Die schwache Spezifität der SH3-Domänen an intramolekulare PxxP-Motive ist wichtig, um diese Proteine in einem repressiven Zustand zu halten. Die Src bestehend aus einer SH3-Domäne, einem Linker, einer SH2- und einer katalytischen

Domäne wird autokatalytisch durch intramolekulare Assoziation eines phosphorylierten Tyrosins an die SH2-Domäne reprimiert. Es erfolgt eine Umorganisation der Domänen nach Dephosphorylierung zur Signalübertragung (Young *et al.* 2001). Interaktionen mit suboptimalen niederaffinen Liganden werden in einer Umgebung mit hoher Ligandenkonzentration wie Membranen oder Wechselwirkungen an mehreren Bindestellen eines Proteins, bedeutender. Diese Komplexe mit regulatorischen Interaktionen benötigen mehrere Kontakte und einen empfindlichen konformationellen Schalter (Mayer 2001).

Es ist bekannt, dass viele Endophilin SH3-Domänen Dynamin mit hoher Affinität binden und eine Rekrutierung der Dynamin-Moleküle zu Regionen hoher Membrankrümmung durch die Ausbildung von Endophilindimeren ermöglichen (Owen *et al.* 1998, Capraro *et al.* 2013). Noch ist unklar, ob die SH3-Domänen oberhalb der BAR-Domänen (Gallop *et al.* 2006) oder zwischen dimeren BAR-Domänen vorkommen (Mim *et al.* 2012). In beiden Fällen helfen die Endophilindimere bei einer schnellen Endozytose nach dem sogenannten „kiss and run“-Mechanismus (Gallop *et al.* 2006). Homo- und heterodimere Komplexe bilden sich auch zwischen verschiedenen Proteinen wie Amphiphysinen und der Familie der „sorting nexin“ aus, die an der Endozytosemaschinerie und dem zellulären Proteintransport beteiligt sind (Leprince *et al.* 2003, Habermann 2004). So wird auch beschrieben, dass viele Bin1 SH3-Domänen an Dynamin binden und ebenso eine beschleunigte Endozytose und Signaltransduktion auslösen (Leprince *et al.* 1997, Wigge *et al.* 1997). Es wird dabei die Hypothese aufgestellt, dass lediglich ein Dimer funktionell in der Lage sei, mit Dynamin zu interagieren und die Endozytose zu stimulieren (Ren *et al.* 2006). Die BAR-Domänen Bin1s favorisieren eine konkave Membrankrümmung, besitzen dennoch die Möglichkeit, sich an verschiedene Grade der Krümmungen anzupassen (Blood *et al.* 2006). Dabei sind sie in der Lage, die Einstülpung von Vesikeln zu ermöglichen. Durch die zentrale, prolinreiche Linkerregion zwischen BAR- und SH3-Domäne kommen sich die SH3-Domänen relativ nah (Chen 2003). Diese nun multimeren SH3-Proteine interagieren mit höherer Avidität als ihre Monomere.

Neben Bin1 ist auch NS5A membranständig. Die Membranständigkeit von NS5A am „membranous web“ wird durch die N-terminale amphipatische Helix generiert (Elazar *et al.* 2003). Ohne die amphipatische Helix, Domäne I und LCS I des NS5A erfolgt keine Replikation (Penin *et al.* 2004), da die Bindung von RNA bzw. IRES unterbunden wird (Lemon *et al.* 1997, Lohmann *et al.* 2003), ohne Domäne III wird die Kolokalisation von NS5A und Kernprotein unterbunden (Appel *et al.* 2008). NS5A interagiert mit dem Kernprotein am „membranous web“ zur Rekrutierung des Replikationskomplexes und zur Assemblierung von Virionen (Egger *et al.* 2002, Gawlik *et al.* 2014). Des Weiteren bildet NS5A Homodimere aus, deshalb wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche DAA mit zweizähliger Symmetrie entwickelt, die an die verschiedene Dimeroberflächen des NS5As an der Domäne I binden (Lambert *et al.* 2014). Die Ausbildung des Homodimers ist unabhängig vom Phosphorylierungszustand der einzelnen Monomere und wird von NS4B reguliert, das ebenfalls an der Replikation beteiligt ist (Egger *et al.* 2002). Die Homodimersierung reguliert direkt und indirekt die Translation des viralen Genoms über signalübermittelnde Proteine.

Die beiden Bin1-Proteine, die in der vorliegenden Arbeit behandelt werden, wurden hinsichtlich ihres Komplexbildungsverhaltens eingeteilt. Sie werden unterteilt in permanente

oder transiente, obligate oder nicht-obligate und isologe oder heterologe Komplexe (Nooren *et al.* 2003). Permanente Komplexe sind sehr stabil und existieren nur in der Form des Komplexes, während transiente Komplexe leicht *in vivo* dissoziieren und assoziieren wie einzelne SH3-Domänen. Im letzten Fall kann das Gleichgewicht von der lokalen Umgebung kontrolliert werden; z. B. kann bei einer Änderung der Protein- oder Ligandenkonzentration das Assoziationsgleichgewicht verschoben werden, erkennbar durch den Unterschied zwischen niedrigen und hohen eingesetzten Konzentrationen in den SPR- und BLI-Messungen. Es existieren schwache und starke transiente Assoziationen, dabei stellen die schwachen Komplexe *in vivo* ein Gemisch verschiedener oligomerer Zustände dar, starke Komplexe hingegen ändern ihre Quartärstruktur nur im Zusammenhang mit Konformationsänderungen oder Ligandenbindung. Obligate Komplexe zeichnen sich als nicht selbstständige, stabile Strukturen *in vivo* aus und sind meist Multidomänenproteinkomplexe mit ineinandergreifender, hydrophober Interaktionsfläche, die sich anders verhalten als nicht-obligate Monomere. Bei der HCV-Replikation und Assemblierung sind solche Multidomänenkomplexe vorhanden. Isologe, homo-oligomere Komplexe umfassen solche, bei denen die Assoziation zur gleichen Oberfläche an beide Monomere erfolgt, heterologe Komplexe benutzen andere Interaktionsflächen. Protein-Protein-Komplexe unterscheiden sich auch in ihrer Existenzdauer. Im vorliegenden Fall verändert sich die Benennung von einem transienten, obligaten und isologen Komplex des Bin1 SH3 hin zu einem permanenteren, obligaten und heterologen Komplex bei Bin1 Tandem-SH3. Da sowohl Bin1 als auch NS5A beide membranständig sind, wird sichergestellt, dass beide Proteine räumlich kolokalisieren und in einem multimeren und auch multivalenten Komplex weitreichende biologische Bedeutung haben.

#### 5.2.1.3. Bedeutung der Interaktion des dimerisierten Bin1 mit NS5A

Der obligate, permanente Komplex aus Bin1 Tandem-SH3 und NS5A kann an biologischen Membranen auftreten, da Bin1 und NS5A *in vivo* an ähnlichen Membranen, wie ER/Golgi-Membranen und „lipid droplets“, lokalisiert sind. Es ist außerdem bekannt, dass Multidomänenproteinkomplexe bei der Replikation und bei der Assemblierung des HCV auftreten (Nanda *et al.* 2006). Eine ähnliche Rolle nimmt c-Src bei der viralen Replikation ein, da die Replikase NS5B mit c-Src-SH3 und NS5A an SH2 desselben Proteins interagiert (Pfannkuche *et al.* 2011).

Zunächst könnte Bin1 durch seine membrankrümmenden Eigenschaften in der Lage sein, die zur Replikation oder Assemblierung benötigten Membraneigenschaften zu generieren, die zur Ausbildung des Multidomänenkomplexes führen. Dabei übernimmt NS5A neben den Kernproteinen und NS3 eine große Rolle bei der fokalen Adhäsion ein, das sich auf Zellmigration und Signaltransduktion auswirkt (de Chasse *et al.* 2008). Zudem kann eine Rekrutierung der HCV-Proteine zum Multidomänenkomplex erfolgen, wodurch jedes einzelne Protein stabilisiert und die Hydrolyse von NS4B/NS5A durch NS4A gefördert werden könnte (Tanji *et al.* 1995a). Mit Hilfe der Zusammenführung vieler Bin1-Dimere durch Assoziation am multimeren NS5A-Interaktionsnetzwerk, wird NS5A unzugänglicher für Änderungen des Phosphorylierungsstatus und umgeht dadurch eine verringerte Interaktion

zum „human vesicle-associated membrane-protein associated protein A“, hVAP A. Dieses vesikelsortierende Protein und die Hyperphosphorylierung von CKI- $\alpha$  an LCS I lokalisiert die Nicht-Strukturproteine HCVs an cholesterinreichen Membranen, um eine geeignete Umgebung des Replikationskomplexes zu schaffen (Evans *et al.* 2004, Masaki *et al.* 2014).

Neben der Rekrutierung des Replikationskomplexes kann auch die Assemblierung neuer Virionen begünstigt werden. Die viralen Nukleokapside erhalten ihre Hülle aus Ausschnürungen der ER-Membran und Transport über den Golgi-Apparat (Bartenschlager *et al.* 2000), folglich sind die membrankrümmenden Eigenschaften der BAR-Proteine für die Assemblierung neuer Virionen von zentraler Bedeutung. Somit führe die hochaffine Interaktion von NS5A zu mehreren Bin1-Molekülen im Multiproteinkomplex zu einer erhöhten Endozytoseleistung und zur gesteigerten Abschnürung von Membranen, die HCV-Nukleokapside enthalten. Folglich wird die Generierung der Virionen begünstigt, und es erfolgt im weiteren Verlauf eine vermehrte Viruslast im Wirtsorganismus. Bedingt durch den hoch-affinen multimeren Komplex NS5A:Bin1 Tandem-SH3 wird die vollständige Rolle NS5As im HCV-Zellzyklus begünstigt.

Zusätzlich tritt eine Veränderung des Wirtsmetabolismus auf, da die Interaktion Bin1 zu weiteren zellulären Interaktionspartnern unterbunden wird (de Chassey *et al.* 2008). Einer der natürlichen Interaktionspartner von Bin1 ist das Onkoprotein Myc, das eine Schlüsselrolle im Zellwachstum übernimmt (Andresen *et al.* 2012). Auch Myc ist wie NS5A ein IDP mit PxxP-Motiven, das seine Aktivierung durch seinen Phosphorylierungszustand reguliert. Der Komplex aus Bin1 SH3 und Myc kann *in vitro* durch NS5A verdrängt werden (Aladag *et al.* 2014). Die Bindung Bin1 SH3 zu NS5A verhindert ebenfalls die intramolekulare Interaktion an die interne Bindestelle im Exon 12A, die eine Krümmung der Membran oder eine Assoziation Bin1s zu Dynamin verhindern würde (Kojima *et al.* 2004). Durch die Verdrängung wird die Tumorsuppressoreigenschaft Bin1 unterdrückt und die Kontrolle des Zellzyklus, der Proliferation und der Apoptose entfällt (Prokic *et al.* 2014). Da HCV bevorzugt Hepatozyten befällt, entstehen die für HCV-typischen Symptome (de Chassey *et al.* 2008).

### 5.2.2. Zweizustandsreaktionen der ITC-Experimente

Verschiedene Bindemodi von NS5A konnten mit ITC erfasst werden. Dabei wurden drei NS5A-Konstrukte unterschiedlicher Sequenzlänge mit den beiden Bin1 (Tandem-)SH3-Proteinen untersucht, s. Kapitel 3.8. Die ITC-Sensorgramme enthielten eine akzeptable Bindekurve, die mit nicht-linearer Regression akkurate Ratenkonstanten wiedergab, s. Kapitel 4.2.3. Die Bindekurven zeigten eine Zweizustandsreaktion zwischen freiem und gebundenem Protein, sodass diese Reaktion erfolgreich durch eine Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante beschrieben werden konnte. Alle Ergebnisse aus ITC-Experimenten sind in Tabelle 32 zusammengefasst.

Die ITC-Daten waren bemerkenswert konsistent hinsichtlich der Parameter Dissoziations- und Assoziationsratenkonstante, Enthalpie, Dissoziationsentropie, Differenz der Heizkapazität zwischen freier und gebundener Form und dem Korrekturfaktor der Peptidkonzentration. Das freie Protein und Peptid hatte eine signifikant höhere

Wärmekapazität als der Komplex. Das ist konsistent mit der erhöhten Exposition hydrophober Seitenketten zum Lösungsmittel durch Dissoziation. Die Größenordnung der temperaturabhängigen Assoziationsratenkonstante zeigte eine diffusionslimitierte Interaktion an.

Tabelle 32. Zusammenfassung der ITC-Messungen von Bin1 (Tandem-)SH3. Die Messung<sup>1</sup> wurde entnommen aus (Aladag *et al.* 2014)

Bin1-Protein	Temperatur [°C]	NS5A-Konstrukt	$k_a$ [1/Ms]	$K_D$ [nM]	$\Delta H$ [cal/mol]	$\Delta S$ [cal/mol/deg]
SH3 <sup>1</sup>	25	(347-361)	6,05e6	165±32	-4,68e3	15,3
SH3	30	(347-361)	5,17e6	193±22	-5,27e3	13,3
SH3	37	(347-361)	2,10e6	476±63	-6,96e3	6,5
SH3	25	(341-361)	8,42e6	119±17	-3,80e3	19
SH3	37	(341-361)	3,55e6	282±50	-4,66e3	14,9
SH3	25	(333-369)	7,95e6	126±16	-4,41e3	16,8
Tandem-SH3	25	(347-361)	12,9e6	78±12	-10,4e3	2,38
Tandem-SH3	30	(347-361)	13,5e6	74±9	-11,4e3	-5,01
Tandem-SH3	37	(347-361)	6,57e6	152±12	-15,1e3	-17,4
Tandem-SH3	25	(341-361)	27,1e6	37±5	-7,32e3	9,46
Tandem-SH3	37	(341-361)	10,7e6	93±34	-10,9e3	-2,93
Tandem-SH3	25	(333-369)	16,0e6	63±8	-9,22e3	2,03

Die Dissoziationskonstante von Bin1 SH3 und NS5A(347-361) wurde durch Fluoreszenzlöschung mit  $K_D=0,2\pm0,1 \mu\text{M}$  (Aladag *et al.* 2014) und die von Bin1 SH3 mit His-Ubiquitin-NS5A(333-369) durch SPR mit  $K_D=0,1 \mu\text{M}$  bestätigt (Feuerstein *et al.* 2012b). Außerdem entsprechen die ermittelten Parameter den ITC-Studien von Sem-5, Abl,  $\alpha$ -Spektrin und Fyn SH3-Domänen (Ferreon *et al.* 2002, Palencia *et al.* 2004, Casares *et al.* 2007, Demers *et al.* 2009). Auch die Dissoziationskonstante von Bin1 SH3:His-Ubiquitin-NS5A(333-369) aus der BLI-Gleichgewichtsanalyse  $K_D=170 \text{ nM}$  korrelierte mit 74 % zur Dissoziationskonstante dieses Konstrukts bei der ITC unter Berücksichtigung der um 5 °C erhöhten Temperatur bei der BLI-Messung. Die Affinität nach der Gleichgewichtsanalyse von Bin1 Tandem-SH3 wurde in den ITC- in Bezug zu BLI-Messungen um 30 % erniedrigt, da die Temperaturdifferenz 5 °C betrug. Die Diskrepanz zwischen SPR/BLI und ITC kann anhand der Methodik durch sterische Hinderung des Liganden an der Dektranmatrix oder an His-Ubiquitin erklärt werden, die zu einer nicht frei zugänglichen Bindestelle führte. Des Weiteren erfolgte in ITC-Messungen die Bindung unter Vorlage von Bin1 Tandem-SH3 und Zugabe von NS5A, während diese Reihenfolge in SPR/BLI-Messungen invertiert war. Der Versuch NS5A(333-369) in ITC-Experimenten vorzulegen und Bin1-Protein zuzugeben schlug fehl, da die Bindungskurven kein auswertbares, asymptotisches Verhalten darstellten [Daten nicht gezeigt]. Somit bot nur die Kombination aus SPR-, BLI- und ITC-Messungen einen umfassenden Einblick in die Bindeeigenschaften beider Bin1-Proteine.

Beide Bin1-Proteine mit allen NS5A-Konstrukten führten anhand der Gibbschen freie Enthalpie zu stabilen Komplexen, die nach dem Zwei-Zustand-Interaktionsmodell enthalpisch und entropisch favorisiert waren. Die Änderung der Heizkapazität  $\Delta C_p$  ist von vorrangiger Bedeutung, da dieser Parameter die Änderungen der Hydratation von Proteinoberflächen widerspiegelt. Positive  $\Delta C_p$ -Werte in Protein-Faltung und -interaktionen werden

normalerweise assoziiert mit dem hydrophoben Effekt (Prabhu *et al.* 2005). Ein positiver  $\Delta C_p$ -Wert, wie für Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3 berechnet wurde, implizierte eine reduzierte Exposition hydrophober Gruppen zum Lösungsmittel unter Ligandzugabe und war konsistent mit der hydrophoben Interaktionsoberfläche des Proteins und NS5A(341-361). Dies unterstützte die Hypothese, dass nicht-polare Aminosäuren an der Interaktion beteiligt waren, die durch die Interaktion im Übergangszustand solvatisiert wurden. Bei hydrophoberen PxxP-Motiven wie VSLARRLPPLP wurden mit Fyn SH3 noch größere  $\Delta C_p$ -Werte bestimmt (Demers *et al.* 2009).

#### 5.2.2.1. Der multivalente Komplex des Bin1 Tandem-SH3 mit ITC

Unterschiede zwischen den beiden Konstrukten Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3 wurden bei ITC-Messungen anhand des halbierten  $K_D$ s des Bin1 Tandem-SH3 bei 25 °C, bedingt durch die beiden äquivalenten SH3-Domänen, offensichtlich. Die Bindung des Bin1 Tandem-SH3 war enthalpisch favorisierter als die von Bin1 SH3, das heißt, die Bindestärke zu beiden verlinkten SH3-Domänen war höher. Die beiden SH3-Domänen aggierten folglich nicht separat, sondern es bildete sich ein binärer Komplex. Dieser Komplex war auch entropisch favorisierter als eine einzelne SH3-Domäne. Die Änderung der Entropie aus einer ITC-Messung setzt sich hauptsächlich aus Konformationsänderungen und Solvatisierungseffekten hydrophober Aminosäuren zusammen. Ein Entropieverlust in SH3-Domänen wird durch hydrophobe Gruppen im wässrigen Lösungsmittel induziert, darum ist die Interaktion hydrophober Substanzen favorisiert. Die entropischen Anteile der hydrophoben Wechselwirkung sind stark temperaturabhängig. Im Gegensatz zu den enthalpischen Wechselwirkungen nimmt die Entropie der hydrophoben Wechselwirkung mit steigender Temperatur zu. Dieser Effekt trat im besonderen Maße für Bin1 Tandem-SH3 auf, da hier im Gegensatz zu Bin1 SH3 negative  $\Delta S$ -Werte erreicht wurden. Die Hydratationsentropie wurde bei erhöhten Temperaturen negativ, das bedeutet, dass zumindest in diesem Temperaturbereich eine erhöhte Strukturierung der Wassermoleküle bei höheren Temperaturen auftritt (Prabhu *et al.* 2005). Die reduzierten  $\Delta S$ -Werte des Bin1 Tandem-SH3 für alle gemessenen NS5A-Konstrukte und Temperaturen waren ein besonderes Indiz für die binären Eigenschaften des Bin1 Tandem-SH3. Durch die gleichzeitige Bindung beider SH3-Domänen an den Liganden wurden folglich mehr hydrophobe Bereiche von NS5A abgedeckt, mehrere PxxP-Motive wurden gebunden. Außerdem wird durch diesen Wert ein Verlust translationaler und rotationaler Freiheitsgrade angezeigt (Murphy *et al.* 1995). Mit einem stärkeren Verlust dieser Freiheitsgrade bei Bin1 Tandem-SH3 und auch bei NS5A erfolgte bei diesen Proteinen eine verstärkte Restriktion der Bewegungsfreiheit einschließlich beider SH3-Domänen zueinander, auch erkennbar am Strukturparameter  $S^2$ . Somit wurden die Vorteile des Bin1 Tandem-SH3 als multivalenter Komplexbildner aus SPR- und BLI-Messungen bestätigt.

#### 5.2.2.2. Affinitäten der einzelnen PxxP-Motive

Beim Vergleich zwischen verschiedenen NS5A-Konstrukten mit ITC sind Gemeinsamkeiten aber auch Abweichungen aufgetreten. Generell galt für alle Konstrukte, dass die Reaktionen

exotherm waren und enthalpisch favorisiert wurden. Der dominierende Faktor der Hydrophobizität einer Aminosäure korreliert mit ihrer vom Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche. Die untersuchten NS5A-Konstrukte wiesen eine hohe Hydrophobizität auf, dabei gilt in diesem Fall: Je kürzer das Konstrukt, desto hydrophober. Die geringste Affinität zeigten beide Bin1-Proteine zu dem kürzesten Liganden NS5A(347-361) – mit lediglich den beiden C-terminalen der drei PxxP-Motive. Bei 37 °C wurde der Effekt besonders gut sichtbar. Dabei unterschieden sich NS5A(347-361) und NS5A(341-361) bei erhöhter Temperatur in der Dissoziationskonstante um 200 nM bei Bin1 SH3 und 60 nM bei Bin1 Tandem-SH3. Außerdem hatte dieses Konstrukt bei erhöhter Temperatur den niedrigsten gemessenen  $\Delta S$ -Wert, das hieß, dass die Solvatisierung des Komplexes nachteilig war. Da es sich bei Bin1 Tandem-SH3 und NS5A um Komplexe im 1:1-Verhältnis handelte, banden beide SH3-Domänen an ein NS5A-Molekül. Somit konnte beim Bin1 Tandem-SH3:NS5A(347-361)-Komplex davon ausgegangen werden, dass das zweite PxxP-Motiv PP1.2 nachteiliger in der Komplexbindung war als das erste PP2.1. Es konnte weiter geschlossen werden, dass PP2.1 eine größere Affinität als das PP1.2 besaß. Das mittlere PxxP-Motiv PP1.2 konnte nicht mit anderen Fragmentlängen untersucht werden, da es sich den basischen Selektionsanker mit PP2.1 und die Proline mit PP2.2 teilt. Ein Unterschied zwischen den beiden Konstrukten, die alle drei PxxP-Motive enthielten, trat bei Bin1 Tandem-SH3 auf. Anhand von  $K_D$  und  $\Delta S$  ging NS5A(341-361) als affinstes und entropisch favorisiertes Konstrukt hervor. Außerdem wurde NS5A(341-361) von dem Bin1 Tandem-SH3 in einem Verhältnis von 1:1 so komplexiert, dass dieser Komplex am besten für eine Strukturanalyse dienen sollte.

#### 5.2.2.3. Interaktion mit zwei distinkten PxxP-Motiven

Zunächst ist die Frage zu klären, ob mehrere SH3-Domänen an ein NS5A-Konstrukt binden können. Dies kann an einem Modell einer linksgängigen Polyprolin-Helix, PPII, erklärt werden, s. Abbildung 58. Die Polyprolinhelix II zeichnet sich durch  $\phi = -75^\circ$  und  $\psi = 150^\circ$  mit drei Aminosäuren pro Umdrehung, einer Ganghöhe von 3,1 Å und einer Tiefe von 9,3 Å/Umdrehung aus. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich eine PPII-Helix in der polyprolinreichen Region von NS5A ausbildet und es wurde in molekulardynamischen Rechnungen für NS5A(341-361) bestätigt. Monte Carlo Simulationen zeigen, dass sich diese lokal ausgebildete Struktur selbst bei Insertion von einer nicht-Prolin- oder nicht-Glyzin-Aminosäure ausbildet, allerdings durch Insertion von mehr als einem nicht-Prolin sich nicht fortsetzt (Creamer 1998). Die Ausbildung dieser PPII in NS5A ist essential für die virale Replikation in Genotyp 2a (Hughes *et al.* 2009, Pfannkuche *et al.* 2011).

Das PP2.1 am N-Terminus der Sequenz, bestehend aus P1, P2 und K1, hat im Gegensatz zu den PxxP-Motiven PP1.2 und PP2.2, bestehend aus K1, P3, P4 bzw. P3, P4 und R2, eine um 120° gedrehte Ausrichtung. Eine zeitgleiche Bindung des Lysins K1 von PP2.1 und PP1.2 kann aufgrund sterischer Hinderung wahrscheinlich ausgeschlossen werden. Somit kann jedoch eine zeitgleiche Assoziation an die beiden Motive PP2.1 und PP2.2 auftreten, da deren basischer Selektionsanker nicht überlappt.

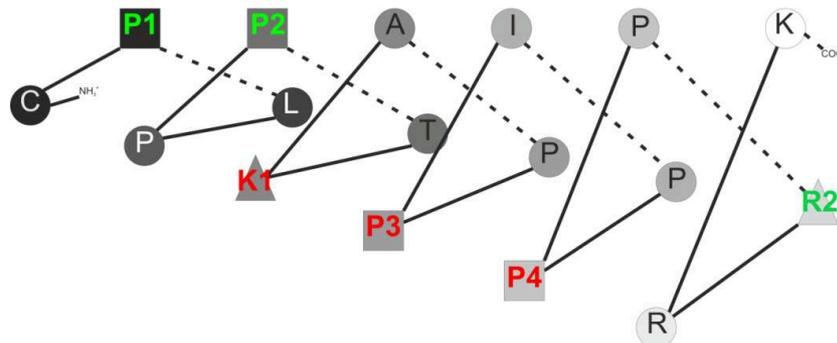


Abbildung 58. Schematische Zeichnung einer Polyprolinhelix der PPR Region von NS5A(342-358). PxxP-Motive sind farblich markiert: Proline P1 und P2 (grün, quadratisch) des PP2.1, das K1 (rot, dreieckig) als Selektionsanker, die Proline P3 und P4 (rot, quadratisch) des PP1.2 und das R2 (grün, dreieckig) als Selektionsanker des PP2.2.

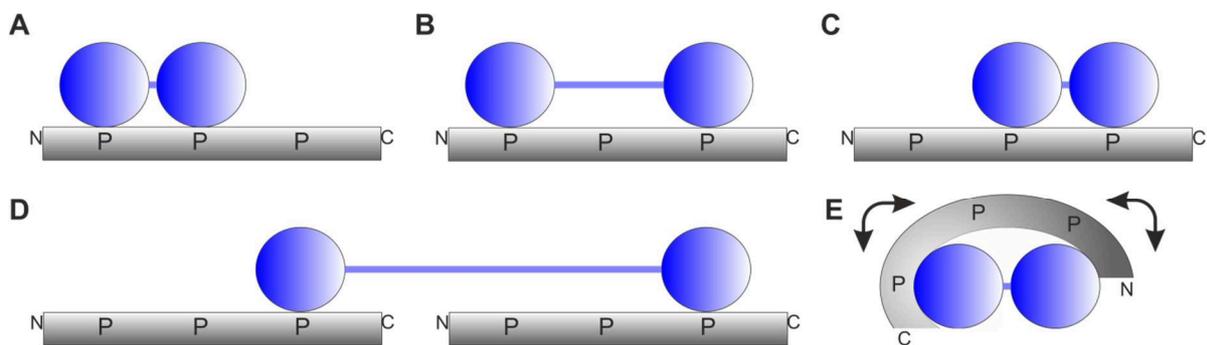


Abbildung 59. Eine Übersicht möglicher Bindemodi von NS5A an Bin1 Tandem-SH3. Zur vereinfachten Darstellung wurden Konstrukte mit allen drei PxxP-Motiven, die jeweils mit P beschriftet wurden, gezeigt. Das Bin1 Tandem-SH3 ist als Kreis-Linker-Kreis schematisch in blau dargestellt.

Eine Übersicht möglicher Bindemodi der PxxP-Motive NS5As und Bin1 Tandem-SH3 ist in Abbildung 59 schematisch gezeigt (die nachfolgenden fetten Großbuchstaben beziehen sich auf diese Abbildung). Wie im letzten Abschnitt beschrieben, ist die zeitgleiche Bindung der Motive PP2.1 und PP1.2 sterisch am Selektionsanker Lysin gehindert, sodass **A** ausgeschlossen werden kann. Von Seiten der SH3-Domäne erfolgt keine Änderung des Bindemodus, wenn ein Klasse I oder ein Klasse II PxxP-Motiv gebunden wird (Larson *et al.* 2000), deshalb können **B** und **C** auftreten. Komplex **B** kann jedoch nicht durch andere Fragmentlängen untersucht werden, da PP1.2 sich den Selektionsanker K1 mit PP2.1 und die Proline P3 und P4 mit dem PP2.2 teilt. Da eine SH3-Domäne die Proline anhand des Prolinrückgrades erkennt, ist **C** zwar nicht sterisch ausgeschlossen, aber energetisch und assoziierend unfavorisiert, wie beim Vergleich von NS5A(347-361) mit NS5A(341-361) und NS5A(333-369) mit ITC gezeigt. Die Komplexierung **B** wird bestätigt, da das PP2.1 im HCV Genotyp 1b für die Replikation benötigt wird, jedoch das in allen Genotypen konservierte und hochaffine PP2.2 die zelluläre Umgebung schafft, die eine virale Persistenz begünstigt (Macdonald *et al.* 2005, Hughes *et al.* 2009). Mutationen der Proline in PP1.2 und PP2.2 haben einen negativen Effekt auf die Affinität, jedoch keinen Effekt auf die Replikation (Zech *et al.* 2003). Deshalb kann lediglich eine Dimersierung des Bin1 unter zeitgleicher Bindung von PP2.1 und PP2.2 einen Effekt auf Replikation und Assemblierung auslösen.

Neben den 1:1-Komplexen von Bin1 Tandem-SH3 und NS5A, wie sie mittels ITC charakterisiert wurden, können ebenfalls Komplexe aus einem Bin1 Tandem-SH3-Molekül und zwei Molekülen NS5A entstehen, wie bei **D**. Diese Komplexe traten jedoch nur bei hohen lokalen Konzentrationen von NS5A auf. In SPR- und BLI-Experimenten konnten diese Komplexe auftreten. Eine weitere Möglichkeit wäre die Assoziation eines NS5A an ein Bin1 Tandem-SH3 unter dynamischer Bindung. Komplex **E** symbolisiert das Bindeverhalten von SH3-Domänen, die keine Vorzugsorientierung der PxxP-Motive besitzen, und dabei einen Komplex bilden, der eine vertikale Verschiebung des Liganden auf den beiden SH3-Domänen erlaubt. Dieser Effekt könnte dem Gleiten eines Proteins auf DNA ähneln (Li *et al.* 2009). Auch für den transienten Komplex Bin1 SH3:Myc konnte dieser Effekt observiert werden, der dort als „wobbling or sliding“ an den elektrostatisch weniger favorisierten Ligandenregionen bezeichnet wurde (Andresen *et al.* 2012).

### 5.2.3. Größenausschlusschromatographie

Bei Zugabe des Liganden NS5A(341-361) zu Bin1 Tandem-SH3 konnte anhand der Größenausschlusschromatographie festgestellt werden, dass der 1:1-Komplex eine andere dreidimensionale Form aufwies als der apo-Zustand Bin1 Tandem-SH3, s. Kapitel 3.9 und 4.2.4. Während sich die beiden SH3-Domänen im apo-Zustand wie separate, globuläre Domänen verhielten, änderte sich dieses Verhalten im holo-Zustand zu einem nicht-globulären Verhalten. Zu erwarten wäre bereits für den apo-Komplex, dass sich die beiden globulären Domänen mit ihrem Linker dazwischen anders als gänzlich globuläre Proteine verhalten und damit eine Diskrepanz bereits bei der apo-Form zwischen theoretischen und experimentellen Massen zustande käm. Deshalb konnte diese Analyse lediglich Hinweise geben über die Unterschiede zwischen apo- und holo-Form. Folglich änderte sich durch die Zugabe von NS5A(341-361) die Masse des Komplexes nicht linear. Das wies darauf hin, dass sich die beiden Domänen im Komplex nicht wie eigenständige Domänen verhalten und sich der hydrodynamische Radius durch Ligandzugabe erhöht. Durch den Bezug des hydrodynamischen Radius zur Rotationskorrektionszeit führte der vergrößerte Radius des Komplexes zu verbreiterten Resonanzsignalen in der NMR. Jedoch ist die Auflösung dieser Größenausschlusschromatographie gering, sodass keine weiteren Rückschlüsse über das Komplexverhalten gezogen werden können. Auch kann das Komplexverhalten von der Ionenstärke der verwendeten Lösungen abhängig sein. In Bezug zu ITC-Messungen wurde die Ionenstärke bei der Größenausschlusschromatographie siebenfach reduziert, da es sich dabei um den NMR-Puffer, SH3-Dialysepuffer, handelte. Die nachfolgenden strukturellen Methoden sollen weitere Klarheit über die Komplexbindung geben.

## 5.2.4. Untersuchung der Bindestellen mit NMR

### 5.2.4.1. Die kanonischen Bindestellen

Zusätzlich wurden die Bindeeigenschaften von NS5A und Bin1 (Tandem-)SH3 mit NMR charakterisiert. Hierzu werden zunächst die Eigenschaften des NS5A(341-361) näher erläutert, s. Kapitel 3.11.8. Die beiden Titrations von Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3 mit NS5A(341-361) zeigten ein, hinsichtlich der CSP, vergleichbares Verhalten, s. Kapitel 4.4.1.

Beide Titrations fanden im langsamen Austausch auf der NMR-Zeitskala statt, das hieß, dass affine Bindungen eingegangen wurden. Die CSP wurden in Abbildung 60 als Funktion der Bin1 SH3-Sequenznummer und in Abbildung 64 an der Struktur der holo-Form dargestellt. Signifikante CSP wurden in den beiden RT- und N-Src-Schleifen sowie den beiden  $\beta$ -Strängen  $\beta_4$  und  $\beta_5$  observiert, besonders bei den Aminosäureresten T534-E538, Q558-W562 und V583-T589. Die Position und Höhe der CSP stimmte für Bin1 SH3, sowie den beiden Domänen des Bin1 Tandem-SH3, überein. Ein Unterschied zwischen den beiden Titrations bestand darin, dass die Aminosäurereste im Bereich von W571-K579 von Bin1 SH3 flexibler wurden, sodass davon fünf Amidresonanzen nicht detektiert wurden. Diese Dynamik war im Fall von Bin1 Tandem-SH3 nicht gegeben. Beide Bindestellen von Bin1 Tandem-SH3 wurden mit NS5A besetzt, kein Signalsatz verblieb an der Position im Titrationsausgangspunkt. Auch trat bei Bin1 Tandem-SH3 lediglich ein Datensatz für beide Amide der N- und C-terminalen SH3-Domäne auf. Das sprach dafür, dass beide SH3-Domänen in gleicher Weise an der Interaktion beteiligt waren. Die Resonanzsignale des Bin1 Tandem-SH3 des freien Zustands wurden schneller gesättigt als die des Bin1 SH3. Das bestätigte die Komplexverhältnisse der SPR-, BLI- und ITC-Messungen. Folglich konnte sich Bin1 Tandem-SH3 auch von Seiten der NMR-Titration mit NS5A(341-361) durch die Interaktion beider SH3-Domänen zur Bestimmung der Komplexstruktur eignen.

Neben NS5A(341-361) binden ebenfalls Bin1 SH3:NS5A(347-361) (Aladag *et al.* 2014) und auch Bin1 SH3:NS5A(333-369) (A. Aladag, Dissertation) an die RT- und N-Src Schleifen und die beiden  $\beta$ -Stränge 4 und 5. Sowohl die Position auf der SH3-Domäne als auch die Höhe des CSP ist bei allen drei NS5A-Fragmenten gleich. Eine besondere Stellung nehmen die negativ geladenen Aminosäurereste D535 und D537 ein, die einzigartig für Bin1 SH3 sind (Owen *et al.* 1998). Sowohl Amphiphysin I als auch Amphiphysin II, Bin1, enthalten mehr negative Aminosäurereste in der N-Src-Region als andere SH3-Domänen. Aufgrund der hohen positiven Ladungsdichte der PPR-Region des NS5A entspricht dies den erhaltenen Affinitäten aus den Interaktionsstudien. Diese gehen elektrostatische Wechselwirkungen zu den positiv-geladenen Aminosäureresten im direkten Anschluss des PP2.2 ein.

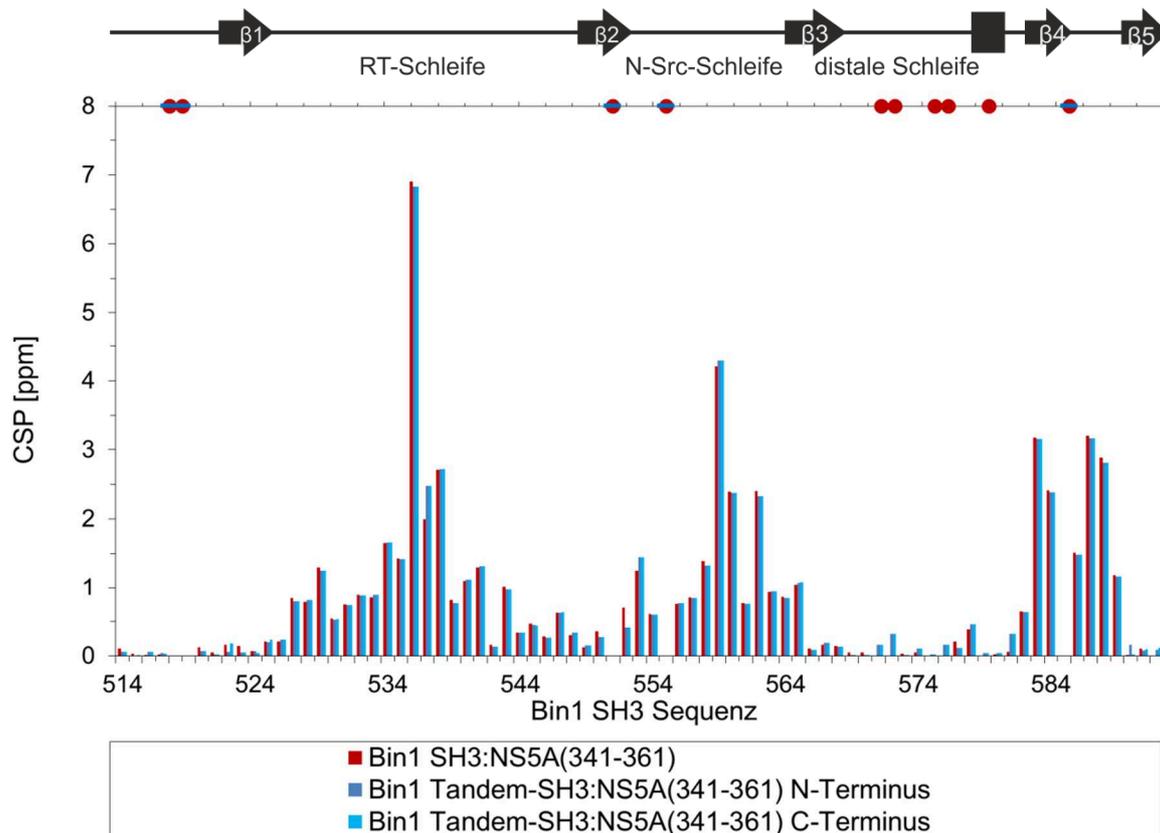


Abbildung 60. CSP der Titrations von Bin1 (Tandem-)SH3 mit NS5A(341-361).

Die CSP für Bin1 SH3 wurden in roten Balken, die der N-terminalen Bin1 Tandem-SH3-Domäne in dunkelblau und die der C-terminalen Domäne in hellblau dargestellt. Die Sekundärstrukturelemente der Domäne wurden durch Pfeile als  $\beta$ -Strang und Kästen für  $\alpha$ -Helices symbolisiert. In der Titration nicht observierte Resonanzsignale entsprechen den roten Kreisen (für Bin1 SH3) und blauen Strichen (für Bin1 Tandem-SH3) am oberen Rand des Diagramms, also den Prolinen und dynamischen Bereichen in Bin1 SH3.

#### 5.2.4.2. Untersuchung nicht-kanonischer Bindestellen mit NMR

Mit Hilfe der Titration von Bin1 Tandem-SH3 und NS5A(191-340) wurden die beiden nicht-kanonischen Bindestellen NS5As untersucht, dabei wurden beide Proteine zeitgleich observiert, s. Kapitel 3.11.8 und 4.4.2. Im Gegensatz zu der vorherigen Titration mit NS5A(341-361) wurden diesmal zwei Signalsätze für Bin1 Tandem-SH3 erhalten. Die Resonanzsignale spalteten auf in ein Signal, das schnellen Austausch in der NMR-Zeitskala zeigte und ein weiteres, das aufgrund dynamischer Effekte größtenteils nicht mehr detektiert werden konnte. Das nachstehende Diagramm zeigt die CSP für die Titration auf Seiten des Bin1 Tandem-SH3. Da eine Domänen-spezifische Zuordnung der beiden Domänen in Bin1 Tandem-SH3 nicht möglich war, wurden willkürlich die niedrigere CSP der N-terminalen Domäne und die höhere CSP der C-terminalen Domäne zugeordnet. Signifikante CSPs wurden für die Aminosäurereste A527-T536, L541-G544, D559, W562, V583-T589 festgestellt, s. Abbildung 61. Damit erfolgte die Bindung erneut an den RT- und N-Src-Schleifen sowie den  $\beta$ -Strängen 4 und 5. Ein Vergleich zur Titration Bin1 SH3:NS5A(191-340) (Schwarten *et al.* 2013) zeigt, dass Bin1 SH3 besonders an den negativ geladenen Aminosäureresten der RT- und N-Src-Schleifen gebunden wurde. Diese und auch hydrophobe Aminosäurereste der beiden  $\beta$ -Stränge erfahren eine größere Einflussnahme des Liganden als bei Bin1 Tandem-SH3. Ansonsten überlappen die Bindestellen für

Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3, jedoch wurden auf Seiten des Bin1 Tandem-SH3 zweifach geringere Änderungen der chemischen Verschiebung detektiert. Diese verringerten CSP des Bin1 Tandem-SH3 wurden durch CSP beim molaren Verhältnis von 1:1 beider Messungen bestätigt, da diese erstens sämtliche Resonanzen zeigten und zweitens durch Unterschiede der Endverhältnisse eine bessere Vergleichbarkeit ermöglichten.

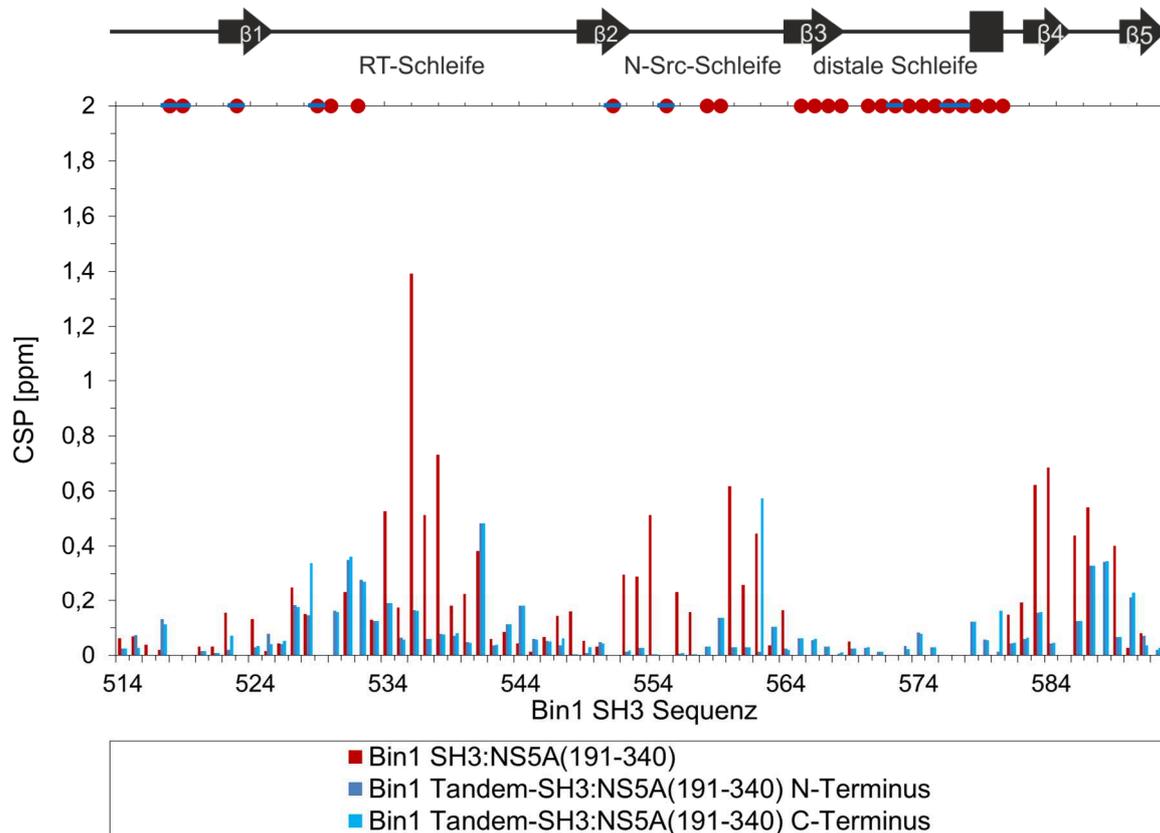


Abbildung 61. CSP der Titrationen von Bin1 Tandem-SH3 mit NS5A(191-340).

Die CSP für Bin1 SH3 wurden in roten Balken (Schwarten *et al.* 2013), die der N-terminalen und C-terminalen Bin1 Tandem-SH3-Domäne in dunkelblau und in hellblau dargestellt. Die Sekundärstrukturelemente der Domäne wurden durch Pfeile als  $\beta$ -Strang und Kästen für  $\alpha$ -Helices symbolisiert. In der Titration nicht observierte Resonanzsignale entsprechen den roten Kreisen (für Bin1 SH3) und blauen Strichen (für Bin1 Tandem-SH3) am oberen Rand des Diagramms.

Bei Bin1 SH3 werden siebzehn Aminosäurereste aufgrund von Signalverbreiterung am C-Terminus der N-Src-Schleife,  $\beta 3$  und der distalen Schleife nicht detektiert (Schwarten *et al.* 2013). Während die Amidsignale durch Interaktion mit Bin1 SH3 eine erhöhte Linienbreite aufweisen, die ab einem zweifachen Überschuss jenseits der Detektion lag, wurden diese Amidsignale in der Titration mit Bin1 Tandem-SH3 bis zum fünffachen Überschuss observiert. Bei der Titration von NS5A(191-340) mit Bin1 SH3 wird bis zu einem maximalen Verhältnis von 2:1 keine Sättigung von Bin1 SH3 anhand des nicht-asymptotischen Verlaufs des CSP gegen Ligandverhältnis erreicht. Obwohl bei der Titration von Bin1 Tandem-SH3 mit NS5A(191-340) ein vierfacher Überschuss an NS5A(191-340) eingesetzt wurde, erfolgte immer noch keine Sättigung. Wegen ungewisser dynamischer Effekte war dieser Komplex nicht zur Strukturaufklärung nutzbar.

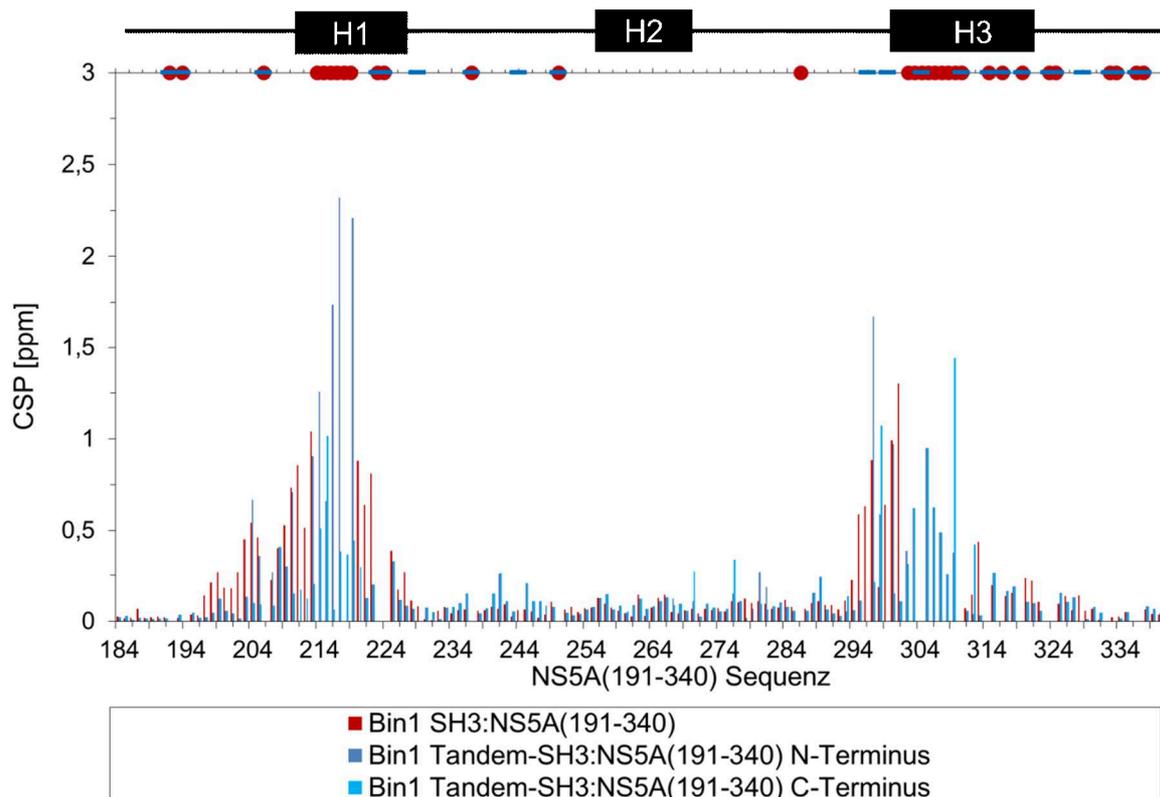


Abbildung 62. CSP der Titrations von NS5A(191-340) mit Bin1 Tandem-SH3. Die CSP für Bin1 SH3 wurden in roten Balken (Schwarten *et al.* 2013), die der N-terminalen und C-terminalen Bin1 Tandem-SH3-Domäne in dunkelblau und in hellblau dargestellt. Die Sekundärstrukturelemente der Domäne wurden durch Kästen für die drei  $\alpha$ -Helices symbolisiert. In der Titration nicht observierte Resonanzsignale entsprechen den roten Kreisen (für Bin1 SH3) und blauen Strichen (für Bin1 Tandem-SH3) am oberen Rand des Diagramms.

Auf Seiten des NS5A(191-340), s. Abbildung 62, mit Bin1 Tandem-SH3 wurden zwei Signalsätze an den Bindestellen erfasst, dabei zeigte ein Signalsatz schnellen und ein weiterer langsamen/intermediären Austausch. Die Zuordnung der Resonanzsignale mit langsamen/intermediären Austausch war aufgrund der geringen Frequenzdispersion des IDPs wegen Überlagerung unvollständig. Erneut fand keine Domänen-spezifische Zuordnung statt. Es bestätigt sich, dass Bin1 Tandem-SH3 neben den kanonischen auch mit den beiden nicht-kanonischen Bindemotiven interagierte. Die beiden nicht-kanonischen Bindestellen von NS5A in der LCS I und Domäne II umfassten die Aminosäurereste 204-226 und 297-309 der transienten Helix 1 und Helix 3. Damit überlagern die Bindestellen, die für Bin1 SH3 mit NS5A(191-340) erhalten werden, für Bin1 Tandem-SH3 an Helix 1 mit den Aminosäureresten 198-231 und Helix 3 mit 294-330 (Schwarten *et al.* 2013). Die Interaktion fand somit vorwiegend durch hydrophobe Wechselwirkung und Salzbrücken am C-Terminus der Motive statt, die zur Orientierung und Selektion führten. Die Dissoziationskonstanten aus der Titration Bin1 SH3:NS5A(191-340) werden mit  $K_D=100\pm 50 \mu\text{M}$  für H1 und  $K_D=240\pm 50 \mu\text{M}$  für H3 angegeben (Schwarten *et al.* 2013).

Außerdem wurde die Titration NS5A(191-447) mit Bin1 Tandem-SH3 durchgeführt. Erneut wurde ein divergentes Verhalten der beiden SH3-Domänen observiert. Jedes an der Interaktion beteiligte Amid zeigte schnellen und intermediären Austausch, dabei verbreiterte sich das Resonanzsignal mit intermediärem Austausch jenseits der Detektion. Die CSP-

Analyse erfolgte, wie bei der vorherigen Titration auch, Domänen-unspezifisch, indem willkürlich die kleinere chemische Verschiebung der N-terminalen und die größere der C-terminalen Domäne zugewiesen wurden. Bin1 Tandem-SH3 band die unterschiedlichen Bindestellen des NS5A(191-447) an den RT- und N-Src-Schleifen und  $\beta$ -Strängen 4 und 5. Erneut werden die NS5A(191-447)-Titrationen von Bin1 Tandem-SH3 mit Bin1 SH3 („Institute de Biologie Structurale“, Grenoble, persönliche Kommunikation) verglichen, s. Abbildung 63, und dabei zeigte ein Signalsatz des Bin1 Tandem-SH3 die gleiche Höhe des CSP für dieselben Aminosäurereste wie in dem Signalsatz des Bin1 SH3. Dadurch, dass eine CSP damit in der Größe der Titration von Bin1 SH3 mit NS5A(191-447) entsprach und eine weitere sich durch eine geringere CSP auszeichnete, band Bin1 Tandem-SH3 sowohl eine kanonische als auch eine nicht-kanonische Bindestelle mit unterschiedlicher Affinität. Da sich viele Signale verbreiterten, sprach dies erneut für eine dynamische Komplexbildung des Bin1 Tandem-SH3, was auch als Gleiten des Liganden beschrieben werden kann. Durch Dynamik verbreitern sich erneut zwölf Signale des Bin1 SH3 vorwiegend in der distalen Schleife, die bei Bin1 Tandem-SH3 keine Verbreiterung erfuhren.

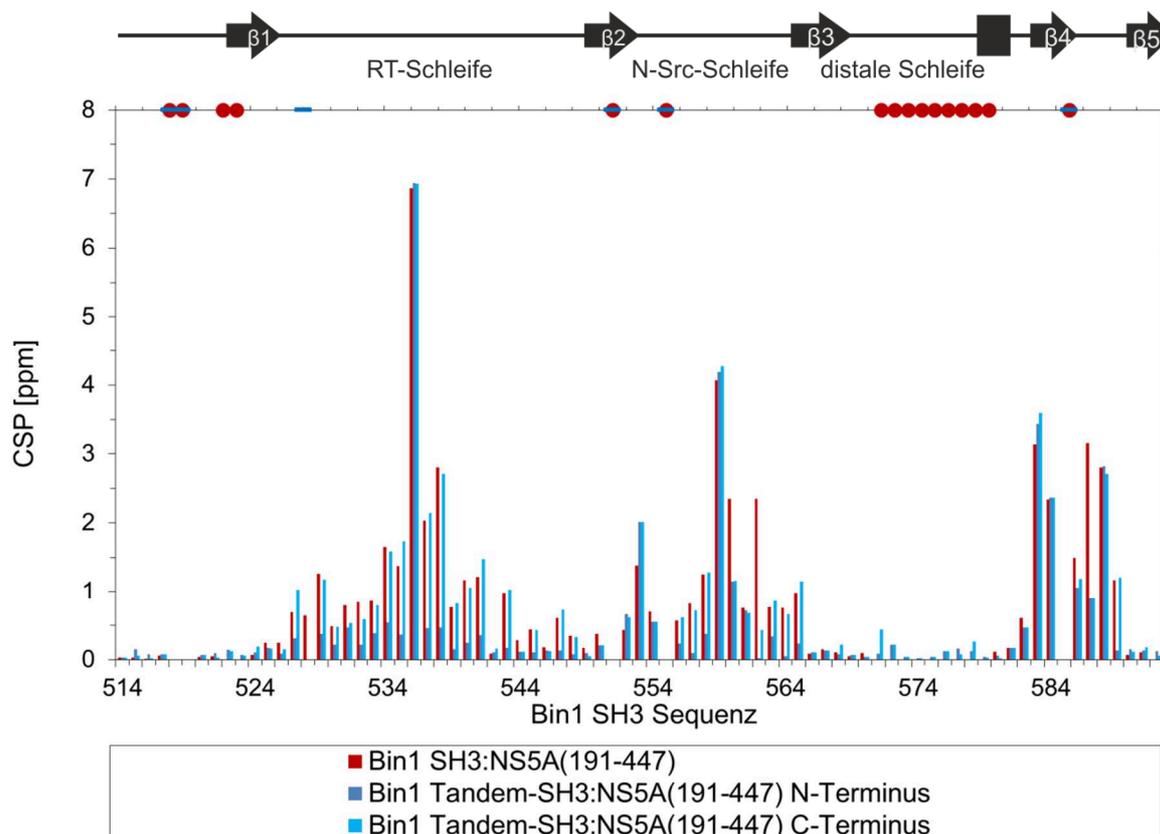


Abbildung 63. CSP der Titrationen von Bin1 Tandem-SH3 mit NS5A(191-447). Die CSP für Bin1 SH3 wurden in roten Balken („Institute de Biologie Structurale“, Grenoble, persönliche Kommunikation) die der N-terminalen und C-terminalen Bin1 Tandem-SH3-Domäne in dunkelblau und in hellblau dargestellt. Die Sekundärstrukturelemente der Domäne wurden durch Pfeile als  $\beta$ -Strang und Kästen für  $\alpha$ -Helices symbolisiert. In der Titration nicht observierte Resonanzsignale entsprechen den roten Kreisen (für Bin1 SH3) und blauen Strichen (für Bin1 Tandem-SH3) am oberen Rand des Diagramms.

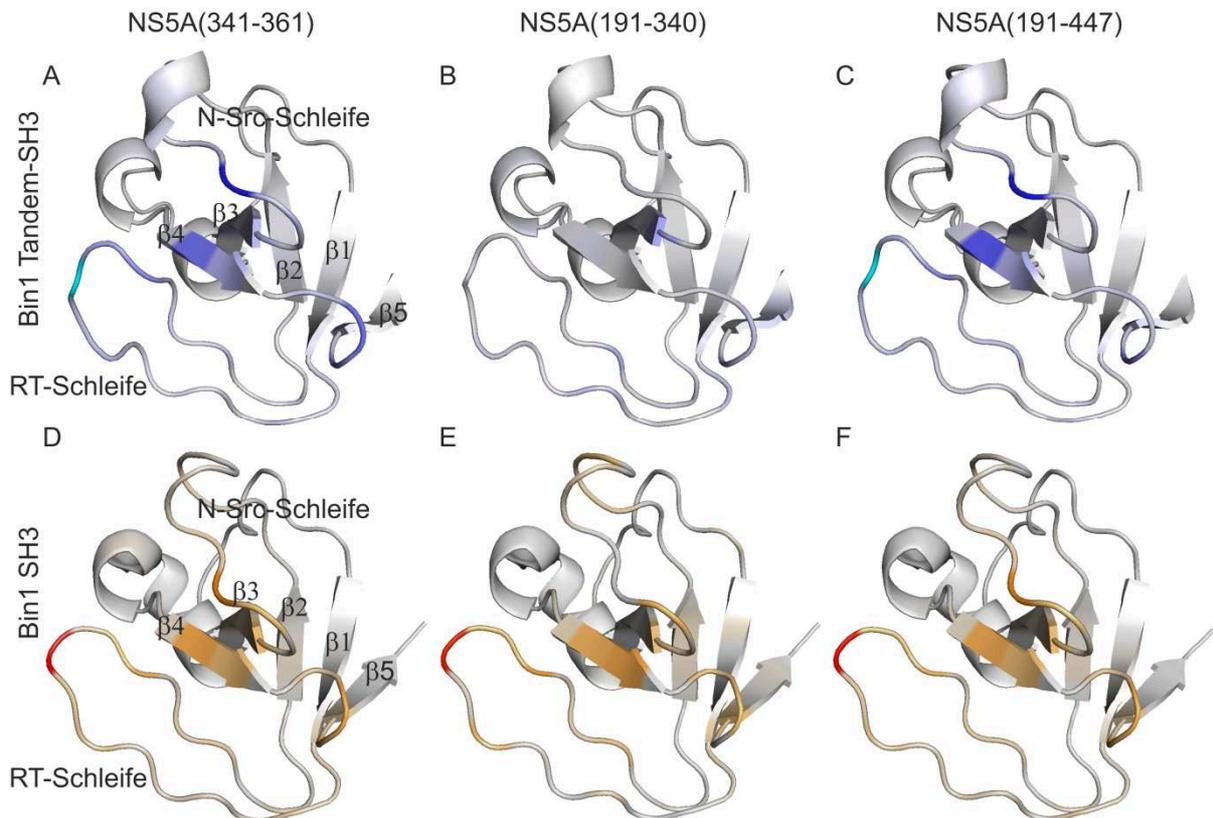


Abbildung 64. Übertragung der CSP auf die Strukturen der Bin1 (Tandem-)SH3.

In der oberen Reihe sind auf die N-terminale Domäne der holo-Struktur Bin1 Tandem-SH3s die CSP der NMR-Titration mit NS5A(341-361) (A), NS5A(191-340) (B) und NS5A(191-447) (C) aufgetragen. In der unteren Reihe folgen die Titrationen mit Bin1 SH3, die auf die Struktur 1MV0.pdb übertragen wurden zunächst mit NS5A(341-361) (D). Die Interaktionen von Bin1 SH3 mit NS5A(191-340) (E) stammt aus (Schwarten *et al.* 2013) und von Bin1 SH3 mit NS5A(191-447) (F) wurde von M. Schwarten durch persönliche Kommunikation übermittelt. Die Farbkodes entsprechen grau ohne Bindung, blau/orange schwache CSP, türkis/rot starke CSP. Die Interaktionen hatten unterschiedliche CSP, so wurden die mit NS5A(341-361) und NS5A(191-447) mit einem Maximalwert von 7 ppm und NS5A(191-340) von 1,5 ppm aufgetragen.

#### 5.2.4.3. Die Selektivität von SH3-Domänen

Anhand der Titrationen mit den Konstrukten NS5A(191-340) und NS5A(191-447) wurde bestätigt, dass Bin1 Tandem-SH3 an zwei verschiedene Bereiche des NS5A band. In einem Fall band Bin1 Tandem-SH3 an die beiden transienten Helices H1 und H3, es wurden zwei Signalsätze mit unterschiedlichem Verhalten detektiert, dessen Affinität zu NS5A(191-340) relativ gering war. Mit Hilfe des NS5A(191-447)-Konstruktes wurde gezeigt und in Bezug zu Messungen mit NS5A(341-361) und NS5A(191-340) bestätigt, dass die Bindestellen für kanonische und nicht-kanonische Bindestellen auf der SH3-Domäne überlagerten, die Bindung geschah unabhängig und war wie postuliert nicht kooperativ (Feuerstein *et al.* 2012b). Zusätzlich konnte anhand der Titration mit NS5A(191-447) festgestellt werden, dass erstens mehrere SH3-Domänen an die dargebotenen Bindestellen des NS5A banden und zweitens ein dynamischer Komplex entstand, der für Proteine mit LCS vorausgesagt wurde (Coletta *et al.* 2010). Mit dem NS5A(191-447)-Konstrukt wurden mindestens zwei Signalsätze erhalten, die für eine Assoziation des Bin1 Tandem-SH3 an eine nieder- und

eine hochaffine Bindestelle sprachen. Zusätzlich verbreiterten sich viele Resonanzsignale durch Dynamik, das konnte bestätigen, dass eine SH3-Domäne an die drei PxxP-Motive band und ein sogenanntes Gleiten der PxxP-Bindestellen auftrat. Dieser Komplex aus kanonischen und nicht-kanonischen Bindemotiven eignete sich zwar nicht zur Strukturaufklärung, hat jedoch biologische Relevanz.

Aufgrund der mangelnden Präferenz der SH3-Domänen binden diese an viele verschiedene Motive, nicht nur die kanonischen PxxP-Motive mit unterschiedlicher Orientierung, sondern auch an solche, die kaum Ähnlichkeit mit PxxP-Motiven aufweisen. Anhand von NS5A ist diskutiert worden, dass sich der transiente, helikale Charakter der beiden an der Interaktion beteiligten Helices auflöst und sich ein sogenannter „fuzzy complex“ ausbildet (Schwarten *et al.* 2013). Die schwache Affinität der SH3-Domänen könnte eine funktionelle Rolle durch ihre hohen Dissoziationsraten spielen und somit eine schnelle Ummodellierung der Protein-Protein-Interaktion bei unterschiedlichen zellulären Gegebenheiten ermöglichen (Mayer 2001, Li 2005). Somit können *in vivo* NS5A-Moleküle ihre Effektmoleküle unter all den anderen zellulären Molekülen zwar nicht gezielt, jedoch schnellstmöglich herausfiltern. Die Eigenschaft der mangelnden Präferenz der SH3-Domänen zu PxxP-Klassen wird ausgenutzt und mit der Eigenschaft zur Promiskuität verknüpft. Wird zunächst die niederaffine Bindestelle NS5As gebunden, so wird diese schneller durch die hochaffine Bindestelle ersetzt und der zelluläre Stoffwechsel zugunsten HCVs umprogrammiert.

Eine Übertragung der Erkenntnisse aus den hier behandelten Interaktionsstudien auf andere SH3-Domänen ist möglich. Die Variabilität der SH3-Domänen tritt vorwiegend in den Bereichen der N-Src und distalen Schleife auf und weniger in der RT-Schleife (Larson *et al.* 2000). Die N-Src-Schleife ist sehr unterschiedlich zwischen den einzelnen SH3-Domänen. Demzufolge ist dieser Bereich der Domäne sehr flexibel und kann mehrere Konformationen unter Bindung eingehen. Mit vielen unterschiedlichen Methoden konnte gezeigt werden, dass erstens andere SH3-Domänen im niedrig mikromolaren Bereich mit synthetischen PPR interagieren (Mayer 2001) und zweitens die Spezifität von SH3-Domänen gering ist (Li 2005). Amphiphysin I bindet die Peptide PIRPSR und PTIPPR, während die SH3-Domäne aus Endophilin eine distinkte Bindestelle auf dem PKRPPPPR-Peptid aufweist (Cestra *et al.* 1999). Die im letzten Peptid uneindeutige Identifizierung als Klasse I oder Klasse II-Polyprolinmotiv ließ den Schluss zu, dass das Bindungsrepertoire von SH3-Domänen komplex ist (Alexandropoulos *et al.* 1995). Folglich werden auch Liganden ohne das kanonische PxxP-Motiv gebunden. Abweichende Bindemotive sind PxxDY (Aitio *et al.* 2008), PWTQD in Pex5p (Barnett *et al.* 2000), RKxxYxxY in SKAP55 (Kang *et al.* 2000). Auf Seiten des Liganden benötigt das Adaptorprotein Nck ein Serin in dem Motiv PxxPxRxxS zur Interaktion (Zhao *et al.* 2000). Die Abl SH3 bindet bevorzugt Klasse I-ähnliche Motive mit einem Tyrosin als Selektionsanker (Aitio *et al.* 2010). All diese unterschiedlichen Motive können SH3-Domänen in unterschiedlichen Orientierungen des Peptides, Positionen des Liganden und unterschiedlicher Spezifität binden (Alexandropoulos *et al.* 1995).

Des Weiteren können Punktmutationen in der SH3-Bindestelle dazu führen, dass einige putative Binder noch binden, während weitere nicht mehr binden (Lim *et al.* 1994, Lee *et al.* 1995, Girzalsky *et al.* 1999). Eine Mutation in der PP1.2 behielt die Bindung zu Hck, Lck, Fyn, Lyn und Grb2 aufrecht, ebenso wie PP2.1. Mutationen in der PP2.2 assoziieren

allerdings nicht mehr an Grb2, Hck, Lck, Fyn, jedoch an Lyn (Macdonald *et al.* 2005). Das bedeutet, dass ohne die beiden Klasse II-Motive PP2.1 und PP2.2 keine Bindung auftritt. Zudem bestimmen tertiäre Kontakte die Spezifität und Affinität. Die Spezifität und Affinität wird bei Hck SH3 durch die RT-Schleife bestimmt. Obwohl Hck SH3 HIV-1 Nef mit  $K_D=0,25 \mu\text{M}$  band, konnte mit einem kleineren Nef-Peptid lediglich  $K_D=91 \mu\text{M}$  detektiert werden (Lee *et al.* 1995). Lyn SH3 bindet das Protein Tip vom Herpes Virus im mikromolaren Affinitätsbereich (Bauer *et al.* 2005), während Fyn SH3 NS5A mit  $K_D=0,6 \mu\text{M}$  eine höhere Affinität hat (Shelton *et al.* 2008, Martin-Garcia *et al.* 2012). Fyn SH3:NS5A-Interaktionsstudien definierten weitere Sequenzen, die zur Spezifität und Affinität beitrugen (Macdonald *et al.* 2005). Auch Punktmutationen außerhalb der kanonischen Bindestelle, an der distalen Schleife, führten zur Auflösung der Bindeeigenschaften (Barnett *et al.* 2000).

## 5.3. Strukturelle Charakterisierung

### 5.3.1. Kristallisation einer SH3-Domäne

Bin1 Tandem-SH3 wurde als apo-Zustand und in Anwesenheit vom Liganden NS5A(341-361) im holo-Zustand kristallisiert, s. Kapitel 3.10. Dabei wurden zwei Datensätze des apo- und holo-Zustandes von Bin1 Tandem-SH3 gemessen. Die entsprechenden Strukturen wurden mit Hilfe der Methode des molekularen Ersatzes gelöst und bis zu einer Auflösung von 2,1 Å bzw. 2,2 Å verfeinert, s. Kapitel 4.3. In beiden Fällen ließ der Matthews-Koeffizient eine Lokalisation des Bin1 Tandem-SH3 in der asymmetrischen Einheit nicht zu, lediglich eine SH3-Domäne konnte sich pro asymmetrische Einheit dort befinden, um in Einklang mit dem Matthews-Koeffizienten und dem Lösungsmittelgehalt zu kommen. Mittels SDS-PAGE wurde jedoch bestätigt, dass sämtliche Kristalle und Kristallisationslösungen das Bin1 Tandem-SH3 enthielten. In beiden Fällen war die Aminosäurekette über die Länge einer SH3-Domäne gut definiert. Die Elektronendichte des neun-Aminosäuren-langen Linkers zwischen den homologen SH3-Domänen war nicht definiert. Diese Diskrepanz zwischen eingesetztem Bin1 Tandem-SH3 und erhaltenen Molekülen pro asymmetrische Einheit konnte abschließend lediglich durch eine heterogene Orientierung der SH3-Domänen geklärt werden.

Im Vergleich zwischen apo- und holo-Zustand des Bin1 Tandem-SH3 konnte festgestellt werden, dass sich die Phasen im Kristallisationstropfen und Kryobedingungen beider Ansätze unter Zugabe von NS5A(341-361) unterschieden. Der Vergleich der Gitterkonstanten beider Ansätze zeigte jedoch zu geringe Abweichungen, die gegen eine Inkorporation des Liganden in den Kristall sprachen. Bei Betrachtung der Elektronendichteverteilung des Kristalls im holo-Zustand konnte keine Elektronendichte oder Fehlinterpretation der Elektronendichtekarte für den Liganden lokalisiert werden, dies hätte für eine asymmetrische Positionierung oder unvollständige Besetzung des Liganden an SH3-Domänen stehen können. Auch eine Bindung des Liganden zwischen zwei SH3-Domänen wie im Fall des BBC1 SH3 aus Hefe mit dem Peptid Las17 (PDB 1ZUK) konnte nicht ersichtlich werden. Die putative Bindestelle des Liganden im Kristall war durch die räumliche

Nähe einer symmetrischen SH3-Domäne besetzt. Die Bindestelle an den RT- und N-Src-Schleifen sowie den  $\beta$ -Strängen 4 und 5 wurde über eine zweizählige Rotationsachse von einer weiteren Bindestelle einer SH3-Domäne reserviert und über hydrophobe und  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen stabilisiert, s. Abbildung 65. Alle vier aromatischen Aminosäurereste in der Bindestelle des Bin1 Tandem-SH3 bildeten  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen aus, die innerhalb der erlaubten Distanzen für diese Art der Wechselwirkung blieben. Zu den  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zählten solche, die hier beispielsweise zwischen C-C zweier unterschiedlicher SH3-Domänen (dabei wurde die zweite SH3-Domäne mit einem Hochkomma versehen) gemessen wurden, wie: W562-H529' 3,9 Å; F588-W562' 3,3 Å; H529-W562' 3,9 Å; W562-F588' 3,3 Å; Y531-F588' 3,8 Å; F588-Y531' 3,9 Å.

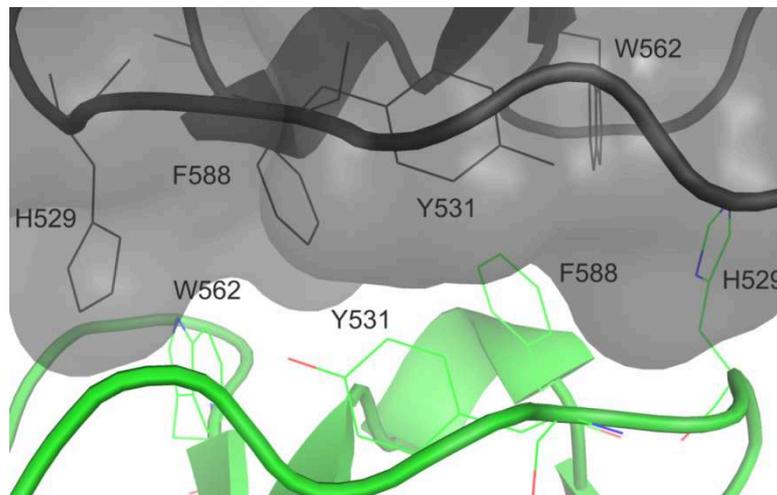


Abbildung 65. Hydrophobe Wechselwirkungen zweier SH3-Domänen als Kristallkontakt. Die putative Bindestelle eines Bin1 Tandem-SH3 in einer asymmetrischen Einheit wurde mit einer weiteren Bindestelle einer rotationssymmetrischen Bin1 Tandem-SH3 belegt.

Die homodimerisierenden SH3-Domänen von IB1 und Csk bilden ein ähnliches Netzwerk von  $\pi$ - $\pi$ - und elektrostatischen Wechselwirkungen der beiden SH3-Domänen an der putativen PxxP-Bindestelle in einer Kristallstruktur aus, die Dimerisierung wird jedoch durch weitere Studien bestätigt (Kristensen *et al.* 2006, Levinson *et al.* 2009). Ebenso erfolgt die Kristallisation des Bin1 SH3 – jedoch bei anderen Kristallisationsbedingungen – im PDB-Eintrag 1bb9 unter Ausbildung dieser Wechselwirkungen (Owen *et al.* 1998). Es kann davon ausgegangen werden, dass der Ligand NS5A(341-361) unter den hier verwendeten Bedingungen nicht an der SH3-Bindestelle ko-kristallisierte. Unter den verwendeten faktorisierten Ansätzen wurde keine weitere Bedingung identifiziert, bei der Bin1 Tandem-SH3 mit NS5A(341-361) kristallisierte. Die Inkorporation anderer Peptide an SH3-Domänen in Kristallen stellte sich ebenfalls als problematisch heraus. In der Kristallstruktur von Fyn SH3 mit einem NS5A-Peptid sind drei der vier Bindestellen mit Liganden besetzt und der basische Selektionsanker Arginin wird lediglich in einer der vier SH3-Domänen in der asymmetrischen Einheit in einer elektrostatischen Wechselwirkung fixiert (Martin-Garcia *et al.* 2012).

### 5.3.2. Die globale Struktur von Bin1 Tandem-SH3 mit NMR

Zuerst erfolgte eine nahezu vollständige Zuordnung von Bin1 Tandem-SH3 mit Hilfe von NMR-Experimenten, s. Kapitel 4.5.1. Die beiden Domänen dieses Proteins zeigten relativ geringe Abweichungen der chemischen Verschiebung im Bereich des N-Terminus, des Linkers und an den  $\beta$ -Strängen 1 und 5 sowie der internen Verbindung des  $\beta$ -Stranges 1 an  $\beta 2$ . Ein Vergleich zu Bin1 SH3 (A. Aladag, M. Schwarten, persönliche Kommunikation) zeigte zusätzlich relativ geringe Abweichungen der Amidresonanzsignale in der distalen Schleife. Die maximalen Abweichungen betragen ca. 0,1 ppm und zeigten, dass die beiden Domänen des Bin1 Tandem-SH3 unabhängig voneinander waren. Die Sekundärstrukturanalyse mit TALOS-N und ein Vergleich des Strukturparameters  $S^2$ , s. Kapitel 4.5.2, bestätigten ebenfalls dieses Verhalten. Die Strukturrechnung anhand von Torsionswinkel- und über 12000 distanzeinschränkende NOEs, s. Kapitel 4.5.4, belegten die Unabhängigkeit beider Domänen, s. Abbildung 66.

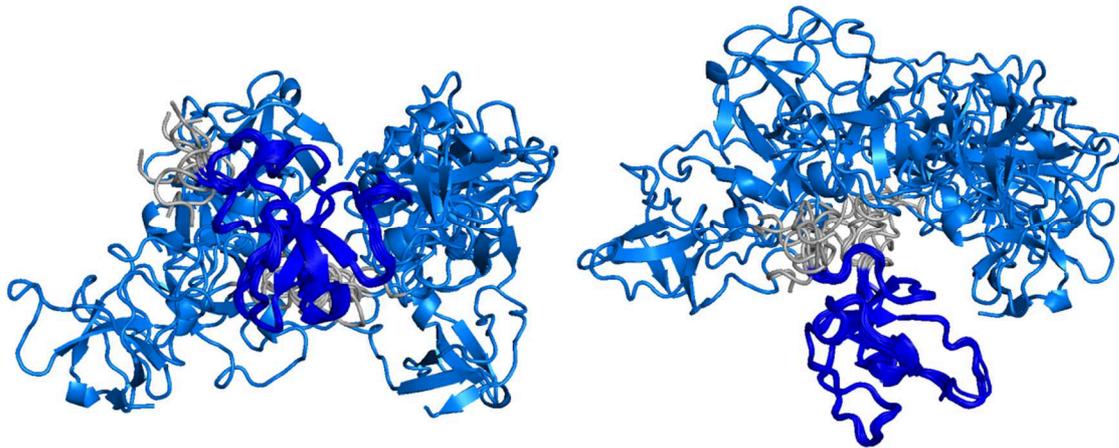


Abbildung 66. Überlagerung aller zehn Strukturen des NMR-Ensembles von Bin1 Tandem-SH3. Die N-terminale SH3-Domäne ist dunkelblau und die C-terminale hellblau gefärbt. Sowohl die Aminosäuren N-terminal der ersten Domäne und die des Linkers sind grau. Das zweite Ensemble ist um 90° zum ersten gedreht.

Die Bestimmung der Sekundärstrukturelemente mit KSDSSP bestätigte die Ausbildung von fünf  $\beta$ -Strängen und zusätzlich einer  $3_{10}$ -Helix zwischen den  $\beta$ -Strängen 4 und 5, sowie einer  $\alpha$ -Helix am C-Terminus der distalen Schleife. Die  $3_{10}$ -Helix wird normalerweise im ungebundenen Zustand von SH3-Domänen ausgebildet (Larson *et al.* 2000). Die strukturelle Charakterisierung des Bin1 Tandem-SH3 im apo-Zustand erlaubte einen Vergleich beider Domänen. Die Überlagerungen der zehn energetisch-günstigsten Strukturen wichen bei Betrachtung der  $C^\alpha$ -Atome um 0,306 Å für die N-terminale Domäne und 0,249 Å für die C-terminale Domäne ab. Unter zusätzlicher Berücksichtigung der Seitenketten wurde ein RMSD von 0,793 Å für die N-terminale und 0,768 Å für die C-terminale Domäne bestimmt. Ein RMSD über beide Domänen mit Rückgrad und Seitenketten wies einen RMSD von 7,341 Å auf. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die beiden Domänen separat betrachtet strukturell definiert sind, während durch den Linker eine große Dynamik in das Tandem-SH3

übertragen wird, sodass sich beide Domänen frei bewegen können, s. Abbildung 66. Ähnliche Proteindynamiken zwischen zwei Domänen mit PxxP-bindenden Eigenschaften wurden mit der Tyrosinkinase Hck SH3-SH2 untersucht. Mit Proton-Deuterium-Austausch wird im SH3-SH2-Konstrukt eine höhere Flexibilität nachgewiesen, die eine Entfaltung erschwert, da beide Domänen sich gegenseitig positiv beeinflussen (Engen *et al.* 1999). Mit Hck und Src SH2-SH3-Domänen wurde nachgewiesen, dass durch Phosphorylierung der Proteine diese Domänen über den starreren Linker zueinander verschränkt werden (Dyson *et al.* 2005). Das lässt auch Rückschlüsse auf die Bindeeigenschaften beider SH3-Domänen in dem Bin1 Tandem-SH3-Konstrukt zu: Beide Domänen können unabhängig voneinander Liganden binden. Somit können sie, wie mit SPR, BLI, ITC und NMR-Titrations beobachtet, sowohl beide an die PPR-Region von NS5A binden, als auch NS5A-Moleküle vernetzen.

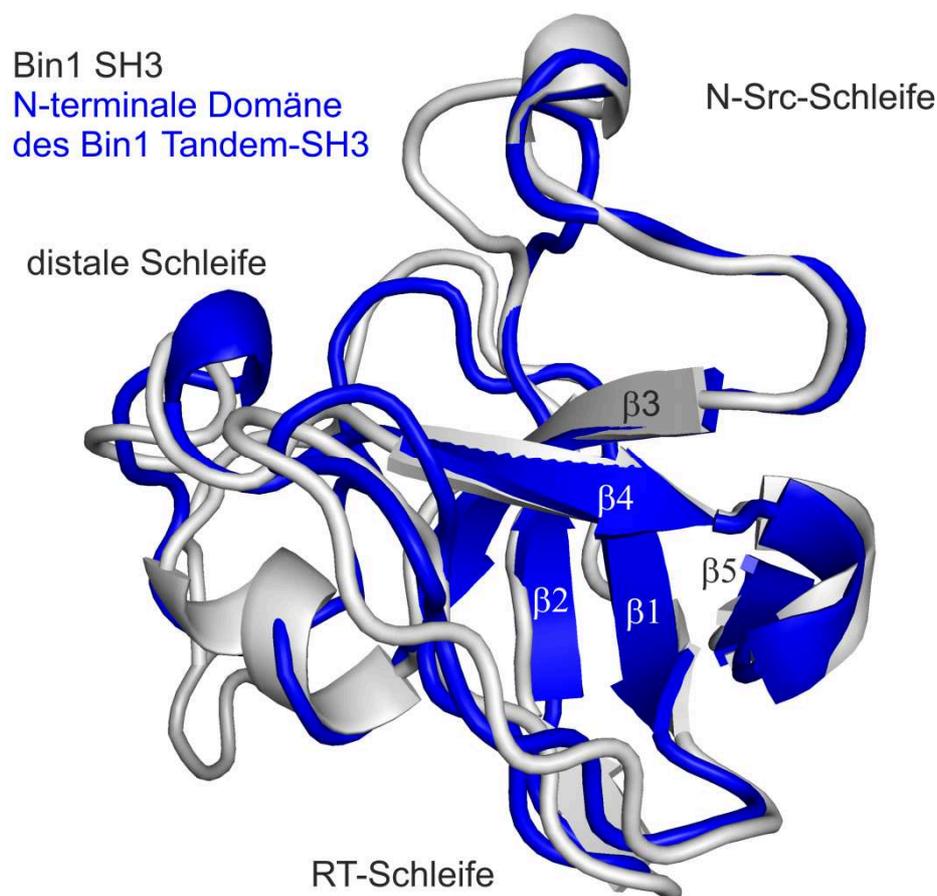


Abbildung 67. Überlagerung der Strukturen von Bin1 (Tandem-)SH3. Dargestellt ist lediglich die N-terminale Domäne des Bin1 Tandem-SH3 (blau). Die SH3-Domäne des Bin1 SH3 (grau) ist der Protein Datenbank mit dem Zugangscode 1MUZ.pdb entnommen.

### 5.3.3. Bin1 Tandem-SH3 und Bin1 SH3 im Vergleich

Im Vergleich zwischen Bin1 Tandem-SH3 und Bin1 SH3 werden Gemeinsamkeiten und Unterschiede sichtbar, s. Abbildung 67. Zunächst betrug der RMSD der C<sup>α</sup>-Atome zwischen apo-Formen des Bin1 Tandem-SH3 und Bin1 SH3, 1MUZ.pdb, (Pineda-Lucena *et al.* 2005) 1,07 Å. Wie der nachfolgenden Abbildung zu entnehmen ist, ähneln sich die N-terminale

Domäne des Bin1 Tandem-SH3 und die Bin1 SH3 im Domänenkern und den fünf  $\beta$ -Strängen. Unterschiede treten an den Schleifen auf. Die N-Src-Schleife von Bin1 SH3 ist zur distalen Schleife hin geöffnet, während die des Bin1 Tandem-SH3 räumlich kondensiert vorliegt. Besonders Änderungen in der distalen Schleife deuten auf Flexibilität dieser Aminosäuresequenz hin, die bereits in NMR-Titrationsen als dynamisch eingestuft wurden.

#### 5.3.4. Der Komplex Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361)

Neben der apo-Form Bin1 Tandem-SH3 wurden NMR-Experimente des Komplexes aus Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361) aufgenommen. Diese dienten zur Zuordnung der Resonanzsignale und zur Strukturbestimmung des Komplexes. Die Zuordnung der Resonanzsignale des Proteins im holo-Zustand erfolgte nahezu vollständig und analog zur apo-Form. Dabei wurden in der gebundenen Form über 9000 NOEs ausgewertet und ein Vergleich beider SH3-Domänen ergab einen RMSD der  $C^\alpha$ -Atome von 0,223 Å bzw. 0,344 Å, einschließlich der Seitenketten von 0,872 Å bzw. 0,809 Å für N- und C-terminale Domäne und über alles von 6,721 Å. Jedoch war die Zuordnung des Peptides aus 21 Aminosäuren mit acht Prolinen und drei Argininen in unmittelbarer Sequenznähe eine Herausforderung. Die aufgenommenen TOCSY- und NOESY-Experimente divergierten aufgrund der Pulssequenzen in der Temperatur und damit in der chemischen Verschiebung einzelner Resonanzen. Um die nahezu vollständige Zuordnung zu gewährleisten, mussten Strukturrechnungen durchgeführt werden. Diese bezeugten die Ausbildung einer lokal begrenzten PPII-Helix in einer ansonsten heterogenen Struktur.

Zur Strukturrechnung des Komplexes konnten einige wenige intermolekulare NOEs detektiert werden, s. Abbildung 68. Diese Aminosäurereste stimmten mit denen überein, die mit der NMR-Titration identifiziert wurden. Eine signifikante Rolle bei der Komplexbildung zeigten die Aminosäuren P585 und W562, die beiden konserviertesten Positionen in einer Überlagerung der SH3-Domänen. Die Aminosäurereste an den Positionen H529, Y531, G561, N587 und F588 haben ebenfalls Entropiewerte unter 7,5 und sind somit ebenfalls Teil der hydrophoben Bindetasche (Larson *et al.* 2000). Auch diese Aminosäurereste wurden in Titrationsen und dem intermolekularen NOE-Netzwerk identifiziert. Weitere Aminosäurereste, die an der Bindung beteiligt sind, aber nicht hochkonserviert sind, sind T534, D535, T536, D537, D559, E560 und V583. Diese Aminosäurereste sind zwischen den einzelnen SH3-Domänen unterschiedlich tief im hydrophoben Kern verborgen (Aitio *et al.* 2008). Für die Interaktion essentiell sind Y531, W562 und F588, die bei Punktmutationen zum Verlust der Bindeeigenschaften führen, während H529S die Bindung lediglich zu Dynamin beeinträchtigte (Lim *et al.* 1994). Mutationen wie D537A, E538K und D559R führen ebenfalls zum Bindungsverlust. Der einzige saure und gleichzeitig konservierte Aminosäurerest der RT-Schleife D535 führt nicht zum Verlust bei Mutation zu D535R (Owen *et al.* 1998). Am NOE-Netzwerk von Bin1 Tandem-SH3 und NS5A(341-361) wurden davon lediglich D535 und V583 identifiziert, jedoch zusätzlich wurden NOEs von D530, Q540, R581, G582 observiert. Aufgrund der mangelnden Divergenz in der chemischen Verschiebung des Liganden und der Überlappung der chemischen Verschiebungen beider Domänen des Bin1 Tandem-SH3, konnte keine eindeutige Zuordnung der NOEs erfolgen. Auch die

durchgeführten Strukturrechnungen erzeugten ein sehr heterogenes Bild der Bindestelle, des Liganden und der Orientierung beider SH3-Domänen im Bin1 Tandem-SH3-Konstrukt.

Eine Besonderheit war die Aufspaltung eines Resonanzsignals von H529 und H529' durch die Interaktion mit dem Liganden. Dieses lösungsmittel-exponierte Histidin befand sich an einem Anfang der Bindetasche und ermöglichte durch seine Öffnung nach außen die Wechselwirkung und Aufnahme großer Liganden. Da lediglich ein Histidin der beiden SH3-Domänen eine Änderung der chemischen Verschiebung vom freien zum gebundenen Zustand erfuhr, hätte dies eine Zuordnung der intermolekularen NOEs erleichtern können. Jedoch wurden keine eindeutigen NOEs zum H529 identifiziert, sodass lediglich behauptet werden kann, dass eine der beiden SH3-Domänen einen sperrigeren Teil des Liganden band.

Außerdem wurde ein zusätzliches Proton durch den Liganden in seiner Position fixiert. Das T589 H<sup>γ1</sup> wurde identifiziert. Das Threonin befindet sich nahe der Bindetasche und wird durch eine Umorientierung von F588 vom Lösungsmittel abgeschirmt.

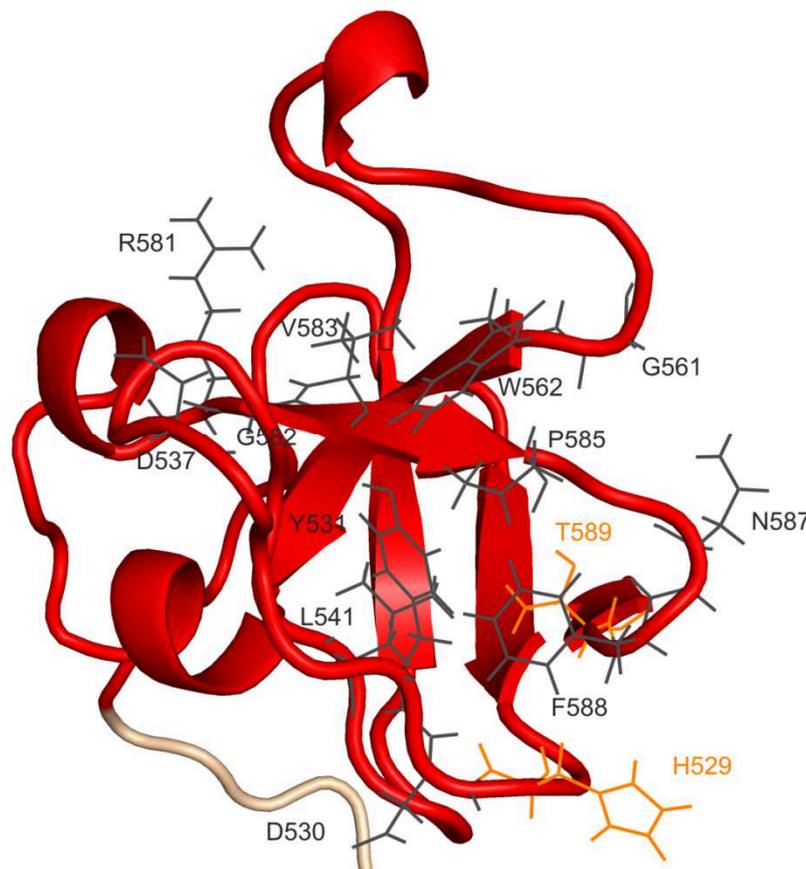


Abbildung 68. Aminosäurereste des Bin1 Tandem-SH3, die NOEs zum Liganden NS5A(341-361) zeigen.

Die N-terminale SH3-Domäne ist in rot dargestellt. Die an der Interaktion beteiligten Aminosäurereste sind schwarz hervorgehoben und solche, die eine signifikante geänderte chemische Verschiebung als auch ein fixiertes ansonsten austauschbares Proton aufweisen, sind orange markiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung des kompletten Bin1 Tandem-SH3-Proteins verzichtet, da an der C-terminalen Domäne die gleichen Aminosäurereste zu markieren wären.

Eine kombinierte Nutzung von CANDID, ARIA und HADDOCK führte bei  $\alpha$ -Spectrin SH3 und dem Liganden p41 zu einer hochaufgelösten Struktur (Casares *et al.* 2007). CANDID generiert automatisch Strukturensambles aus NOE-Daten und HADDOCK platziert Liganden aus CSP-Daten. Die alleinige Nutzung von ARIA führte in diesem Fall ebenfalls zu Strukturen mit schlechten Statistiken, sodass das effizientere CANDID zur automatischen Zuordnung der NOEs verwendet wurde. Gerade für das Problem der zweideutigen NOEs auf Seiten des Proteins, hätte dies zu einer vorläufigen Struktur führen können, die anschließend mit ARIA hätte verfeinert werden können. Es wurden jedoch auch auf Seiten des Liganden zu viele mehrdeutige NOEs identifiziert. Selbst die Aminosäurereste, die für eine Selektivität sorgen, wie die Proline im PxxP-Motiv, als auch die Selektionsankeraminosäuren ließen keine Bestimmung der Komplexstruktur zu. Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass NS5A ähnlich wie andere IDPs (Fuxreiter 2012), über die Bindestellen des Bin1 Tandem-SH3 gleitete und somit weniger favorisierte Ligandenbereiche transient band, ähnlich wie Bin1 SH3:Myc (Andresen *et al.* 2012).

Zum einen erkennen SH3-Domänen ihre Liganden an der Ausbildung seiner Sekundärstruktur, die besonders charakteristisch bei Prolinen ist. Nur ein kleiner Bereich der Prolinringe nahe des Rückgrats N und C<sup>δ</sup> wird erkannt (Mayer 2001). Die strukturelle Variabilität in der Umgebung des PxxP-Motivs ermöglicht es, die Beiträge verschiedener funktioneller Gruppen an SH3-Domänen zu analysieren. So konnte mit dem Insulin Rezeptortyrosinkinasesubstrat, IRTKS, SH3 und dem Liganden E. coli-sekretiertes Protein E enkodiert auf Prophage U, EspFU, gezeigt werden, dass eine SH3-Domäne mehrere PxxP-Motive an einem Liganden hochaffin bindet (Aitio *et al.* 2010). Oder die SH3-Domäne des „integral peroxisomal membrane protein“, Pex13p, die zwei Liganden bindet, darunter einen, Pex5p, an der RT- und einen an der distalen Schleife (Barnett *et al.* 2000). Auch andere Liganden binden an unterschiedliche Bereiche der SH3-Domänen (Kami *et al.* 2002). Es tritt unter den Phagozytenoxidasen, Phox, die mehrere SH3-Domänen enthalten, auch die Formation eines „superSH3“-Komplexes auf. Dabei komplexieren zwei benachbarte SH3-Domänen einen Liganden an einer einzigen signifikant in Bezug zur monomeren Bindestelle vergrößerten Ligandenbindeoberfläche (Groemping *et al.* 2003). Der Ligand enthält ebenfalls mehrere basische Aminosäuren, die außerhalb der kanonischen Bindestelle lagen. Da der Bin1 Tandem-SH3:NS5A-Komplex mit den Tandem-SH3-Domänen und einem basischen Liganden eine höhere Affinität als eine einzige SH3-Domäne zeigte, könnte eine „superSH3“ mit dem vorliegenden Bin1 Tandem-SH3:NS5A verglichen werden. Aufgrund der Diversität der Komplexe konnte anhand von 29 mehrdeutigen intermolekularen NOEs keine Komplexstruktur des Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361) mit hinreichender Sicherheit bestimmt werden, allerdings kann diese „superSH3“ durch die NMR-Titrations ausgeschlossen werden, da hier die Bindestelle beider SH3-Domänen definiert wurde.

Zum Zweiten zeigen auch die Liganden eine enorme Vielfalt an Assoziationen, Lokalisation und Plastizität (Mayer 2001). Dabei handelt es sich zum größten Teil um IDPs. Um IDPs aus einem inaktiven in einen aktiven Zustand zu bringen, gibt es unterschiedliche Möglichkeiten. So kann dieser Übergang durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung oder durch Interaktion an Proteine realisiert werden (Cordek *et al.* 2014). NS5A ist ein sehr anschauliches Beispiel für derartige Aktivierungsmechanismen. IDPs verlieren ihre Plastizität

durch Wechselwirkung zu Proteinen an kurzen Motiven, jedoch falten sich nicht gänzlich durch die Assoziation (Dyson *et al.* 2005). Sie zeigen vielmehr eine konformationelle Selektion, Flexibilitätsregulierung, kompetitive Bindung oder „tethering“, Attribute eines „fuzzy complex“ (Fuxreiter 2012). Mit überlappenden Bindestellen, schnellen Konformationsänderungen, die Domänenabfolgen vermischen, und alternativem Spleißen besitzen IDPs zusätzliche Mechanismen, die ihren Interaktions- und Effektradius noch erhöhen (Mittag *et al.* 2010). Besonders LCS-Regionen regulieren ihre Interaktionseigenschaften zu unterschiedlichen Interaktionspartnern durch die Ausbildung von elektrostatischen Feldern, Maskierung und Phosphorylierung (Coletta *et al.* 2010). Da NS5A eins der essentiellsten Proteine des HCV-Genoms ist, wurde gegen NS5A das DAA Daclatasvir entwickelt, das die Hyperphosphorylierung und somit den viralen Zyklus verhindert (Lemm *et al.* 2010). NS5A blockiert eins der wichtigsten antiviralen Proteine PKR, um die translationelle Reduktion unter IFN- $\alpha$ -Therapie zu blockieren (Gale Jr *et al.* 1997). Direkt und indirekt wurden mehrere Phosphorylierungsstellen in NS5A identifiziert. Einige sind in oder nahe der transienten Helix 1 in der LCS I (Tanji *et al.* 1995b). Ein Programm, das Phosphorylierungsstellen in Proteinen erkennt, NetPhosK, identifizierte mehrere Stellen in NS5A, darunter T360 (Cordek *et al.* 2014). NS5A wird am T360 von der PKA phosphoryliert und liegt so zu 20 % in Zellen vor (Cordek *et al.* 2014). Diese Position wurde sowohl als Kernlokalisierungssignal (Tanji *et al.* 1995b) als auch als konserviertes Motiv identifiziert, das bei Phosphorylierung oder Punktmutation zu Alanin je nach Genotyp zu einer zehnfachen Reduktion der RNA-Menge führt oder letal wirkt (Cordek *et al.* 2014). Damit ist eine strukturelle Untersuchung der PPR-Region unter Phosphorylierung durch verschiedene zelluläre Kinasen wertvoll, um weitere Erkenntnisse in der viralen Variabilität zu erlangen (Dyson *et al.* 2005). Die Ausbildung transienter Komplexe zum unphosphorylierten Liganden ist vorteilhaft, damit NS5A dennoch phosphoryliert werden kann und damit andere zelluläre Proteine binden kann. Bin1 überprüft den Phosphorylierungsstatus NS5As durch seinen schnellen Austausch zwischen den Bindestellen nicht nur an der Position des T360, sondern auch anhand weiterer Wechselwirkungen. Trotz unphosphoryliertem NS5A – oder gerade deshalb – konnte keine Komplexstruktur des Bin1 Tandem-SH3: NS5A(341-361) bestimmt werden.

### 5.3.5. Vergleich der apo- und holo-Formen von Bin1 Tandem-SH3

Im Vergleich der apo- und holo-Formen Bin1 Tandem-SH3, s. Abbildung 69, war der gesamte RMSD über alle Atome beider Domänen um 0,6 Å geringer im holo-Zustand als im apo-Zustand. Auch die Auswertung des Strukturparameters  $S^2$  und die analytische Größenausschlusschromatographie zeigte eine verringerte Flexibilität in der Region des Linkers. Die beiden Domänen versteiften sich zueinander im Linker, jedoch nicht signifikant, da NS5A(341-361) ein konformell heterogener Ligand ist (Fuxreiter 2012).

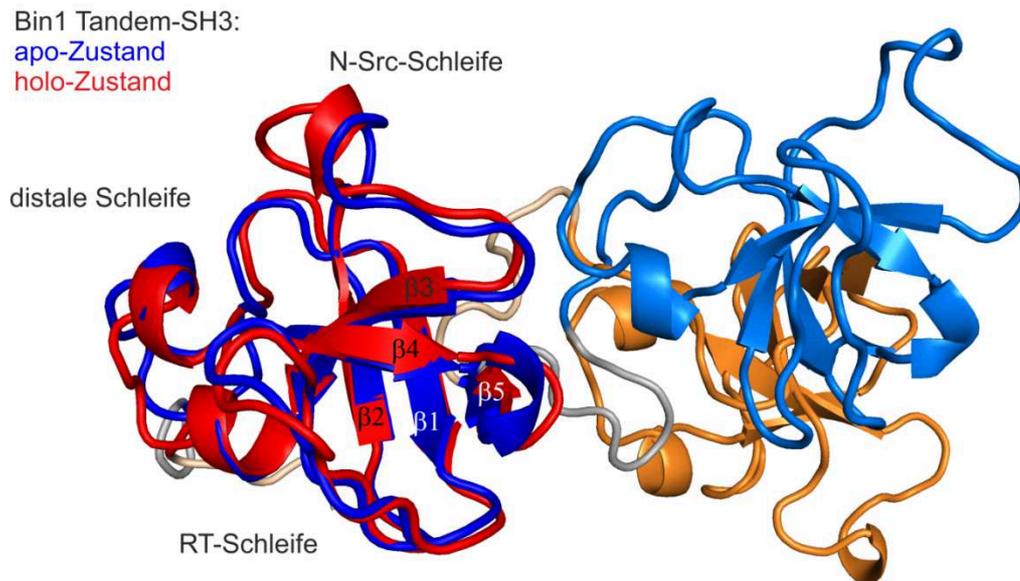


Abbildung 69. Überlagerung von Bin1 Tandem-SH3 als apo- und holo-Zustand. Der apo-Zustand ist N-terminal dunkelblau, C-terminal hellblau und Linker grau und der holo-Zustand N-terminal rot, C-terminal orange und Linker hellorange dargestellt.

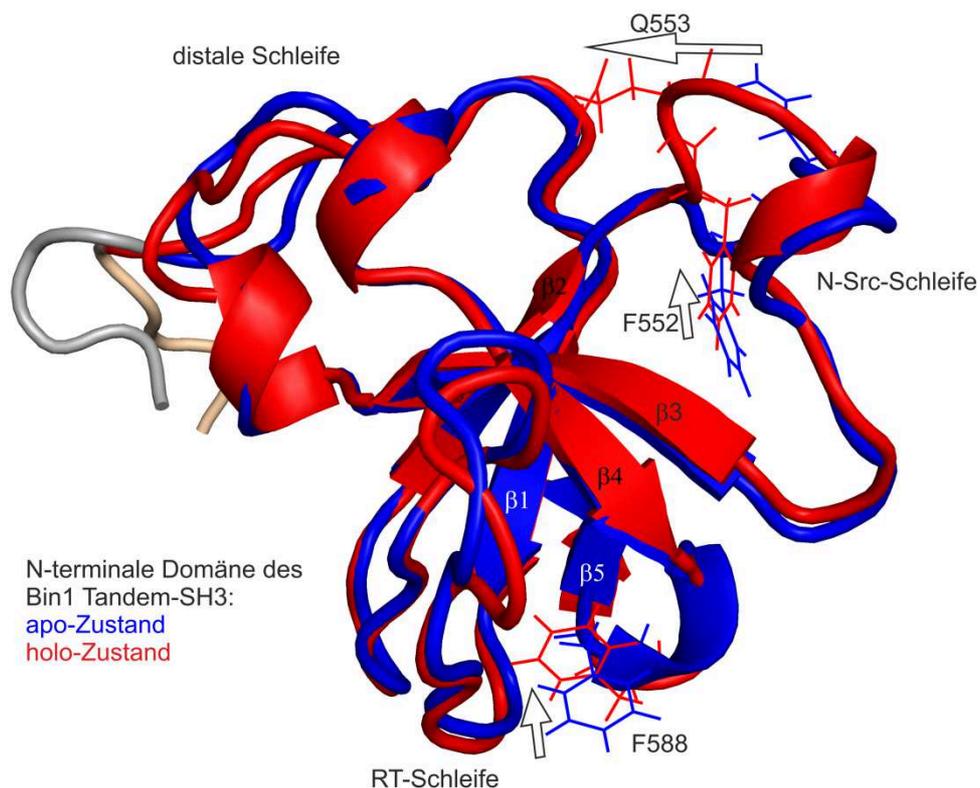


Abbildung 70. Überlagerung der N-terminalen Domäne von Bin1 Tandem-SH3 im apo- und holo-Zustand.

Die Domäne des apo-Zustands ist blau und die des holo-Zustands ist rot eingefärbt. Hervorgehoben sind ausgewählte Aminosäurereste der N-Src-Schleife und zwischen  $\beta$ -Strängen 4 und 5, die signifikante Änderungen beider Strukturen hervorheben.

Strukturelle Gemeinsamkeiten und Abweichungen konnten zwischen den beiden apo- und holo-Formen Bin1 Tandem-SH3 detektiert werden, s. Abbildung 70. Während die Sekundärstruktur der Kerndomäne wie erwartet (Larson *et al.* 2000) gleich blieb, wurden

Abweichungen in den Sekundärstrukturelementen der Schleifen erwartet und beobachtet. Geringe strukturelle Unterschiede werden in der RT-Schleife erwartet, da diese Schleife hoch konserviert ist, um sie in der Konformation zu halten, die eine Bindung überhaupt erst ermöglicht (Larson *et al.* 2000). Als das wichtigste Element der konformationellen Plastizität gilt die N-Src-Schleife, das wurde mit Klassifizierung im Ramachandran-Diagramm bestätigt. Einige Sekundärstrukturelemente bilden sich durch die Interaktion um. Zum einen bildete sich die  $3_{10}$ -Helix zwischen den  $\beta$ -Strängen 4 und 5, die ein Merkmal für den ungebundenen Zustand einer SH3-Domäne ist, zurück. Es bildeten sich jedoch zwei neue aus, einmal eine  $3_{10}$ -Helix N-terminal des  $\beta$ -Stranges 3 und zweitens folgte eine nach dem  $\beta$ -Strang 3. Damit befanden sich zwei helikale Strukturmerkmale in der distalen Schleife bei den Aminosäuren E568-Q573 und L577-C580. Andere Veröffentlichungen berichten ebenfalls von zwei  $\alpha$ -Helices zwischen den Aminosäureresten K567-H574 und L577-C580 (Owen *et al.* 1998).

Durch den Liganden öffnete sich die hydrophobe Bindetasche an der N-Src- und der distalen Schleife. F552 verschob sich vertikal von der Bindetasche und vergrößerte diese. Somit wurden hydrophobe Liganden wie NS5A(341-361) nicht nur von den hydrophoben Aminosäuren der Bindetasche gebunden, sondern auch von tertiären Aminosäureresten fixiert. Q553 wird durch eine horizontale Verschiebung eine Kompensation der Ladungen des Liganden ermöglichen, die bei NS5A(341-361) vorwiegend am C-Terminus auftreten. Ebenso verhält sich direkt an der Interaktion beteiligte F588 zwischen den  $\beta$ -Strängen 4 und 5, das sich dafür vertikal neu orientiert. Folglich wird durch diese Neuorientierung der helikale Charakter zwischen den beiden  $\beta$ -Strängen aufgebrochen und das T589  $H^1$  fixiert.

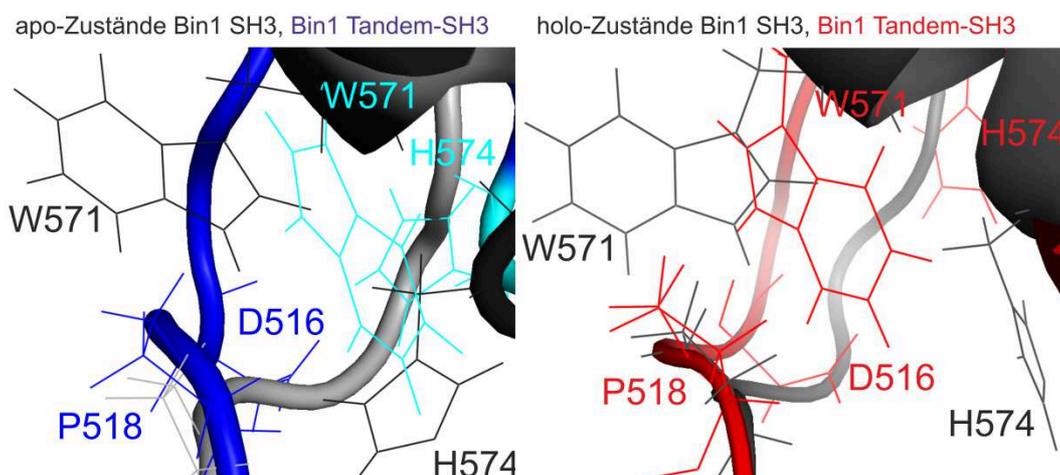


Abbildung 71. Vergleich der distalen Schleife von Bin1 (Tandem-)SH3.

Dargestellt sind links die apo-Struktur der Bin1 SH3 in grau mit den Aminosäureresten W571 und H574 in schwarz und die N-terminale Domäne des Bin1 Tandem-SH3 im apo-Zustand in blau mit den Aminosäureresten W571 und H574 in türkis. Rechts sind dieselben Aminosäurereste markiert in den holo-Zuständen mit Bin1 SH3 in schwarz und Bin1 Tandem-SH3 in rot. Bin1 SH3 ist der Proteindatenbank mit dem Zugangskode 1MUZ entnommen.

Außerdem befinden sich in der distalen Schleife, im Gegensatz zu anderen SH3-Domänen, bei Bin1 SH3 acht Aminosäurereste, somit erhält die Schleife eine Gesamtlänge von dreizehn Aminosäureresten (Larson *et al.* 2000). Die Dynamiken im Bereich der distalen Schleife, die mit NMR-Titrations für Bin1 SH3 und nicht für Bin1 Tandem-SH3 beobachtet

wurden, traten besonders an W571 und H574 hervor, s. Abbildung 71. Diese beiden Aminosäuren zeichneten sich sowohl in der apo- als auch in der holo-Form von Bin1 Tandem-SH3 im Vergleich zu Bin1 SH3 durch veränderte  $\chi$ -Winkel aus. Bei Bin1 Tandem-SH3 wurde diese Konformation durch Wechselwirkungen mit dem N-Terminus durch D516 und P518 stabilisiert, die im Fall des Bin1 SH3 nicht auftraten. Bin1 SH3 enthält zusätzlich zu anderen SH3-Domänen eine N-terminale Erweiterung der allgemein akzeptierten SH3-Kernstruktur, diese umfasst die Aminosäurereste 513-521. Diese Erweiterung ist nicht nur ein loser Linker, sondern ist ein Teil der SH3-Domäne und enthält auch keine Protease-Schnittstelle. Dieser Linker orientiert zusätzlich die SH3-Domäne in Bezug zu anderen Proteindomänen. Da sich dieser Linker in dem verwendeten Konstrukt Bin1 Tandem-SH3 wiederholte, kann auch der zweite Linker in der C-terminalen Domäne zur Domänenorientierung benutzt werden. Damit hat für Bin1 SH3 diese Schleife eine strukturelle und funktionale Bedeutung, die es noch weiter zu analysieren gilt.

### 5.3.6. Röntgenkristallographie- und NMR-Strukturen

Ein Vergleich der Strukturen von Bin1 Tandem-SH3 mittels Röntgenkristallographie und NMR ist in Abbildung 72 gezeigt. Die Bin1 Tandem-SH3 im holo-Zustand überlagerte mit einem RMSD der C $^{\alpha}$ -Atome von 0,655 Å zu beiden Strukturen des gleichen Proteins, das röntgenkristallographisch charakterisiert wurde. Damit konnte anhand der Strukturen belegt werden, dass in den Kristallisationsansätzen die Sekundärstruktur dem holo-Zustand entsprach. Alleinige Ausnahme ist die Ausbildung der  $3_{10}$ -Helix zwischen  $\beta_4$  und  $\beta_5$ , die sich bei Ligandenbindung zurückbildet und die in dieser Struktur für eine unvollständige SH3-SH3-Bindung steht. Eine Zusammenfassung aller ermittelten Sekundärstrukturelemente ist in Tabelle 33 gezeigt.

Tabelle 33. Strukturmerkmale von Bin1 Tandem-SH3 mit dem KSDSSP-Algorithmus ermittelt. Die Strukturelemente beider Domänen des Bin1 Tandem-SH3 sind aufgrund der Sequenzidentität in der NMR gleich und zusätzlich ist lediglich eine SH3-Domäne in den Elementarzellen der Kristalle vorhanden, daher wurden die Elemente nur für eine Domäne angegeben.

<b>Strukturmerkmal</b>	<b>NMR apo Form</b>	<b>NMR holo Form</b>	<b>Kristall apo-Form</b>	<b>Kristall holo-Form</b>
<b><math>\beta</math>-Strang 1</b>	523-527	523-527	524-527	524-527
<b><math>\beta</math>-Strang 2</b>	546-549	546-550	546-550	546-550
<b><math>\alpha</math>-Helix</b>		555-557	555-557	555-557
<b><math>\beta</math>-Strang 3</b>	562-567	562-567	562-567	562-567
<b><math>\alpha</math>-Helix</b>		568-572	568-572	568-572
<b><math>\alpha</math>-Helix</b>	577-580	577-580	577-580	577-580
<b><math>\beta</math>-Strang 4</b>	582-585	582-585	582-585	582-585
<b><math>3_{10}</math>-Helix</b>	586-588		586-588	586-588
<b><math>\beta</math>-Strang 5</b>	589-592	589-591	589-591	589-591

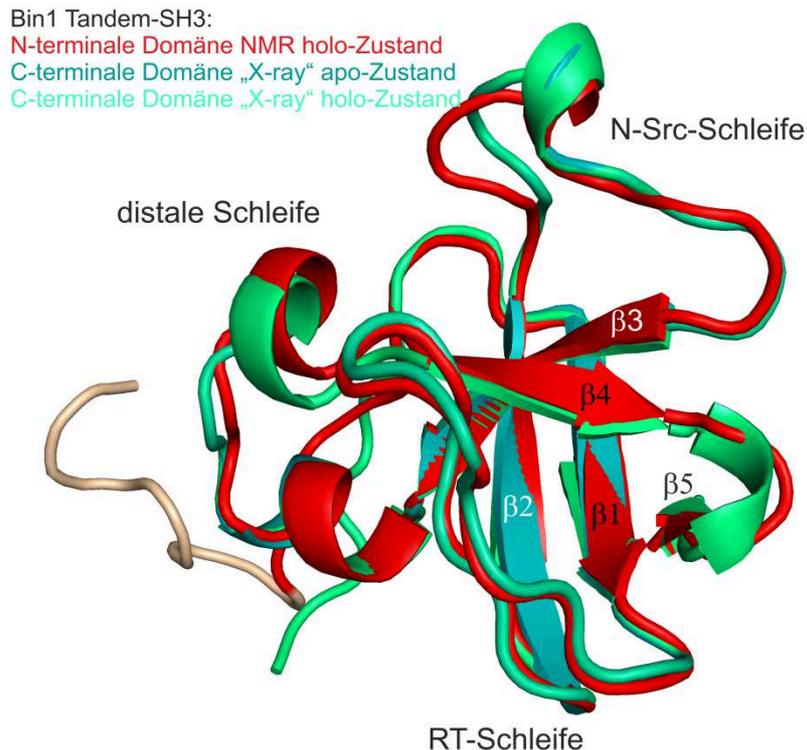


Abbildung 72. Überlagerung der Kristallstrukturen von Bin1 Tandem-SH3 mit der NMR-Struktur des holo-Proteins.

Die Kristallstruktur ohne Zugabe des Liganden NS5A(341-361) ist in dunkelgrün, die Kristallstruktur mit Zugabe des Liganden in hellgrün und die NMR-Struktur der holo-Form in rot dargestellt.

### 5.3.7. Vergleich zu anderen Strukturen

In der Kristallstruktur von Fyn SH3 mit NS5A(349-359), einem Fragment, das lediglich das PP2.2-Motiv enthielt, wird gezeigt, dass dieses Fragment zur Bindung genügt (Martin-Garcia *et al.* 2012). In der asymmetrischen Einheit werden jedoch vier Fyn SH3-Moleküle kristallisiert, davon binden drei an NS5A, nur eines zeigt die Fixierung des basischen Selektionsankers R8 in der Position wie in Abbildung 73A. In der Struktur von Fyn SH3:NS5A werden P3, P6 und R8 als Klasse II-PxxP-Motiv erkannt. Bei Bin1 SH3 und c-Myc übernehmen P57, P60 und R65 diese Positionen (Pineda-Lucena *et al.* 2005), s. Abbildung 73B. Ein struktureller Vergleich zu einem längeren NS5A-Fragment mit mehreren PxxP-Motiven ist aus mangelnder Stabilität nicht in der Literatur zugänglich, jedoch befinden sich dort andere Liganden mit mehreren Motiven. Ein anderer Ligand, der zwei nicht-kanonische PxxP-Motive aufweist, EspFu, wurde an IRTKS SH3 mittels NMR charakterisiert (Aitio *et al.* 2010). Dabei wird das N-terminale Motiv an der Spitze des RT- und N-Src-Schleife und das C-terminale an der Längsachse der RT-Schleife und der Schleife zwischen  $\beta$ -Strängen 4 und 5 fixiert. Invers verhält sich die Lage bei p67<sup>phox</sup> SH3 mit p47<sup>phox</sup> (Kami *et al.* 2002). Das N-terminale Motiv befindet sich dabei zwischen  $\beta$ 4- $\beta$ 5 und der Längsachse der RT-Schleife und das C-terminale zwischen RT- und N-Src-Schleife unter Ausbildung eines Helix-Schleife-Helix-Motifs. Die Positionen der Proline in den PxxP-Motiven von EspFu, p47<sup>phox</sup>, NS5A und c-Myc sind durch intermolekulare NOEs an der SH3-Domäne fixiert, das würde eine Überlagerung aller Strukturen zeigen.

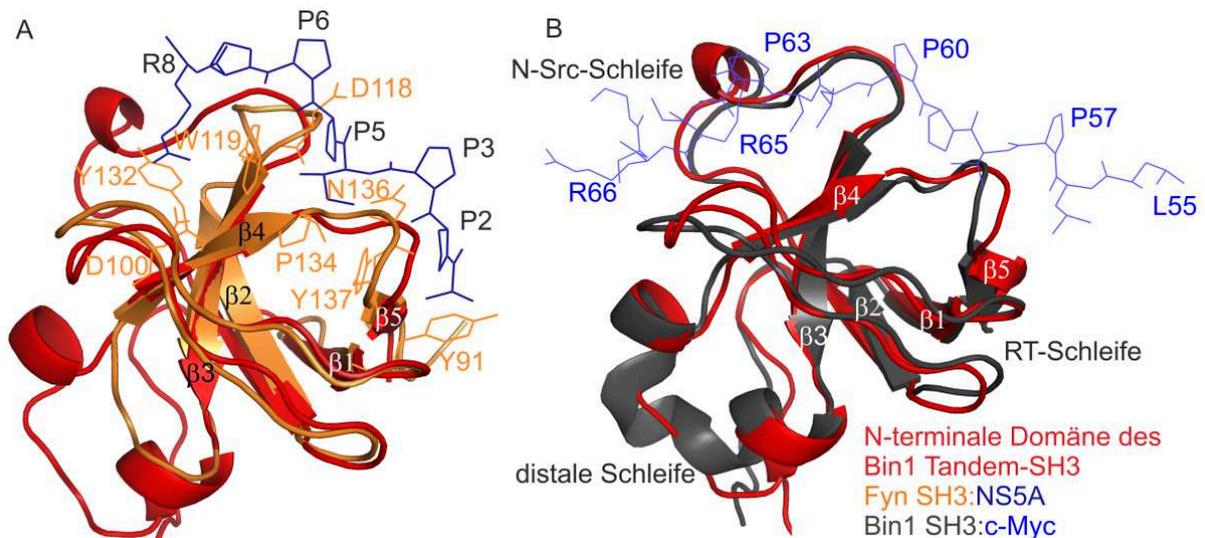


Abbildung 73. Überlagerung der Strukturen von Bin1 Tandem-SH3 und Fyn SH3 mit Ligand NS5A sowie Bin1 SH3 mit c-Myc.

Die N-terminalen Domäne des Bin1 Tandem-SH3 (rot) wird in A der Fyn SH3 (orange) und dem Ligand NS5A (blau) und in B der Bin1 SH3 (schwarz) mit Ligand c-Myc (blau) gegenübergestellt. Die Komplexstruktur Fyn SH3 mit NS5A wurde der Proteindatenbank mit dem Zugangskode 3UA7 entnommen. Bin1 SH3 wurde der Proteindatenbank mit dem Zugangskode 1MV0 entnommen.

Punktmutationen dieser Proline haben eine empfindliche Auswirkung auf die Thermodynamik der Bindung (Ferreon *et al.* 2002). Des Weiteren spielen dort nicht nur tertiäre Bindungen eine wichtige Rolle, sondern auch die vergrößerte Bindeoberfläche. Die beiden selektierenden Arginine des c-Myc werden in einer großen, negativ-geladenen Bindetasche elektrostatisch gebunden, dabei spielt die Bindung von R65 an D559 eine Schlüsselrolle. Die beiden konservierten Aminosäuren T58 und S62 können phosphoryliert werden, dabei konnte gezeigt werden, dass S62<sup>phos</sup> nicht mehr interagiert, während T58<sup>phos</sup> von der Bindetasche weg gerichtet ist und die Phosphorylierung keine Auswirkung hat. S62 ist stark an Y531, W562 und V583 fixiert (Pineda-Lucena *et al.* 2005). Somit ist die durch Phosphorylierung erhaltene Ladung das Ausschlusskriterium der Bindung an S62<sup>phos</sup>. Dieses Serin ist homolog zu entweder NS5A P345 in PP2.1 oder P354 in PP2.2. Bei der Begutachtung der NOEs von Y531, W562 und V583 in Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361) konnten NOEs zu beiden Prolinen identifiziert werden, somit kann gesagt werden, dass beide PxxP-Motive der Klasse II gebunden werden, jedoch eher ein dynamischer Komplex entstand. Ähnlich wie S62<sup>phos</sup> in c-Myc verhält sich T360<sup>phos</sup> in NS5A. Die Phosphorylierung an dieser Position führt zum Verlust der Integrität des viralen Replikationskomplexes (Cordek *et al.* 2014). Folglich könnte der Komplex Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361) besser beim Vergleich des Phosphorylierungszustandes NS5As charakterisiert werden.

## 5.4. Ausblick

Mit immer größerem Verständniszuwachs der Replikation und Assemblierung von HCV und der außerordentlichen Rolle NS5As darin, zeichnet sich ein beeindruckendes Interaktom NS5As ab. Die Charakterisierung des Komplexes von Bin1 SH3 und NS5A *in vitro* kann als transient bezeichnet werden, wurde jedoch durch Bin1 Tandem-SH3 zu einem stärker affinen Komplex im 1:1-Verhältnis. Mit Mutationsstudien können nur wenige der Interaktionsbereiche bestätigt werden, im Fall von IDPs mit ihren transienten Strukturen führt dies zu langreichweitenden Effekten, die sowohl Affinität und Spezifität betreffen, jedoch die Komplexbildung nicht verhindern. Darum bietet das Bin1 Tandem-SH3 eine hervorragende Plattform, um beide SH3-Domänen nun mit Proteinligationstechniken (David *et al.* 2004, Muona *et al.* 2008) sowie unter Verwendung von unterschiedlich isotopenmarkierten Domänen weiterhin mittels NMR zu untersuchen. Die unterschiedlich isotopenmarkierten Domänen lassen damit eine Diskriminierung beider SH3-Domänen zu. Zusätzlich kann auch der Ligand isotopenmarkiert zur Aufklärung der Komplexstruktur dienen, da nun auch Heterokerne zur Detektion des Liganden zur Verfügung stehen. Auch konnte der Komplex Bin1 Tandem-SH3 und NS5A mit seiner hohen Affinität lediglich *in vitro* charakterisiert werden und nicht *in vivo*. Unter *in vivo*-artigen Bedingungen könnte zunächst die Rolle der Phosphorylierung NS5As weiter hinsichtlich NS5A-phosphorylierender Kinasen und solchen Kinasen, die von NS5A phosphoryliert werden, untersucht werden. Die Dechiffrierung des Phosphoproteoms könnte mittels *in vitro* oder „in-cell“ NMR und Massenspektrometrie geschehen (Meistermann *et al.* 2014). Damit wäre auch eine weitere Untersuchung des Bin1 SH3:NS5A-Komplexes unter Verwendung von HCV-Replikonsystemen sinnvoll.

## 5.5. Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden erhebliche Fortschritte bei der Behandlung von Hepatitis C-Virus-Infektionen gemacht, jedoch bleibt die herausragende Rolle des Nicht-Strukturproteins 5A, NS5A, in der viralen Replikation und Partikelassemblierung weitestgehend unbekannt. NS5A des Genotyps 1 enthält in einer polyprolinreichen Region drei PxxP-Motive, eins der Klasse I und zwei der invers-orientierten Klasse II. Src-Homologie 3, SH3, -Domänen binden an diese PxxP-Motive. Eine besonders hohe Affinität wurde für das „bridging-integrator-protein 1“, Bin1, mit seiner SH3-Domäne bestimmt. Dieses Protein kommt *in vivo* als Dimer mit membrankrümmenden Eigenschaften vor. In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3, das den dimerisierten Zustand *in vivo* mit zwei sequenzgleichen SH3-Domänen und einem Linker imitiert, mit verschiedenen Konstrukten von NS5A biophysikalisch untersucht.

Zur biophysikalischen Charakterisierung wurden die fünf Proteine heterolog exprimiert und gereinigt, während zwei Peptide bestellt wurden. Mit SPR- und BLI-Experimenten wurde die mit 10 nM sehr viel höhere Affinität des Bin1 Tandem-SH3 im Vergleich mit Bin1 SH3 zu einem NS5A-Konstrukt, das alle drei PxxP-Motive enthält, festgestellt. Dabei band bei niedrigen Konzentrationen eine SH3-Domäne an das hochaffine PxxP-Motiv, anschließend unter Konformationsänderung erfolgte bei hohen lokalen Konzentrationen die Assoziation der anderen, äquivalenten SH3-Domäne des Bin1 Tandem-SH3 an den Liganden. Einen Vorteil bietet die Multivalenz des Bin1 Tandem-SH3 zur Generierung der optimalen Membrenumgebung, zu einer Rekrutierung des Replikationskomplexes zu diesen Membranen und zur Assemblierung der Virionen. Mit ITC-Messungen wurden verschiedene NS5A-Konstrukte verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass Bin1 Tandem-SH3:NS5A einen 1:1-Komplex bildeten, der besonders affin war, wenn PxxP-Motive der Klasse II gebunden hatten. Diese beiden PxxP-Motive PP2.1 und PP2.2 unterschiedlicher Affinität werden in der Replikation und der Assemblierung benötigt. Mit NMR-Titrationsen wurden kanonische und nicht-kanonische Bindestellen des NS5A und die Vorteile der multivalenten Eigenschaften Bin1 Tandem-SH3 hinsichtlich der HCV Variabilität bestätigt.

Mittels Röntgenstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie sollte der energetisch-favorisierteste Komplex Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361), ein Konstrukt mit allen drei PxxP-Motiven, strukturell aufgeklärt werden. Dabei kristallisierte Bin1 Tandem-SH3 indem beide Bindestellen über hydrophobe Wechselwirkungen selbstinteragierten. Die Zuordnung der Resonanzsignale mit NMR erfolgte für die apo- und holo-Zustände vollständig, und eine Strukturrechnung der beiden frei und gebundenen Bin1 Tandem-SH3-Zustände war erfolgreich. Ebenso erfolgte die Zuordnung des Liganden. Jedoch war die Anzahl der intermolekularen NOEs zwischen Bin1 Tandem-SH3 und NS5A(341-361) nicht ausreichend für eine Komplexstrukturbestimmung. Es bestätigte sich jedoch, dass die beiden PxxP-Motive der Klasse II von den beiden separat-agierenden SH3-Domänen in einem multivalenten Komplex gebunden wurden, jedoch ein dynamischer Komplex entstand, bei dem der Ligand über die Bindestelle gleitete.

## 5.6. Summary

In recent years, progress in the treatment of Hepatitis C virus, HCV, infections led to a greater understanding in viral life cycle. Eventhough the remarkable role of the non-structural protein 5A, NS5A, in viral replication and particle assembly remains poorly understood. NS5A of genotype 1 contains in its polyproline rich region three PxxP-motifs, one of class I and two of the invers oriented class II motifs. Src homology 3, SH3, domains can bind to the PxxP-motifs of NS5A. One of the high affinity interactors is the bridging integrator protein 1, Bin1, a protein with membrane bending properties as a homodimer. In this work, the interaction of Bin1 SH3 and Bin1 Tandem-SH3, mimicking the dimerization status *in vivo* through two sequential equivalent SH3 domains separated by a linker, with various constructs of NS5A was studied.

For biophysical characterization, five proteins were heterologous expressed and purified, while two peptides were purchased. With SPR and BLI experiments, a low affinity of 10 nM was obtained for Bin1 Tandem-SH3 and a construct of NS5A containing all three PxxP motifs. At low concentrations, one SH3 domain associated with the high affinity PxxP motif. After conformational change, the second equivalent domain of Bin1 Tandem-SH3 bound the ligand at high local concentrations. The multivalency leads to advantages in the generation of optimal membrane conditions to recruit the HCV replication complex to these membranes and to the assembly of virions. ITC measurements compared three different NS5A constructs with both Bin1 proteins. As a result, Bin1 Tandem-SH3 formed 1:1 complexes with highest affinity to both class II PxxP motifs PP2.1 and PP2.2. Those motifs are involved in replication and assembly in genotype 1 and are thus crucial for the viral life cycle. Canonic and non-canonic binding motifs of NS5A were confirmed by NMR titrations under interaction of both binding motifs to Bin1 Tandem-SH3. Consequently, a multivalent complex is advantageous for HCV variability.

The complex of Bin1 Tandem-SH3 and NS5A(341-361) containing all three PxxP motifs should be structurally defined by X-ray crystallography and NMR spectroscopy. Bin1 Tandem-SH3 crystallized in such a way that the ligand binding site was occupied by another adjacent SH3 domain. The assignment of resonance signals with NMR was completely obtained for the apo and holo state of Bin1 Tandem-SH3, which led to two successful structure calculations. Likewise, the assignment of the ligand was achieved. Yet, the number of intermolecular NOEs was too low to determine the complex structure. It was confirmed that the interaction took place separately for both SH3 domain to both class II PxxP motifs, yet the dynamic complex allowed the ligand to slide on the SH3 binding site.

## 6. Literatur

- Adams, P. D., P. V. Afonine, G. Bunkoczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L.-W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. Oeffner, R. J. Read, D. C. Richardson, J. S. Richardson, T. C. Terwilliger und P. H. Zwart (2010). "Phenix: A comprehensive python-based system for macromolecular structure solution." Acta Crystallographica Section D **66**(2): 213-221.
- Aitio, O., M. Hellman, A. Kazlauskas, D. F. Vingadassalom, J. M. Leong, K. Saksela und P. Permi (2010). "Recognition of tandem pxxp motifs as a unique src homology 3-binding mode triggers pathogen-driven actin assembly." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(50): 21743-21748.
- Aitio, O., M. Hellman, T. Kesti, I. Kleino, O. Samuilova, K. Pääkkönen, H. Tossavainen, K. Saksela und P. Permi (2008). "Structural basis of pxxdy motif recognition in sh3 binding." Journal of Molecular Biology **382**(1): 167-178.
- Aladag, A., S. Hoffmann, M. Stoldt, C. Bösing, D. Willbold und M. Schwarten (2014). "Hepatitis c virus ns5a is able to competitively displace c-myc from the bin1 sh3 domain *in vitro*." Journal of Peptide Science **20**(5): 334-340.
- Alexandropoulos, K., G. Cheng und D. Baltimore (1995). "Proline-rich sequences that bind to src homology 3 domains with individual specificities." Proceedings of the National Academy of Sciences **92**(8): 3110-3114.
- Andresen, C., S. Helander, A. Lemak, C. Farès, V. Csizmok, J. Carlsson, L. Z. Penn, J. D. Forman-Kay, C. H. Arrowsmith, P. Lundström und M. Sunnerhagen (2012). "Transient structure and dynamics in the disordered c-myc transactivation domain affect bin1 binding." Nucleic Acids Research **40**(13): 6353-6366.
- Appel, N., M. Zayas, S. Miller, J. Krijnse-Locker, T. Schaller, P. Friebe, S. Kallis, U. Engel und R. Bartenschlager (2008). "Essential role of domain iii of nonstructural protein 5a for hepatitis c virus particle assembly." PLoS Pathogens **4**(3): e1000035:1000031-1000014.
- Arai, M., K. Tsukiyama-Kohara, A. Takagi, Y. Tobita, K. Inoue und M. Kohara (2014). "Resistance to cyclosporin a derives from mutations in hepatitis c virus nonstructural proteins." Biochemical and Biophysical Research Communications **448**(1): 56-62.
- Arold, S., P. Franken, M. Strub, F. Hoh, S. Benichou, R. Benarous und C. Dumas (1997). "The crystal structure of hiv-1 nef protein bound to the fyn kinase sh3 domain suggests a role for this complex in altered t cell receptor signaling." Structure **5**(10): 1361-1372.
- Aue, W. P., E. Bartholdi und R. R. Ernst (1976). "Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance." The Journal of Chemical Physics **64**(5): 2229-2246.
- Barnett, P., G. Böttger, A. T. Klein, H. F. Tabak und B. Distel (2000). "The peroxisomal membrane protein pex13p shows a novel mode of sh3 interaction." EMBO J **19**(23): 6382-6391.
- Bartenschlager, R. und V. Lohmann (2000). "Replication of hepatitis c virus." Journal of General Virology **81**: 1631-1648.
- Bauer, F., K. Schweimer, H. Meiselbach, S. Hoffmann, P. Rösch und H. Sticht (2005). "Structural characterization of lyn-sh3 domain in complex with a herpesviral protein reveals an extended recognition motif that enhances binding affinity." Protein Science **14**(10): 2487-2498.
- Bax, A., G. M. Clore, P. C. Driscoll, A. M. Gronenborn, M. Ikura und L. E. Kay (1990). "Practical aspects of proton-carbon-carbon-proton three-dimensional correlation spectroscopy of <sup>13</sup>C-labeled proteins." Journal of Magnetic Resonance (1969) **87**(3): 620-627.
- Biasini, M., S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, T. G. Cassarino, M. Bertoni, L. Bordoli und T. Schwede (2014). "Swiss-model: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information." Nucleic Acids Research **42**(W1): W252-W258.

- Bloembergen, N., E. M. Purcell und R. V. Pound (1948). "Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption." Physical Review **73**(7): 679-712.
- Blood, P. D. und G. A. Voth (2006). "Direct observation of bin/amphiphysin/rvs (bar) domain-induced membrane curvature by means of molecular dynamics simulations." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(41): 15068-15072.
- Bohm, J., U. Yis, R. Ortac, H. Cakmakci, S. Kurul, E. Dirik und J. Laporte (2010). "Case report of intrafamilial variability in autosomal recessive centronuclear myopathy associated to a novel bin1 stop mutation." Orphanet Journal of Rare Diseases **5**(1): 35.
- Bouvignies, G., P. R. Markwick und M. Blackledge (2007). "Simultaneous definition of high resolution protein structure and backbone conformational dynamics using nmr residual dipolar couplings." Chemphyschem **8**(13): 1901-1909.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**(1-2): 248-254.
- Bunchorntavakul, C., D. Chavalitdhamrong und T. Tanwandee (2013). "Hepatitis c genotype 6: A concise review and response-guided therapy proposal." World Journal of Hepatology **5**(9): 496-504.
- Capraro, B. R., Z. Shi, T. Wu, Z. Chen, J. M. Dunn, E. Rhoades und T. Baumgart (2013). "Kinetics of endophilin n-bar domain dimerization and membrane interactions." Journal of Biological Chemistry **288**(18): 12533-12543.
- Carter, C. W. und C. W. Carter (1979). "Protein crystallization using incomplete factorial experiments." Journal of Biological Chemistry **254**(23): 2219-2223.
- Casal, E., L. Federici, W. Zhang, J. Fernandez-Recio, E.-M. Priego, R. Nunez Miguel, J. B. DuHadaway, G. C. Prendergast, B. F. Luisi und E. D. Laue (2006). "The crystal structure of the bar domain from human bin1/amphiphysin ii and its implications for molecular recognition." Biochemistry **45**(43): 12917-12928.
- Casares, S., E. AB, H. Eshuis, O. Lopez-Maxorga, N. A. van Nuland und F. Conejero-Lara (2007). "The high-resolution nmr structure of the r21a spc-sh3:P41 complex: Understanding the determinants of binding affinity by comparison with abl-sh3." Structural Biology **7**(22).
- Cassimere, E. K., S. Pyndiah und D. Sakamuro (2009). "The c-myc-interacting proapoptotic tumor suppressor bin1 is a transcriptional target for e2f1 in response to DNA damage." Cell Death and Differentiation **16**(12): 1641-1653.
- Cestra, G., L. Castagnoli, L. Dente, O. Minenkova, A. Petrelli, N. Migone, U. Hoffmüller, J. Schneider-Mergener und G. Cesareni (1999). "The sh3 domains of endophilin and amphiphysin bind to the proline-rich region of synaptojanin 1 at distinct sites that display an unconventional binding specificity." Journal of Biological Chemistry **274**(45): 32001-32007.
- Chapuis, J., F. Hansmannel, M. Gistelinc, A. Mounier, C. Van Cauwenberghe, K. V. Kolen, F. Geller, Y. Sottejeau, D. Harold, P. Dourlen, B. Grenier-Boley, Y. Kamatani, B. Delepine, F. Demiautte, D. Zelenika, N. Zommer, M. Hamdane, C. Bellenguez, J. F. Dartigues, J. J. Hauw, F. Letronne, A. M. Ayrat, K. Slegers, A. Schellens, L. V. Broeck, S. Engelborghs, P. P. De Deyn, R. Vandenberghe, M. O'Donovan, M. Owen, J. Epelbaum, M. Mercken, E. Karran, M. Bantscheff, G. Drewes, G. Joberty, D. Champion, J. N. Octave, C. Berr, M. Lathrop, P. Callaerts, D. Mann, J. Williams, L. Buee, I. Dewachter, C. Van Broeckhoven, P. Amouyel, D. Moechars, B. Dermaut und J. C. Lambert (2013). "Increased expression of bin1 mediates alzheimer genetic risk by modulating tau pathology." Mol Psychiatry **18**(11): 1225-1234.
- Chen, V. B., W. B. Arendall, III, J. J. Headd, D. A. Keedy, R. M. Immormino, G. J. Kapral, L. W. Murray, J. S. Richardson und D. C. Richardson (2010). "Molprobity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography." Acta Crystallographica Section D **66**(1): 12-21.
- Clore, G. M. und J. Iwahara (2009). "Theory, practice, and applications of paramagnetic relaxation enhancement for the characterization of transient low-population states of biological macromolecules and their complexes." Chemical Reviews **109**(9): 4108-4139.

- Cohen, S. N., A. C. Y. Chang und L. Hsu (1972). "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *escherichia coli* by r-factor DNA." Proceedings of the National Academy of Sciences **69**(8): 2110-2114.
- Cohn, E. J. und A. M. Prentiss (1927). "Studies in the physical chemistry of the proteins: Vi. The activity coefficients of the ions in certain oxyhemoglobin solutions." The Journal of General Physiology **8**(6): 619-639.
- Coletta, A., J. Pinney, D. Solis, J. Marsh, S. Pettifer und T. Attwood (2010). "Low-complexity regions within protein sequences have position-dependent roles." BMC Systems Biology **4**(1): 43.
- Cordek, D. G., T. J. Croom-Perez, J. Hwang, M. R. S. Hargittai, C. V. Subba-Reddy, Q. Han, M. F. Lodeiro, G. Ning, T. S. McCrory, J. J. Arnold, H. Koc, B. D. Lindenbach, S. A. Showalter und C. E. Cameron (2014). "Expanding the proteome of an rna virus by phosphorylation of an intrinsically disordered viral protein." Journal of Biological Chemistry **289**(35): 24397-24416.
- Cory, G. O. C. und Peter J. Cullen (2007). "Membrane curvature: The power of bananas, zeppelins and boomerangs." Current Biology **17**(12): R455-R457.
- Creamer, T. P. (1998). "Left-handed polyproline ii helix formation is (very) locally driven." Proteins: Structure, Function and Genetics **33**(2): 218-226.
- David, R., M. P. O. Richter und A. G. Beck-Sickinger (2004). "Expressed protein ligation: Methods and application." European Journal of Biochemistry **271**(4): 663-677.
- Davis, I. W., A. Leaver-Fay, V. B. Chen, J. N. Block, G. J. Kapral, X. Wang, L. W. Murray, W. B. Arendall, J. Snoeyink, J. S. Richardson und D. C. Richardson (2007). "Molprobit: All-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids." Nucleic Acids Research **35**(suppl 2): W375-W383.
- de Chassey, B., V. Navratil, L. Tafforeau, M.-S. Hiet, A. Aublin-Gex, S. Agaugué, G. Meiffren, F. Pradezynski, B. Faria, T. Chantier, M. Le Breton, J. Pellet, N. Davoust, P. Mangeot, A. Chaboud, F. Penin, Y. Jacob, P. Vidalain, M. Vidal, P. André, C. Raboutin-Combe und V. Lotteau (2008). "Hepatitis c virus infection protein network." Molecular Systems Biology **4**: 1-12.
- De Clercq, E. (2013). "Dancing with chemical formulae of antivirals: A panoramic view (part 2)." Biochemical Pharmacology **86**(10): 1397-1410.
- Delaglio, F., S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer und A. Bax (1995). "Nmrpipe: A multidimensional spectral processing system based on unix pipes." J Biomol NMR **6**(3): 277-293.
- Demers, J.-P. und A. Mittermaier (2009). "Binding mechanism of an sh3 domain studied by nmr and itc." Journal of the American Chemical Society **131**(12): 4355-4367.
- Dyson, H. J. und P. E. Wright (2005). "Intrinsically unstructured proteins and their functions." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(3): 197-208.
- Egger, D., B. Wölk, R. Gosert, L. Bianchi, H. E. Blum, D. Moradpour und K. Bienz (2002). "Expression of hepatitis c virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex." Journal of Virology **76**(12): 5974-5984.
- Elazar, M., K. H. Cheong, P. Liu, H. B. Greenberg, C. M. Rice und J. S. Glenn (2003). "Amphipathic helix-dependent localization of ns5a mediates hepatitis c virus rna replication." Journal of Virology **77**(10): 6055-6061.
- Emsley, P. und K. Cowtan (2004). "Coot: Model-building tools for molecular graphics." Acta Crystallographica Section D **60**(12 Part 1): 2126-2132.
- Emsley, P., B. Lohkamp, W. G. Scott und K. Cowtan (2010). "Features and development of coot." Acta Crystallographica Section D **66**(4): 486-501.
- Engen, J. R., T. E. Smithgall, W. H. Gmeiner und D. L. Smith (1999). "Comparison of sh3 and sh2 domain dynamics when expressed alone or in an sh(3+2) construct: The role of protein dynamics in functional regulation." J. Mol. Biol. **287**(3): 645-656.
- Evans, M. J., C. M. Rice und S. P. Goff (2004). "Phosphorylation of hepatitis c virus nonstructural protein 5a modulates its protein interactions and viral rna replication." PNAS **101**(35): 13038-13043.
- Felli, I. C. und B. Brutscher (2009). "Recent advances in solution nmr: Fast methods and heteronuclear direct detection." ChemPhysChem **10**(9-10): 1356-1368.

- Fernández, C. und G. Wider (2003). "Trosy in nmr studies of the structure and function of large biological macromolecules." Current Opinion in Structural Biology **13**(5): 570-580.
- Ferreon, J. C. und V. J. Hilser (2002). "The effect of the polyproline ii (ppii) conformation on the denatured state entropy." Protein Science **12**(3): 447-457.
- Feuerstein, S., M. J. Plevin, D. Willbold und B. Brutscher (2012a). "Ihadamac: A complementary tool for sequential resonance assignment of globular and highly disordered proteins." Journal of Magnetic Resonance **214**(1): 329-334.
- Feuerstein, S., Z. Solyom, A. Aladag, A. Favier, M. Schwarten, S. Hoffmann, D. Willbold und B. Brutscher (2012b). "Transient structure and sh3 interaction sites in an intrinsically disordered fragment of the hepatitis c virus protein ns5a." Journal of Molecular Biology **420**(4-5): 310-323.
- Foot, B. S., L. M. Spooner und P. P. Belliveau (2011). "Boceprevir: A protease inhibitor for the treatment of chronic hepatitis c." Annals of Pharmacotherapy **45**(9): 1085-1093.
- Fuxreiter, M. (2012). "Fuzziness: Linking regulation to protein dynamics." Molecular BioSystems **8**(1): 168-177.
- Gale Jr, M. J., M. J. Korth, N. M. Tang, S.-L. Tan, D. A. Hopkins, T. E. Dever, S. J. Polyak, D. R. Gretch und M. G. Katze (1997). "Evidence that hepatitis c virus resistance to interferon is mediated through repression of the pkr protein kinase by the nonstructural 5a protein." Virology **230**(2): 217-227.
- Gallop, J. L., C. C. Jao, H. M. Kent, P. J. G. Butler, P. R. Evans, R. Langen und H. T. McMahon (2006). "Mechanism of endophilin n-bar domain-mediated membrane curvature." EMBO J **25**(12): 2898-2910.
- Gardner, K. H. und L. E. Kay (1998). "The use of  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  multidimensional nmr to study the structure and dynamics of proteins." Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure **27**(1): 357-406.
- Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. E. Duvaud, M. Wilkins, R. Appel und A. Bairoch (2005). Protein identification and analysis tools on the expasy server. The proteomics protocols handbook. J. Walker, Humana Press: 571-607.
- Gawlik, K., J. Baugh, U. Chatterji, P. J. Lim, M. D. Bobardt und P. A. Gallay (2014). "Hcv core residues critical for infectivity are also involved in core-ns5a complex formation." PLoS ONE **9**(2): e88866.
- Ge, K., J. DuHadaway, D. Sakamuro, R. Wechsler-Reya, C. Reynolds und G. C. Prendergast (2000). "Losses of the tumor suppressor bin1 in breast carcinoma are frequent and reflect deficits in programmed cell death capacity." International Journal of Cancer **85**(3): 376-383.
- Gentile, I., A. R. Buonomo, E. Zappulo, G. Minei, F. Morisco, F. Borrelli, N. Coppola und G. Borgia (2014). "Asunaprevir, a protease inhibitor for the treatment of hepatitis c infection." Therapeutics and Clinical Risk Management **10**: 493-504.
- Ghahresouran, J., M. Rezazadeh, A. Khorrami, M. Ghojzadeh und M. Talebi (2014). "Genetic evidence for the involvement of variants at apoe, bin1, cr1, and picalm loci in risk of late-onset alzheimer's disease and evaluation for interactions with apoe genotypes." Journal of Molecular Neuroscience: 1-7.
- Girzalsky, W., P. Rehling, K. Stein, J. Kipper, L. Blank, W.-H. Kunau und R. Erdmann (1999). "Involvement of pep13p in pex14p localization and peroxisomal targeting signal 2-dependent protein import into peroxisomes." Journal of Cell Biology **144**(6): 1151-1162.
- Glück, J. M., B. W. Koenig und D. Willbold (2011). "Nanodiscs allow the use of integral membrane proteins as analytes in surface plasmon resonance studies." Analytical Biochemistry **408**(1): 46-52.
- Glück, J. M., M. Wittlich, S. Feuerstein, S. Hoffmann, D. Willbold und B. W. Koenig (2009). "Integral membrane proteins in nanodiscs can be studied by solution nmr spectroscopy." Journal of the American Chemical Society **131**(34): 12060-12061.
- Gold, E. S., N. S. Morrissette, D. M. Underhill, J. Guo, M. Bassetti und A. Aderem (2000). "Amphiphysin iim, a novel amphiphysin ii isoform, is required for macrophage phagocytosis." Immunity **12**(3): 285-292.
- Groemping, Y., K. Lapouge, S. J. Smerdon und K. Rittinger (2003). "Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the nadph oxidase." Cell **113**(3): 343-355.

- Grzesiek, S. und A. Bax (1992). "Correlating backbone amide and side chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance nmr." Journal of the American Chemical Society **114**(16): 6291-6293.
- Habermann, B. (2004). "The bar-domain family of proteins: A case of bending and binding?" EMBO Rep **5**(3): 250-255.
- Halliday, J., P. Klenerman und E. Barnes (2011). "Vaccination for hepatitis c virus: Closing in on an evasive target." Expert Review of Vaccines **10**(5): 659-672.
- Hanouille, X., D. Verdegem, A. Badillo, J.-M. Wieruszeski, F. Penin und G. Lippens (2009). "Domain 3 of non-structural protein 5a from hepatitis c virus is natively unfolded." Biochemical and Biophysical Research Communications **381**(4): 634-638.
- Hézode, C., G. M. Hirschfield, W. Ghesquiere, W. Sievert, M. Rodriguez-Torres, S. D. Shafran, P. J. Thuluvath, H. A. Tatum, I. Waked, G. Esmat, E. J. Lawitz, V. K. Rustgi, S. Pol, N. Weis, P. J. Pockros, M. Bourlière, L. Serfaty, J. M. Vierling, M. W. Fried, O. Weiland, M. R. Brunetto, G. T. Everson, S. Zeuzem, P. Y. Kwo, M. Sulkowski, N. Bräu, D. Hernandez, F. McPhee, M. Wind-Rotolo, Z. Liu, S. Noviello, E. A. Hughes, P. D. Yin und S. Schnittman (2014). "Daclatasvir plus peginterferon  $\alpha$  and ribavirin for treatment-naive chronic hepatitis c genotype 1 or 4 infection: A randomised study." Gut.
- Hiasa, Y., N. Horiike, S. M. F. Akbar, I. Saito, T. Miyamura, Y. Matsuura und M. Onji (1998). "Low stimulatory capacity of lymphoid dendritic cells expressing hepatitis c virus genes." Biochemical and Biophysical Research Communications **249**(1): 90-95.
- Horn, J. R., D. Russell, E. A. Lewis und K. P. Murphy (2001). "Van't hoff and calorimetric enthalpies from isothermal titration calorimetry: Are there significant discrepancies?" Biochemistry **40**(6): 1774-1778.
- Huang, L., J. Hwang, S. D. Sharma, M. R. S. Hargittai, Y. Chen, J. J. Arnold, K. D. Raney und C. E. Cameron (2005). "Hepatitis c virus nonstructural protein 5a (ns5a) is an rna-binding protein." Journal of Biological Chemistry **280**(43): 36417-36428.
- Hughes, M., S. Gretton, H. Shelton, D. D. Brown, C. J. McCormick, A. G. N. Angus, A. H. Patel, S. Griffin und M. Harris (2009). "A conserved proline between domain ii and iii of hepatitis c virus ns5a influences both rna replication and virus assembly." Journal of Virology **83**(20): 10788-10796.
- Jancarik, J. und S.-H. Kim (1991). "Sparse matrix sampling: A screening method for crystallization of proteins." Journal of Applied Crystallography **24**(4): 409-411.
- Jeener, J., B. H. Meier, P. Bachmann und R. R. Ernst (1979). "Investigation of exchange processes by two-dimensional nmr spectroscopy." The Journal of Chemical Physics **71**(11): 4546-4553.
- Kabsch, W. und C. Sander (1983). "Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features." Biopolymers **22**(12): 2577-2637.
- Kami, K., R. Takeya, H. Sumimoto und D. Kohda (2002). "Diverse recognition of non-pxxp peptide ligands by the sh3 domains from p67<sup>phox</sup>, grb2 and pex13p." EMBO J **21**(16): 4269-4276.
- Kang, H., C. Freund, J. S. Duke-Cohan, A. Musacchio, G. Wagner und C. E. Rudd (2000). "Sh3 domain recognition of a proline-independent tyrosine-based rxxyxy motif in immune cell adaptor skap55." EMBO J **19**(12): 2889-2899.
- Kapust, R. B., J. Tózsér, J. D. Fox, D. E. Anderson, S. Cherry, T. D. Copeland und D. S. Waugh (2001). "Tobacco etch virus protease: Mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency." Protein Engineering **14**(12): 993-1000.
- Karlsson, R., P. S. Katsamba, H. Nordin, E. Pol und D. G. Myszka (2006). "Analyzing a kinetic titration series using affinity biosensors." Analytical Biochemistry **349**(1): 136-147.
- Kay, L. E., M. Ikura, R. Tschudin und A. Bax (1990). "Three-dimensional triple-resonance nmr spectroscopy of isotopically enriched proteins." Journal of Magnetic Resonance (1969) **89**(3): 496-514.

- Kay, L. E., D. A. Torchia und A. Bax (1989). "Backbone dynamics of proteins as studied by nitrogen-15 inverse detected heteronuclear nmr spectroscopy: Application to staphylococcal nuclease." *Biochemistry* **28**(23): 8972-8979.
- Keeler, J. (2005). *Understanding nmr spectroscopy*. Chichester, Wiley.
- Kielec, J. M., K. G. Valentine, C. R. Babu und A. J. Wand (2009). "Reverse micelles in integral membrane protein structural biology by solution nmr spectroscopy." *Structure* **17**(3): 345-351.
- Kohno, T., H. Kusunoki, K. Sato und K. Wakamatsu (1998). "A new general method for the biosynthesis of stable isotope-enriched peptides using a decahistidine-tagged ubiquitin fusion system: An application to the production of mastoparan-x uniformly enriched with  $^{15}\text{N}$  and  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ ." *Journal of Biomolecular NMR* **12**(1): 109-121.
- Kojima, C., A. Hashimoto, I. Yabuta, M. Hirose, S. Hashimoto, Y. Kanaho, H. Sumimoto, T. Ikegami und H. Sabe (2004). "Regulation of bin1 sh3 domain binding by phosphoinositides." *EMBO J* **23**(22): 4413-4422.
- Kristensen, O., S. Guenat, I. Dar, N. Allaman-Pillet, A. Abderrahmani, M. Ferdaoussi, R. Roduit, F. Maurer, J. S. Beckmann, J. S. Kastrup, M. Gajhede und C. Bonny (2006). "A unique set of sh3-sh3 interactions controls ib1 homodimerization." *EMBO J* **25**(4): 785-797.
- Laemmli, U. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lambert, J.-C. und P. Amouyel (2011). "Genetics of alzheimer's disease: New evidences for an old hypothesis?" *Current Opinion in Genetics & Development* **21**(3): 295-301.
- Lambert, S. M., D. R. Langley, J. A. Garnett, R. Angell, K. Hedgethorpe, N. A. Meanwell und S. J. Matthews (2014). "The crystal structure of ns5a domain 1 from genotype 1a reveals new clues to the mechanism of action for dimeric hcv inhibitors." *Protein Science* **23**(6): 723-734.
- Larson, S. M. und A. R. Davidson (2000). "The identification of conserved interactions within the sh3 domain by alignment of sequences and structures." *Protein Science* **9**(11): 2170-2180.
- Laskowski, R. A., J. A. Rullmann, M. W. MacArthur, R. Kaptei und J. M. Thornton (1996). "Aqua and procheck-nmr: Programs for checking the quality of protein structures solved by nmr." *J. Biomol. NMR* **8**(4): 477-486.
- Lee, C.-H., B. Leung, M. A. Lemmon, J. Zheng, D. Cowburn, J. Kuriyan und K. Saksela (1995). "A single amino acid in the sh3 domain of hck determines its high affinity and specificity in binding to hiv-1 nef protein." *EMBO J* **14**(20): 5006-5012.
- Lemm, J. A., D. R. O'Boyle II, M. Liu, P. T. Nower, R. J. Colonno, M. S. Deshpande, L. B. Snyder, S. W. Martin, D. R. St. Laurent, M. H. Serrano-Wu, J. L. Romine, N. A. Meanwell und M. Gao (2010). "Identification of hepatitis c virus ns5a inhibitors." *Journal of Virology* **84**(1): 482-491.
- Lemon, S. M. und M. Honda (1997). "Internal ribosome entry sites within the rna genomes of hepatitis c virus and other flaviviruses." *Seminars in Virology* **8**(3): 274-288.
- Leprince, C., E. Le Scolan, B. Meunier, V. Fraissier, N. Brandon, J. De Gunzburg und J. Camonis (2003). "Sorting nexin 4 and amphiphysin 2, a new partnership between endocytosis and intracellular trafficking." *Journal of Cell Science* **116**(10): 1937-1948.
- Leprince, C., F. Romero, D. Cussac, B. Vayssiere, R. Berger, A. Tavitian und J. H. Camonis (1997). "A new member of the amphiphysin family connecting endocytosis and signal transduction pathways." *Journal of Biological Chemistry* **272**(24): 15101-15105.
- Leslie, A. G. W. und H. R. Powell (2007). Processing diffraction data with mosflm. *Evolving methods for macromolecular crystallography*. R. J. Read und J. L. Sussman. **245**: 41-51.
- Levinson, N. M., P. R. Vesperas und J. Kuriyan (2009). "The tyrosine kinase csk dimerizes through its sh3 domain." *PLoS ONE* **4**(11): 1-5.
- Li, G.-W., O. G. Berg und J. Elf (2009). "Effects of macromolecular crowding and DNA looping on gene regulation kinetics." *Nature Physics* **5**(4): 294-297.
- Li, S. S.-C. (2005). "Specificity and versatility of sh3 and other proline-recognition domains: Structural basis and implications for cellular signal transduction." *Biochem. J.* **390**(3): 641-653.

- Liang, T. J. und M. G. Ghany (2013). "Current and future therapies for hepatitis c virus infection." New England Journal of Medicine **368**(20): 1907-1917.
- Lim, W. A. und F. M. Richards (1994). "Critical residues in an sh3 domain from sem-5 suggest a mechanism for proline-rich peptide recognition." Structural Biology **1**(4): 221-225.
- Lindenbach, B. D. und C. M. Rice (2005). "Unravelling hepatitis c virus replication from genome to function." Nature **436**(7053): 933-938.
- Linge, J. P. und M. Nilges (1999). "Influence of non-bonded parameters on the quality of nmr structures: A new force field for nmr structure calculation." Journal of Biomolecular NMR **13**(1): 51-59.
- Lohmann, V., S. Hoffman, U. Herian, F. Penin und R. Bartenschlager (2003). "Viral and cellular determinants of hepatitis c virus rna replication in cell culture." Journal of Virology **77**(5): 3007-3019.
- Lok, A. S., D. F. Gardiner, E. Lawitz, C. Martorell, G. T. Everson, R. Ghalib, R. Reindollar, V. Rustgi, F. McPhee, M. Wind-Rotolo, A. Persson, K. Zhu, D. I. Dimitrova, T. Eley, T. Guo, D. M. Grasela und C. Pasquinelli (2012). "Preliminary study of two antiviral agents for hepatitis c genotype 1." New England Journal of Medicine **366**(3): 216-224.
- Love, R. A., O. Brodsky, M. J. Hickey, P. A. Wells und C. N. Cronin (2009). "Crystal structure of a novel dimeric form of ns5a domain i protein from hepatitis c virus." Journal of Virology **83**(9): 4395-4403.
- Macdonald, A., K. Crowder, A. Street, C. McCormick und M. Harris (2004). "The hepatitis c virus ns5a protein binds to members of the src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity." Journal of General Virology **85**(3): 721-729.
- Macdonald, A., S. Mazaleyrat, C. McCormick, A. Street, N. J. Burgoyne, R. M. Jackson, V. Cazeaux, H. Shelton, K. Saksela und M. Harris (2005). "Further studies on hepatitis c virus ns5a-sh3 domain interactions: Identification of residues critical for binding and implications for viral rna replication and modulation of cell signalling." Journal of General Virology **86**(4): 1035-1044.
- Majumdar, A. und E. R. Zuiderweg (1993). "Improved <sup>13</sup>c-resolved hsqc-noesy spectra in h<sub>2</sub>o, using pulsed field gradients." Journal of Magnetic Resonance **102**: 242-244.
- Majumder, M., A. K. Ghosh, R. Steele, X. Y. Zhou, N. J. Phillips, R. Ray und R. B. Ray (2002). "Hepatitis c virus ns5a protein impairs tnf-mediated hepatic apoptosis, but not by an anti-fas antibody, in transgenic mice." Virology **294**(1): 94-105.
- Marion, D., P. C. Driscoll, L. E. Kay, P. T. Wingfield, A. Bax, A. M. Gronenborn und G. M. Clore (1989). "Overcoming the overlap problem in the assignment of proton nmr spectra of larger proteins by use of three-dimensional heteronuclear proton-nitrogen-15 hartmann-hahn-multiple quantum coherence and nuclear overhauser-multiple quantum coherence spectroscopy: Application to interleukin 1β." Biochemistry **28**(15): 6150-6156.
- Markwick, P. R. L., T. Malliavin und M. Nilges (2008). "Structural biology by nmr: Structure, dynamics, and interactions." PLoS Comput Biol **4**(9): e1000168.
- Martin-Garcia, J. M., I. Luque, J. Ruiz-Sanz und A. Camara-Artigas (2012). "The promiscuous binding of the fyn sh3 domain to a peptide from the ns5a protein." Acta Crystallographica Section D **68**(8): 1030-1040.
- Masaki, T., S. Matsunaga, H. Takahashi, K. Nakashima, Y. Kimura, M. Ito, M. Matsuda, A. Murayama, T. Kato, H. Hirano, Y. Endo, S. M. Lemon, T. Wakita, T. Sawasaki und T. Suzuki (2014). "Involvement of hepatitis c virus ns5a hyperphosphorylation mediated by casein kinase i-α in infectious virus production." Journal of Virology **88**(13): 7541-7555.
- Matthews, B. W. (1968). "Solvent content of protein crystals." Journal of Molecular Biology **33**(2): 491-497.
- Mayer, B. J. (2001). "Sh3 domains: Complexity in moderation." Journal of Cell Science **114**(7): 1253-1263.
- Mayer, B. J. und D. Baltimore (1993). "Signalling through sh2 and sh3 domains." Trends in Cell Biology **3**(1): 8-13.
- McPherson, A. (1982). Preparation and analysis of protein crystals. Chichester, Wiley.

- Meistermann, H., J. Gao, S. Golling, J. Lamerz, S. Le Pogam, M. Tzouros, S. Sankabathula, L. Gruenbaum, I. Najera, H. Langen, K. Klumpp und A. Augustin (2014). "A novel immuno-competitive capture mass spectrometry strategy for protein-protein interaction profiling reveals that lats kinases regulate hcv replication through ns5a phosphorylation." Molecular & Cellular Proteomics.
- Mim, C., H. Cui, Joseph A. Gawronski-Salerno, A. Frost, E. Lyman, Gregory A. Voth und Vinzenz M. Unger (2012). "Structural basis of membrane bending by the n-bar protein endophilin." Cell **149**(1): 137-145.
- Minch, M. J. (1994). "Orientational dependence of vicinal proton-proton nmr coupling constants: The karplus relationship." Concepts in magnetic resonance **6**(1): 41-56.
- Mittag, T., L. E. Kay und J. D. Forman-Kay (2010). "Protein dynamics and conformational disorder in molecular recognition." Journal of Molecular Recognition **23**(2): 105-116.
- Muona, M., A. S. Aranko und H. Iwai (2008). "Segmental isotopic labelling of a multidomain protein by protein ligation by protein trans-splicing." ChemBioChem **9**(18): 2958-2961.
- Murphy, K. P., E. Freire und Y. Paterson (1995). "Configurational effects in antibody-antigen interactions studied by microcalorimetry." Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics **21**(2): 83-90.
- Myszka, D. G. (1999). "Kinetic, equilibrium, and thermodynamic analysis of macromolecular interactions with biacore." Methods Enzymol. **323**(2000): 325-332.
- Nanda, S. K., D. Herion und T. J. Liang (2006). "Src homology 3 domain of hepatitis c virus ns5a protein interacts with bin1 and is important for apoptosis and infectivity." Gastroenterology **130**(3): 794-809.
- Nelson, P. K., B. M. Mathers, B. Cowie, H. Hagan, D. Des Jarlais, D. Horyniak und L. Degenhardt (2011). "Global epidemiology of hepatitis b and hepatitis c in people who inject drugs: Results of systematic reviews." The Lancet **378**(9791): 571-583.
- Neudecker, P., P. Robustelli, A. Cavalli, P. Walsh, P. Lundström, A. Zarrine-Afsar, S. Sharpe, M. Vendruscolo und L. E. Kay (2012). "Structure of an intermediate state in protein folding and aggregation." Science **336**(6079): 362-366.
- Neuvonen, M., A. Kazlauskas, M. Martikainen, A. Hinkkanen, T. Ahola und K. Saksela (2011). "Sh3 domain-mediated recruitment of host cell amphiphysins by alphavirus nsp3 promotes viral rna replication." PLoS Pathog **7**(11): e1002383.
- Nieba, L., S. E. Nieba-Axmann, A. Persson, M. Hämäläinen, F. Edebratt, A. Hansson, J. Lidholm, K. Magnusson, A. F. Karlsson und A. Plückthun (1997). "Biacore analysis of histidine-tagged proteins using a chelating nta sensor chip." Analytical Biochemistry **252**(2): 217-228.
- Nilges, M., A. Bernard, B. Bardiaux, T. Malliavin, M. Habeck und W. Rieping (2008). "Accurate nmr structures through minimization of an extended hybrid energy." Structure **16**(9): 1305-1312.
- Nooren, I. M. A. und J. M. Thornton (2003). "Diversity of protein-protein interactions." The EMBO Journal **22**(14): 3486-3492.
- Owen, D. J., P. Wigge, Y. Vallis, J. D. A. Moore, P. R. Evans und H. T. McMahon (1998). "Crystal structure of the amphiphysin-2 sh3 domain and its role in the prevention of dynamin ring formation." EMBO J **17**(18): 5273-5285.
- Palencia, A., E. S. Cobos, P. L. Mateo, J. C. Martínez und 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**(2): 527-537.
- Parkin, D. M. (2006). "The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002." International Journal of Cancer **118**(12): 3030-3044.
- Pelton, J., D. Torchia, N. Meadow und S. Roseman (1993). "Tautomeric states of the active-site histidines of phosphorylated and unphosphorylated iiiglc, a signal-transducing protein from *escherichia coli*, using two-dimensional heteronuclear nmr techniques." Protein Science **2**(4): 543-558.
- Penin, F., V. Brass, N. Appel, S. Ramboarina, R. Montserret, D. Ficheux, H. E. Blum, R. Bartenschlager und D. Moradpour (2004). "Structure and function of the membrane

- anchor domain of hepatitis c virus nonstructural protein 5a." Journal of Biological Chemistry **279**(39): 40835-40843.
- Pfannkuche, A., K. Büther, J. Karthe, M. Poenisch, R. Bartenschlager, M. Trilling, H. Hengel, D. Willbold, D. Häussinger und J. G. Bode (2011). "C-src is required for complex formation between the hepatitis c virus–encoded proteins ns5a and ns5b: A prerequisite for replication." Hepatology **53**(4): 1127-1136.
- Piliarik, M., H. Vaisocherova und J. Homola (2009). Surface plasmon resonance biosensing. Methods in molecular biology: Biosensors and biodetection. A. Rasooly und K. E. Herold. **503**: 65-88.
- Pineda-Lucena, A. und C. H. Arrowsmith (2001). "Letter to the editor: <sup>1</sup>h, <sup>13</sup>c and <sup>15</sup>n resonance assignments and secondary structure of the c-myc binding domain (mbd) and the sh3 domain of the tumor suppressor bin1." Journal of Biomolecular NMR **19**(2): 191-192.
- Pineda-Lucena, A., C. S. W. Ho, D. Y. L. Mao, Y. Sheng, R. C. Laister, R. Muhandiram, Y. Lu, B. T. Seet, S. Katz, T. Szyperski, L. Z. Penn und C. H. Arrowsmith (2005). "A structure-based model of the c-myc/bin1 protein interaction shows alternative splicing of bin1 and c-myc phosphorylation are key binding determinants." Journal of Molecular Biology **351**(1): 182-194.
- Polyak, S. J., D. M. Paschal, S. McArdle, M. J. Jr, D. Moradpour und D. R. Gretch (1999). "Characterization of the effects of hepatitis c virus nonstructural 5a protein expression in human cell lines and on interferon-sensitive virus replication." Hepatology **29**(4): 1262-1271.
- Porath, J., J. A. N. Carlsson, I. Olsson und G. Belfrage (1975). "Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation." Nature **258**(5536): 598-599.
- Poynard, T., M.-F. Yuen, V. Ratzin und C. L. Lai (2003). "Viral hepatitis c." The Lancet **362**(9401): 2095-2100.
- Prabhu, N. V. und K. A. Sharp (2005). "Heat capacity in proteins." Annual Review of Physical Chemistry **56**(1): 521-548.
- Prokic, I., B. Cowling und J. Laporte (2014). "Amphiphysin 2 (bin1) in physiology and diseases." Journal of Molecular Medicine **92**(5): 453-463.
- Ramière, C., J. Rodriguez, L. S. Enache, V. Lotteau, P. André und O. Diaz (2014). "Activity of hexokinase is increased by its interaction with hepatitis c virus protein ns5a." Journal of Virology **88**(6): 3246-3254.
- Ren, G., P. Vajjhala, J. S. Lee, B. Winsor und A. L. Munn (2006). "The bar domain proteins: Molding membranes in fission, fusion, and phagy." Microbiology and Molecular Biology Reviews **70**(1): 37-120.
- Rieping, W., M. Habeck, B. Bardiaux, A. Bernard, T. E. Malliavin und M. Nilges (2007). "Aria2: Automated noe assignment and data integration in nmr structure calculation." Bioinformatics **23**(3): 381-382.
- Rosen, H. R. (2011). "Chronic hepatitis c infection." New England Journal of Medicine **364**(25): 2429-2438.
- Sabri, S., M. Idrees, S. Rafique, A. Ali und M. Iqbal (2014). "Studies on the role of ns3 and ns5a non-structural genes of hepatitis c virus genotype 3a local isolates in apoptosis." International Journal of Infectious Diseases **25**(0): 38-44.
- Saio, T., M. Yokochi, H. Kumeta und F. Inagaki (2010). "Pcs-based structure determination of protein–protein complexes." Journal of Biomolecular NMR **46**(4): 271-280.
- Sakamuro, D., K. J. Elliott, R. Wechsler-Reya und G. C. Prendergast (1996). "Bin1 is a novel myc-interacting protein with features of a tumour suppressor." Nature Genetics **14**(1): 69-77.
- Schmidt, H., S. Hoffmann, T. Tran, M. Stoldt, T. Stangler, K. Wiesehan und D. Willbold (2007). "Solution structure of a hck sh3 domain ligand complex reveals novel interaction modes." Journal of Molecular Biology **365**(5): 1517-1532.
- Schrödinger, L. (2010). "The pymol molecular graphics system."
- Schuck, P. und A. P. Minton (1996). "Kinetic analysis of biosensor data: Elementary tests for self-consistency." Trends in Biochemical Sciences **21**(12): 458-460.

- Schwarten, M., Z. Sólyom, S. Feuerstein, A. Aladağ, S. Hoffmann, D. Willbold und B. Brutscher (2013). "Interaction of nonstructural protein 5a of the hepatitis c virus with src homology 3 domains using noncanonical binding sites." *Biochemistry* **52**(36): 6160-6168.
- Shelton, H. und M. Harris (2008). "Hepatitis c virus ns5a protein binds the sh3 domain of the fyn tyrosine kinase with high affinity: Mutagenic analysis of residues within the sh3 domain that contribute to the interaction." *Virology Journal* **5**(1): 24.
- Shen, Y. und A. Bax (2010). "Prediction of xaa-pro peptide bond conformation from sequence and chemical shifts." *Journal of Biomolecular NMR* **46**(3): 199-204.
- Shen, Y. und A. Bax (2013). "Protein backbone and sidechain torsion angles predicted from nmr chemical shifts using artificial neural networks." *J Biomol NMR* **56**(3): 227-241.
- Shi, S. T., S. J. Polyak, H. Tu, D. R. Taylor, D. R. Gretch und M. M. C. Lai (2002). "Hepatitis c virus ns5a colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins." *Virology* **292**(2): 198-210.
- Shoemaker, B. A., J. J. Portman und P. G. Wolynes (2000). "Speeding molecular recognition by using the folding funnel: The fly-casting mechanism." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(16): 8868-8873.
- Simmonds, P. (1999). "Viral heterogeneity of the hepatitis c virus." *Journal of Hepatology* **31**, **Supplement 1**: 54-60.
- Simon, J. A. und S. L. Schreiber (1995). "Grb2 sh3 binding to peptides from sos: Evaluation of a general model for sh3-ligand interactions." *Chemistry & Biology* **2**(1): 53-60.
- Smith, L. S., M. Nelson, S. Naik und J. Woten (2011). "Telaprevir: An ns3/4a protease inhibitor for the treatment of chronic hepatitis c." *Annals of Pharmacotherapy* **45**(5): 639-648.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson und D. C. Klenk (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Analytical Biochemistry* **150**(1): 76-85.
- Solyom, Z., M. Schwarten, L. Geist, R. Konrat, D. Willbold und B. Brutscher (2013). "Best-trosy experiments for time-efficient sequential resonance assignment of large disordered proteins." *Journal of Biomolecular NMR* **55**(4): 311-321.
- Sun, L., M.-S. Tan, N. Hu, J.-T. Yu und L. Tan (2013). "Exploring the value of plasma bin1 as a potential biomarker for alzheimer's disease." *Journal of Alzheimer's Disease* **37**(2): 291-295.
- Tan, S.-L., H. Nakao, Y. He, S. Vijaysri, P. Neddermann, B. L. Jacobs, B. J. Mayer und M. G. Katze (1999). "Ns5a, a nonstructural protein of hepatitis c virus, binds growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**(10): 5533-5538.
- Tanji, Y., M. Hijikata, S. Satoh, T. Kaneko und K. Shimotohno (1995a). "Hepatitis c virus-encoded nonstructural protein ns4a has versatile functions in viral protein processing." *Journal of Virology* **69**(3): 1575-1581.
- Tanji, Y., T. Kaneko, S. Satoj und K. Sihimotohno (1995b). "Phosphorylation of hepatitis c virus-encoded nonstructural protein ns5a." *Journal of Virology* **69**(7): 3980-3986.
- Tellinghuisen, T. L., J. Marcotrigiano, A. E. Gorbalenya und C. M. Rice (2004). "The ns5a protein of hepatitis c virus is a zinc metalloprotein." *Journal of Biological Chemistry* **279**(47): 48576-48587.
- Tellinghuisen, T. L., J. Marcotrigiano und C. M. Rice (2005). "Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis c virus replicase." *Nature* **435**(7040): 374-379.
- Theobald, D. L. und D. S. Wuttke (2006). "Theseus: Maximum likelihood superpositioning and analysis of macromolecular structures." *Bioinformatics* **22**(17): 2171-2172.
- Villani, R., F. Bellanti und G. Serviddio (2013). Treatment of chronic hcv infection in the era of protease inhibitors. *Practical management of chronic viral hepatitis*. G. Serviddio, InTech: 167-184.
- Vranken, W. F., W. Boucher, T. C. Stevens, R. H. Fogh, A. Pajon, M. Llinas, E. L. Ulrich, J. L. Markley, J. Ionides und E. D. Laue (2005). "The ccpn data model for nmr spectroscopy: Development of a software pipeline." *Proteins* **59**(4): 687-696.

- Vuister, G. W. und A. Bax (1993). "Quantitative  $J$  correlation: A new approach for measuring homonuclear three-bond  $J(\text{HNH}\alpha)$  coupling constants in  $^{15}\text{N}$ -enriched proteins." Journal of the American Chemical Society **115**(17): 7772-7777.
- Wand, A. J., M. R. Ehrhardt und P. F. Flynn (1998). "High-resolution nmr of encapsulated proteins dissolved in low-viscosity fluids." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**(26): 15299-15302.
- Wechsler-Reya, R., D. Sakamuro, J. Zhang, J. Duhadaway und G. C. Prendergast (1997). "Structural analysis of the human bin1 gene." Journal of Biological Chemistry **272**(50): 31453-31458.
- WHO (2003) "Hepatitis c." [www.who.int/csr/disease/hepatitis/Hepc.pdf](http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/Hepc.pdf).
- Wider, G. und K. Wüthrich (1999). "Nmr spectroscopy of large molecules and multimolecular assemblies in solution." Curr. Opin. Struct. Biol. **9**(5): 594-601.
- Wigge, P., K. Köhler, Y. Vallis, C. A. Doyle, D. Owen, S. P. Hunt und H. T. McMahon (1997). "Amphiphysin heterodimers: Potential role in clathrin-mediated endocytosis." Molecular Biology of the Cell **8**(10): 2003-2015.
- Wilkins, T., J. K. Malcolm, D. Raina und R. R. Schade (2010). "Hepatitis c: Diagnosis and treatment." Am Fam Physician **81**(11): 1351-1357.
- Winn, M. D., C. C. Ballard, K. D. Cowtan, E. J. Dodson, P. Emsley, P. R. Evans, R. M. Keegan, E. B. Krissinel, A. G. W. Leslie, A. McCoy, S. J. McNicholas, G. N. Murshudov, N. S. Pannu, E. A. Potterton, H. R. Powell, R. J. Read, A. Vagin und K. S. Wilson (2011). "Overview of the ccp4 suite and current developments." Acta Crystallographica Section D **67**(4): 235-242.
- Wiseman, T., S. Williston, J. F. Brandts und L.-N. Lin (1989). "Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter." Analytical Biochemistry **179**(1): 131-137.
- Wishart, D. S., C. G. Bigam, J. Yao, F. Abildgaard, H. J. Dyson, E. Oldfield, J. L. Markley und B. D. Sykes (1995). " $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  chemical shift referencing in biomolecular nmr." Journal of Biomolecular NMR **6**(2): 135-140.
- Wittekind, M. und L. Mueller (1993). "Hncacb, a high-sensitivity 3d nmr experiment to correlate amide-proton and nitrogen resonances with the alpha-carbon and beta-carbon resonances in proteins." J. Magn. Reson. B **101**(2): 201-205.
- Wunderlich, L., A. Faragó und L. Buday (1999). "Characterization of interactions of nck with sos and dynamin." Cellular Signalling **11**(1): 25-29.
- Wüthrich, K. (2003). "Nmr studies of structure and function of biological macromolecules (nobel lecture)." Journal of Biomolecular NMR **27**(1): 13-39.
- Wüthrich, K., M. Billeter und W. Braun (1984). "Polypeptide secondary structure determination by nuclear magnetic resonance observation of short proton-proton distances." Journal of Molecular Biology **180**(3): 715-740.
- Xu, Z., J. Choi, W. Lu und J.-h. Ou (2003). "Hepatitis c virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum." Journal of Virology **77**(2): 1578-1583.
- Young, M. A., S. Gonfloni, G. Superti-Furga, B. Roux und 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**(1): 115-126.
- Zech, B., A. Kurtenbach, N. Krieger, D. Strand, S. Blencke, M. Morbitzer, K. Salassidis, M. Cotten, J. Wissing, S. Obert, R. Bartenschlager, T. Herget und H. Daub (2003). "Identification and characterization of amphiphysin ii as a novel cellular interaction partner of the hepatitis c virus ns5a protein." Journal of General Virology **84**(3): 555-560.
- Zhao, Z.-S., E. Manser und L. Lim (2000). "Interaction between pak and nck: A template for nck targets and role of pak autophosphorylation." Molecular and Cellular Biology **20**(11): 3906-3917.

## 7. Anhang

### 7.1. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole

Aminosäure	Drei-Buchstabenabkürzung	Ein-Buchstabenabkürzung
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asp	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Glu	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glyzin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleuzin	Ile	I
Leuzin	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

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
Å	Angström
Amp	Amipicillin
APS	Ammoniumperoxosulfat
Aria	„ambiguous restraints for iterative assignment“
Axxx	Absorption bei xxx nm
Bin1	Bridging-Integrator Protein 1
BLI	Bio-Layer Interferometrie
BMRB	„biological magnetic resonance bank“
CING	„common interface for NMR structure generation“
COSY	Korrelationsspektroskopie
CSP	„chemical shift perturbation“
Da	Dalton (Einheit der Molekularmasse)
ddH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
DSS	Dimethyl-2-Silapentan-5-Sulfonsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alis</i>
g	Gramm
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
His	Polyhistidin

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
<b>HSQC</b>	Heteronukleare Einzelquanten-Korrelation
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IDP</b>	intrinsisch ungefaltetes Protein
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IRES</b>	Interne Ribosomeintritsstelle
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktosid
<b>ITC</b>	Isotherme Titrationskalorimetrie
<b>K</b>	Kelvin
<b>Kan</b>	Kanamycin
<b>K<sub>D</sub></b>	Dissoziationskonstante
<b>l</b>	Liter
<b>LB</b>	„lysogeny broth“
<b>LCS</b>	„low complexity-sequence“
<b>M</b>	molar
<b>M9</b>	Minimalmedium M9
<b>min</b>	Minute
<b>MWCO</b>	Molekulargewichtsausschluss
<b>Myc</b>	Myelocytomatose
<b>NMR</b>	Kernresonanz
<b>NOE</b>	Kern-Overhauser-Effekt
<b>NOESY</b>	NOE Spektroskopie
<b>NS5A</b>	nicht-strukturelles Protein 5A
<b>NTA</b>	Nitrilotriessigsäure
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PBS</b>	Phosphatgepuffte Salzlösung
<b>PDB</b>	Proteindatenbank
<b>PFG</b>	„pulse field gradient“
<b>ppm</b>	„parts per million“
<b>PreScission</b>	Humane Rhinovirus 3C-Protease
<b>PROMEGA</b>	„proline omega angle predication form NMR“
<b>RMSD</b>	„root mean square deviation“
<b>RNAse</b>	Ribonuclease
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute, „rounds per minute“
<b>RU</b>	„response unit“
<b>s</b>	Sekunde
<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfat
<b>SH3</b>	Src Homologiedomäne 3
<b>SPR</b>	Oberflächenplasmonenresonanz
<b>Src</b>	Sarcouma
<b>TALOS</b>	„torsion angle likelihood obtained from shift and sequence similarity“
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<b>TEV</b>	„Tobacco Etch Virus“
<b>TOCSY</b>	Totale Korrelationsspektroskopie
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>TROSY</b>	Transverse relaxationsoptimierte Spektroskopie
<b>U</b>	Uniform
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>v/v</b>	Volumen pro Volumen
<b>Vis</b>	visuelles Licht
<b>w/v</b>	Masse pro Volumen
<b>xD</b>	x Dimensional
<b>xg</b>	Vielfache der Gravitationskonstante
<b>YUH1</b>	Yeast-Ubiquitin-Hydrolase 1
<b><math>\beta</math>-ME</b>	$\beta$ -Mercaptoethanol
<b><math>\delta</math></b>	Chemische Verschiebung

## 7.2. Weitere experimentelle Daten

### 7.2.1. ITC

Zur Bestimmung der ITC-Bindekurve wurden nach Kapitel 3.8.1 zunächst Puffersensorgramme detektiert. Dazu wurde die NS5A-Konstrukte in der Spritze vorgelegt und in eine Lösung aus Puffer, 1x PBS pH 7,4 2 mM TCEP injiziert. Die nachfolgenden Interaktionsmessungen erfolgten unter Vorlage von Bin1 SH3 bzw. Bin1 Tandem-SH3 in die Messzelle. Von den Rohdaten wurde die Referenzmessung subtrahiert und die Signale integriert um ITC-Bindungskurven zu erhalten.

- NS5A(347-361)

Die Referenzmessung von NS5A(347-361) in ITC-Puffer, 1x PBS pH 7,4 2 mM TCEP, ist in Abbildung 74 dargestellt. 0,7 mM NS5A(347-361) wurde in 19 Injektionen à 2 µl appliziert. Im Mittel schwankte die Differenz der Heizleistung um -0,6 µcal/s

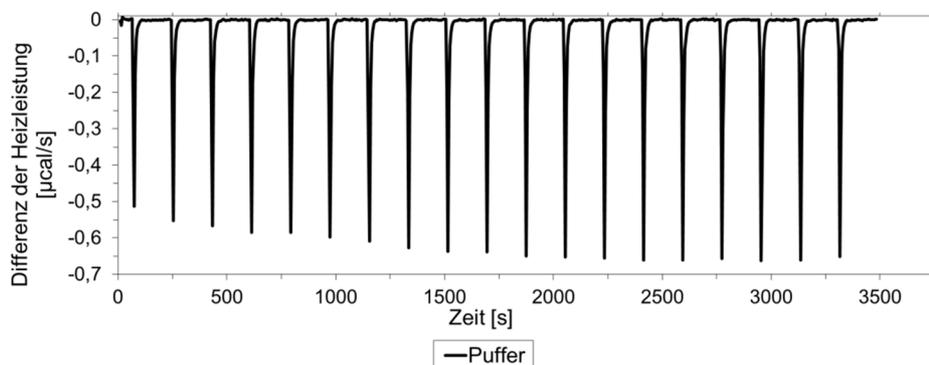


Abbildung 74. ITC-Rohdaten der Referenzmessung von NS5A(347-361) in Puffer. 0,7 mM NS5A(347-361) wurden in 19 Injektionen à 2 µl injiziert.

Die Rohdaten der ITC-Messung von 0,7 mM NS5A(347-361) in 100 µM Bin1 SH3 bei 30 °C sind in Abbildung 75 ersichtlich. Die Referenzmessung in Abbildung 74 wurden von der Interaktionsmessung subtrahiert und in Abbildung 29 dargestellt.

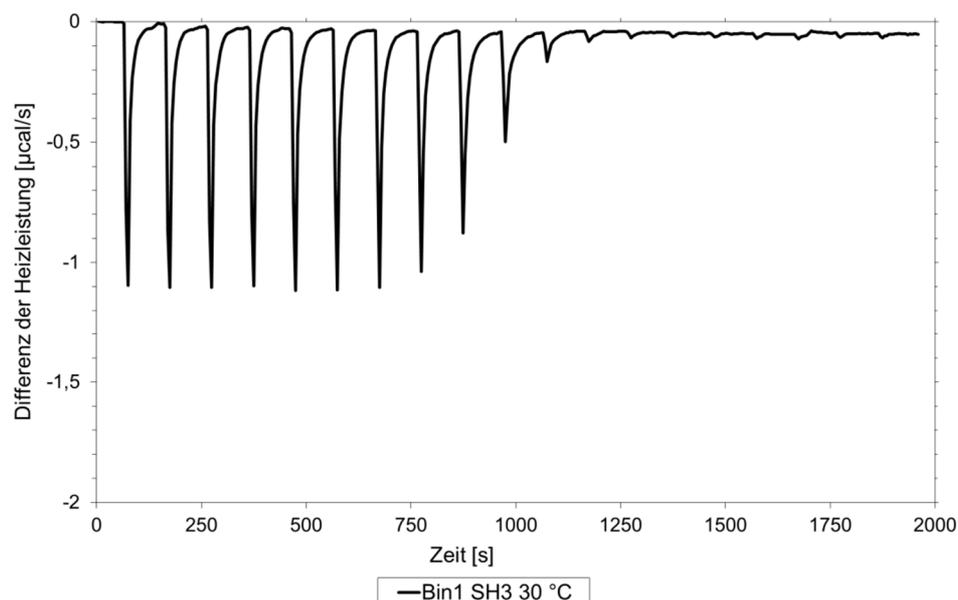


Abbildung 75. ITC-Rohdaten von NS5A(347-361) und Bin1 SH3 bei 30 °C. 1 mM NS5A(347-361) wurde in 100 µM Bin1 SH3 bei 30 °C mit 19 Injektionen à 2 µl injiziert.

Bei 37 °C wurden die Rohdaten in Abbildung 76 aufgenommen. Erneut wurden 0,7 mM NS5A(347-361) in 100  $\mu$ M Bin1 SH3 injiziert. Die Referenzmessung, s. Abbildung 74, wurde von der Interaktionsmessung subtrahiert und in Abbildung 29 dargestellt.

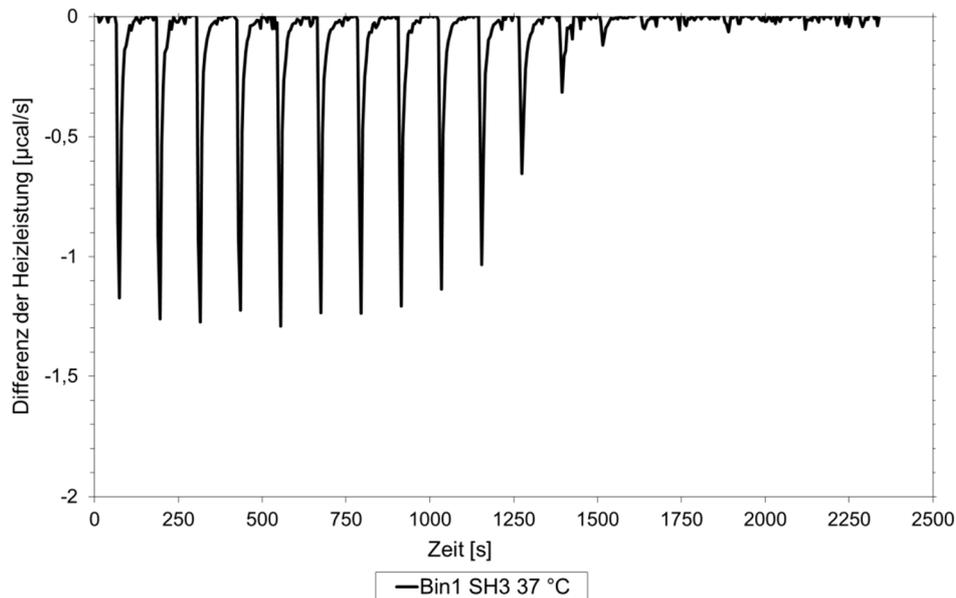


Abbildung 76. ITC-Rohdaten von NS5A(347-361) und Bin1 SH3 bei 37 °C. 0,7 mM NS5A(347-361) wurden in 100  $\mu$ M Bin1 SH3 in 19 Injektionen à 2  $\mu$ l injiziert.

Für die Messung von NS5A(347-361) und Bin1 Tandem-SH3 bei 25 °C wurden 0,7 mM NS5A(347-361) aus der Spritze in 19 Injektionen à 2  $\mu$ l in 50  $\mu$ M Bin1 Tandem-SH3 injiziert. Von den Injektionen wurden die Referenzinjektionen, s. Abbildung 74, subtrahiert, integriert und in Bindekurve, Abbildung 28, dargestellt.

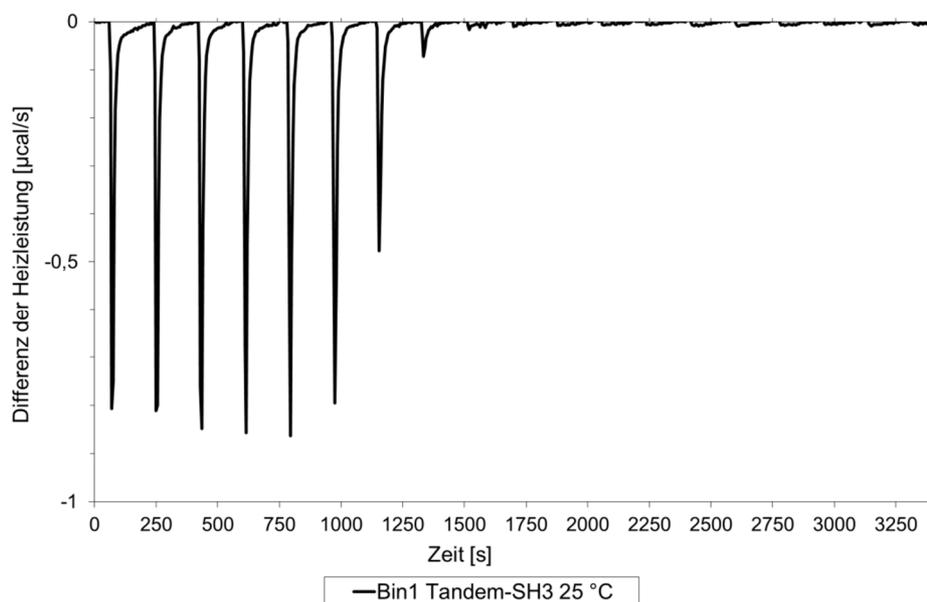


Abbildung 77. ITC-Rohdaten von NS5A(347-361) und Bin1 Tandem-SH3 bei 25 °C. 0,7 mM NS5A(347-361) wurden in 50  $\mu$ M Bin1 Tandem-SH3 injiziert.

Bei 30 °C erfolgte die Messung von 350  $\mu\text{M}$  NS5A(347-361) und 25  $\mu\text{M}$  Bin1 Tandem-SH3 mit 19 Injektionen à 2  $\mu\text{l}$ . Die Referenzmessung, s. Abbildung 74, wurde von der Interaktionsmessung, s. Abbildung 78, subtrahiert und in Abbildung 29 als Bindekurve dargestellt.

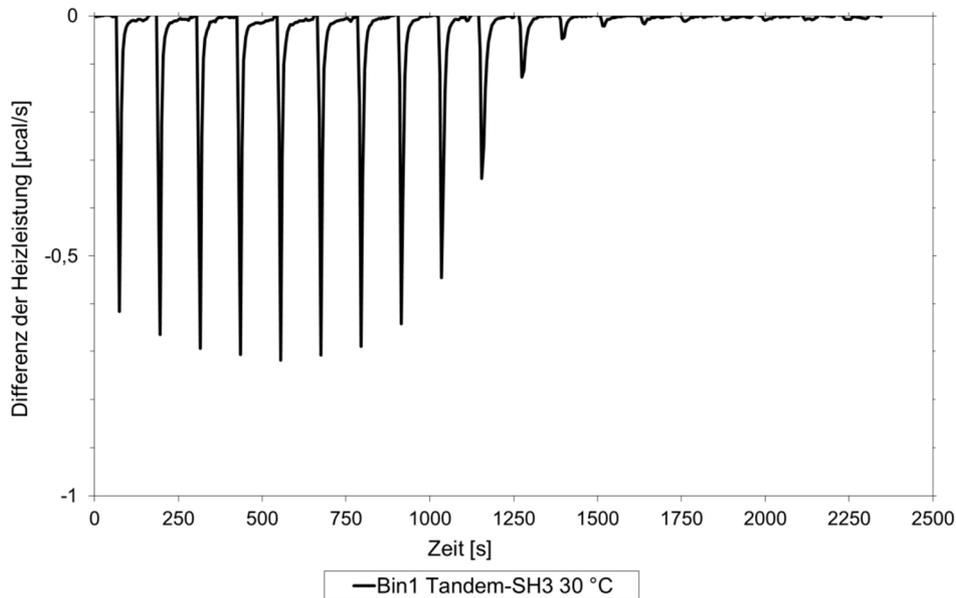


Abbildung 78. ITC-Rohdaten von NS5A(347-361) und Bin1 Tandem-SH3. 350  $\mu\text{M}$  NS5A(347-361) wurden in 19 Injektionen à 2  $\mu\text{l}$  in 25  $\mu\text{M}$  Bin1 Tandem-SH3 injiziert.

NS5A(347-361) und Bin1 Tandem-SH3 wurden bei 37 °C unter Verwendung von 350  $\mu\text{M}$  NS5A(347-361) und 25  $\mu\text{M}$  Bin1 Tandem-SH3 mit 19 Injektionen à 2  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Die Referenzmessung, s. Abbildung 74, wurde von der Interaktionsmessung subtrahiert und in Abbildung 29 dargestellt.

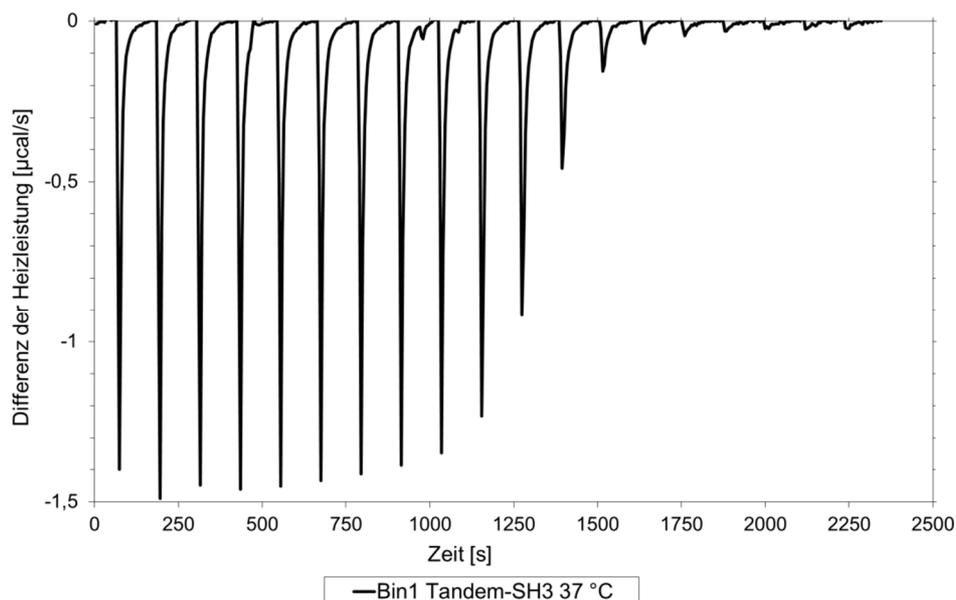


Abbildung 79. ITC-Rohdaten von NS5A(347-361) und Bin1 Tandem-SH3. 350  $\mu\text{M}$  NS5A(347-361) wurden in 19 Injektionen à 2  $\mu\text{l}$  in 25  $\mu\text{M}$  Bin1 Tandem-SH3 injiziert.

- NS5A(341-361)

Zur Referenzierung wurden von NS5A(341-361) Rohdaten mit 19 Injektionen à 2 µl einer 0,8 mM NS5A(341-361)-Lösung in ITC-Puffer, 1x PBS pH 7,4 2 mM TCEP, aufgenommen, s. Abbildung 80.

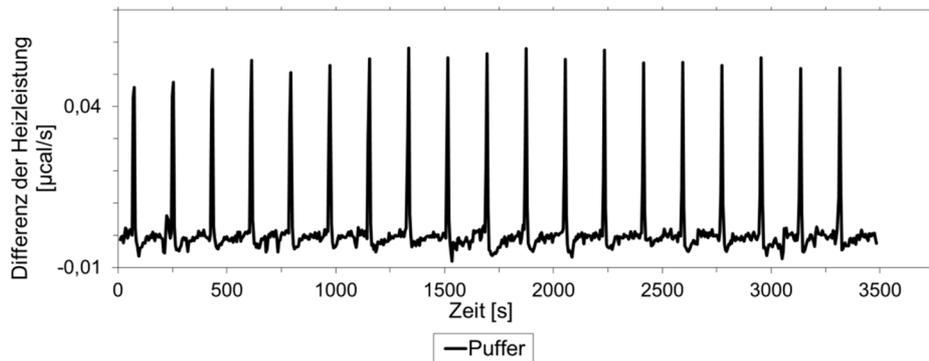


Abbildung 80. ITC-Rohdaten der Referenzmessung von NS5A(341-361) in Puffer. 0,8 mM NS5A(341-361) wurden in ITC-Puffer mit 19 Injektionen à 2 µl injiziert.

Die Interaktion zwischen NS5A(341-361) und Bin1 SH3 wurde bei 25 °C gemessen. 0,8 mM NS5A(341-361) wurden in 19 Injektionen à 2 µl in 40 µM Bin1 SH3 injiziert. Die Rohdaten, s. Abbildung 81, wurden um die Referenzmessung in Abbildung 80 subtrahiert und als Bindekurve in Abbildung 30 dargestellt.

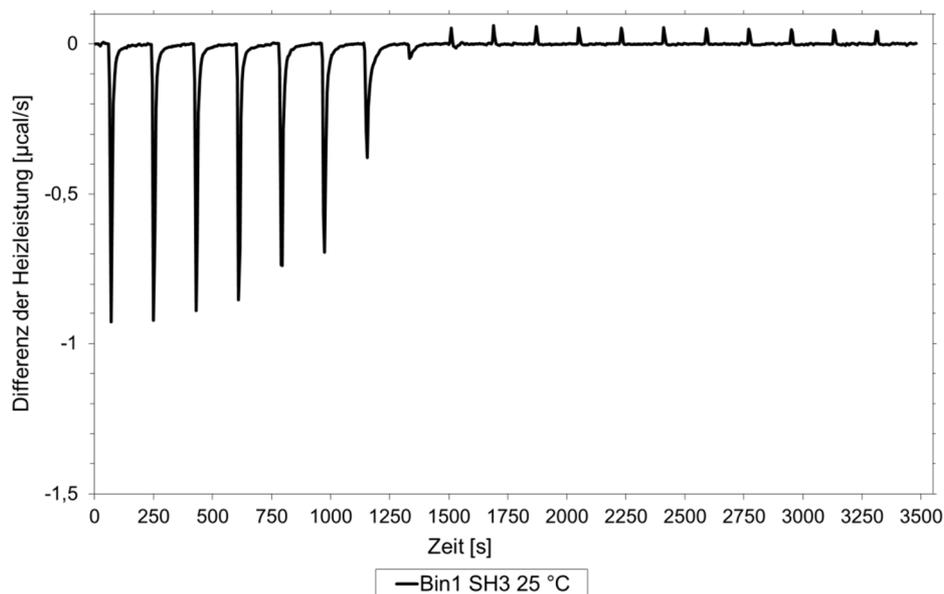


Abbildung 81. ITC-Rohdaten von NS5A(341-361) und Bin1 SH3 bei 25 °C. 0,8 mM NS5A(341-361) wurden in 40 µM Bin1 SH3 in 19 Injektionen à 2 µl injiziert.

Bei der Messung von 37 °C wurden 0,8 mM NS5A(341-361) in 40 µM Bin1 SH3 injiziert. Die Referenzmessung, s. Abbildung 80, wurden von den Rohdaten abgezogen und als Bindekurve in Abbildung 31 dargestellt.

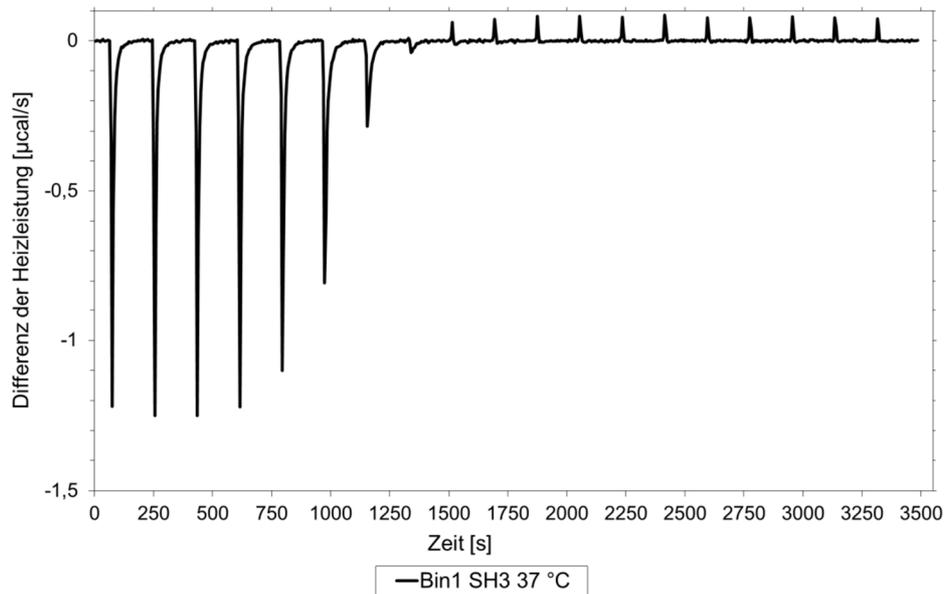


Abbildung 82. ITC-Rohdaten von NS5A(341-361) und Bin1 SH3 bei 37 °C. 0,8 mM NS5A(341-361) wurden in 40 µM Bin1 SH3 in 19 Injektionen à 2 µl injiziert.

Bin1 Tandem-SH3 mit NS5A(341-361) wurde mittels ITC analysiert, indem 0,8 mM NS5A(341-361) und 20 µM Bin1 Tandem-SH3 in 19 Injektionen à 2 µl bei 25 °C eingesetzt wurden. Die Referenzmessung, s. Abbildung 80, wurde von den Rohdaten in Abbildung 83 subtrahiert und als Bindekurve in Abbildung 30 dargestellt.

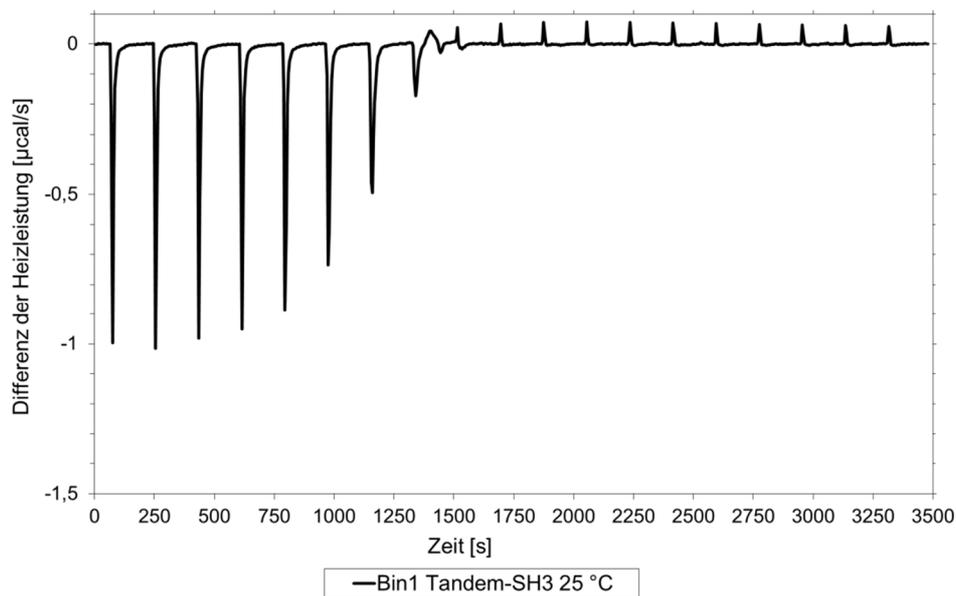


Abbildung 83. ITC-Rohdaten von NS5A(341-361) mit Bin1 Tandem-SH3 bei 25 °C. 0,8 mM NS5A(341-361) wurden zu 20 µM Bin1 Tandem-SH3 in 19 Injektionen à 2 µl injiziert.

Bei 37 °C wurde die Messung mit 0,8 mM NS5A(341-361) und 20 µM Bin1 Tandem-SH3 mit 19 Injektionen à 2 µl wiederholt. Die Referenz, s. Abbildung 80, wurde von den Rohdaten, Abbildung 84, subtrahiert und als Bindekurve, s. Abbildung 31, dargestellt.

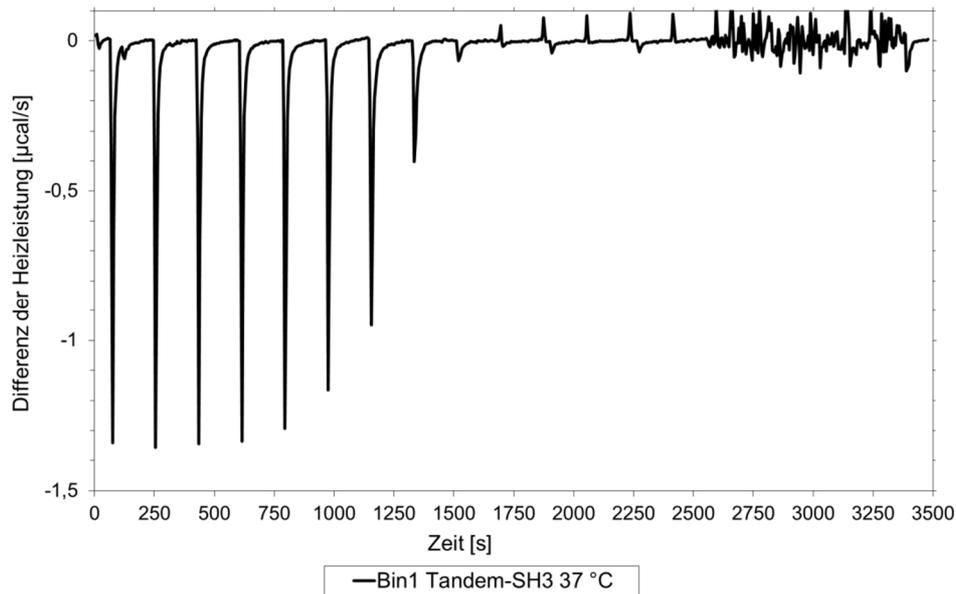


Abbildung 84. ITC-Rohdaten von NS5A(341-361) und Bin1 Tandem-SH3 bei 37 °C. 0,8 mM NS5A(341-361) wurden in 19 Injektionen à 2 µl zu 20 µM Bin1 Tandem-SH3 injiziert.

- NS5A(333-369)

Zur Bindungsstudie von Bin1 SH3 und Tandem-SH3 an His-Ubiquitin-NS5A(333-369) wurden die nachfolgenden Sensorgramme genutzt. In Abbildung 85 ist das Referenzsensorgramm der Titration von His-Ubiquitin-NS5A(333-369) in ITC-Puffer 1x PBS pH 7,4 2 mM TCEP ersichtlich. Beim gleichen Injektionsvolumen wurde eine gleichbleibende Differenz der Heizleistung von 0,08 µcal/s festgestellt.

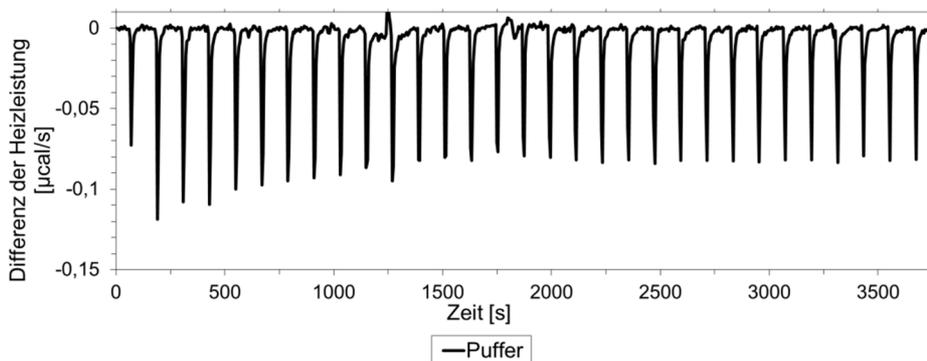


Abbildung 85. ITC-Rohdaten der Referenzmessung von His-Ubiquitin-NS5A(333-369) in Puffer. 250 µM His-Ubiquitin-NS5A(333-369) wurden in 31 Injektionen à 1,2 µl injiziert.

Die Rohdaten der Bindung von Bin1 SH3 an His-Ubiquitin-NS5A(333-369) sind in Abbildung 86 dargestellt. Es wurden 19 Injektionen à 2 µl appliziert, von 25 µM Bin1 SH3 in der Messzelle und 250 µM His-Ubiquitin-NS5A(333-369) in der Spritze. Nach Abzug der Referenzmessung, s. Abbildung 85, wurde die Bindekurve in Abbildung 32 erhalten.

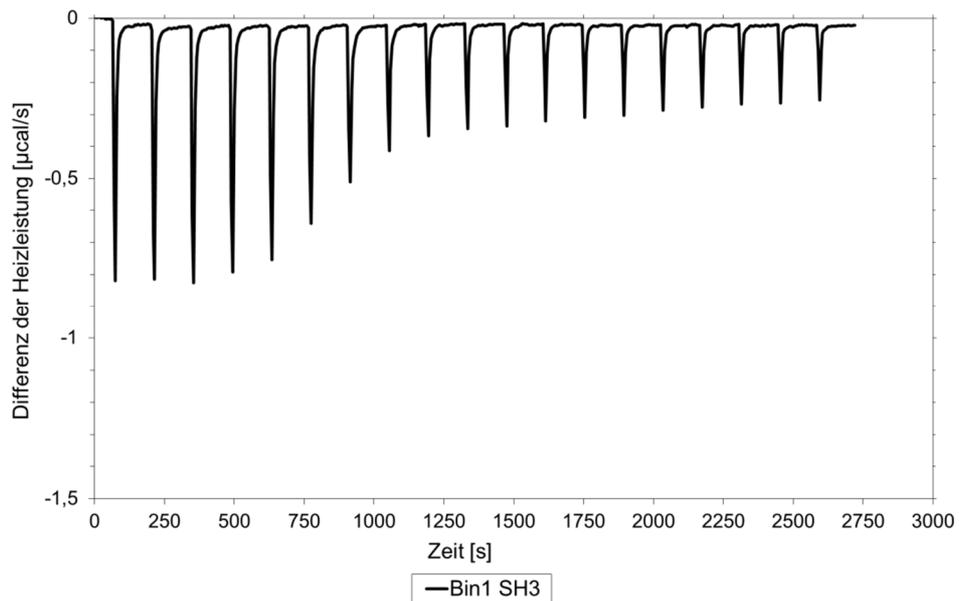


Abbildung 86. ITC-Rohdaten von His-Ubiquitin-NS5A(333-369) in Bin1 SH3. 250  $\mu\text{M}$  His-Ubiquitin-NS5A(333-369) wurden in 25  $\mu\text{M}$  Bin1 SH3 in 19 Injektionen à 2  $\mu\text{l}$  injiziert.

Ebenso erfolgten die Messungen von Bin1 Tandem-SH3 an His-Ubiquitin-NS5A(333-369). 12  $\mu\text{M}$  Bin1 Tandem-SH3 wurden in der Messzelle vorlegt und 250  $\mu\text{M}$  His-Ubiquitin-NS5A(333-369) injiziert. Von den Rohdaten in Abbildung 87 wurde die Referenzmessung in Abbildung 85 subtrahiert und die Bindekurve in Abbildung 32 erhalten.

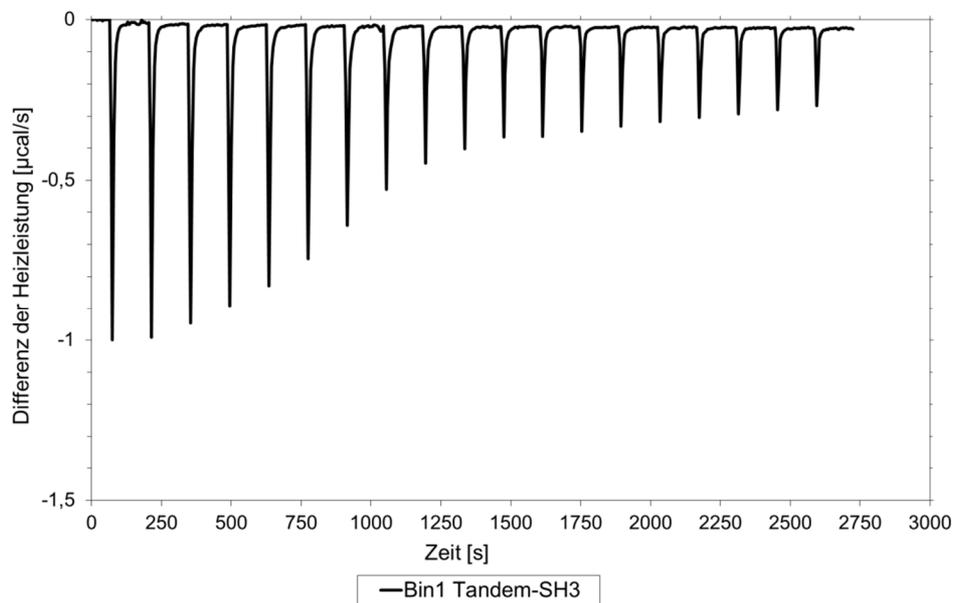


Abbildung 87. ITC-Rohdaten von His-Ubiquitin-NS5A(333-369) in Bin1 Tandem-SH3. 250  $\mu\text{M}$  His-Ubiquitin-NS5A(333-369) wurden in 12  $\mu\text{M}$  Bin1 Tandem-SH3 in 19 Injektionen à 2  $\mu\text{l}$  injiziert.

## 7.2.2. NMR-Zuordnung

Tabelle 34. Zuordnung des apo-Zustandes Bin1 Tandem-SH3

Nr.	Typ	H	N	N <sup>o</sup> /N <sup>ε</sup> /N <sup>η</sup>	H <sup>α</sup>	H <sup>β</sup>	H <sup>γ</sup>	H <sup>δ</sup>	H <sup>ε</sup> /H <sup>ζ</sup> /H <sup>η</sup>	C	C <sup>α</sup>	C <sup>β</sup>	C <sup>γ</sup>	C <sup>δ</sup>	C <sup>ε</sup> /C <sup>ζ</sup> /C <sup>η</sup>
508	Gly	-	-	-	4,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
509	Pro	-	-	-	4,45	2,29;1,92	1,99	3,53;3,55	-	176,94	63,26	32,47	27,25	49,76	-
510	Leu	8,52	122,4	-	4,34	1,62;1,61	1,62	0,91;0,88	-	177,94	55,56	42,47	27,25	25,14;23,91	-
511	Gly	8,39	109,96	-	3,98	-	-	-	-	174,13	45,45	-	-	-	-
512	Ser	8,24	115,65	-	4,48	3,86	-	-	-	174,79	58,43	64,27	-	-	-
513	Gly	8,37	110,55	-	3,92	-	-	-	-	174,86	45,21	-	-	-	-
514	Arg	7,93	121,23	85,71	4,34	1,87;1,78	1,64	3,92	7,56;7,58; 7,12;7,52	176,61	56,5	32,12	25,88	45,24	-
515	Leu	8,82	124,16	-	4,32	1,70;1,61	1,7	0,92;0,85	-	177,26	56,12	42,99	27,24	23,39;25,12	-
516	Asp	8,84	117,17	-	4,68	2,73;2,76	-	-	-	174,99	53,07	40,63	-	-	-
517	Leu	8,46	123,5	-	4,4	0,73;1,37	1,36	0,31;0,21	-	-	52,54	42,3	26,96	24,76;22,30	-
518	Pro	-	-	-	4,06	1,19;0,95	1,13;0,29	1,81;2,73	-	-	61,51	29,87	26,55	49,22	-
519	Pro	-	-	-	4,3	2,29;1,85	2,09;2,12	3,89;3,37	-	177,42	63,65	31,4	27,99	50,89	-
520	Gly	8,76	111,31	-	3,59;3,80	-	-	-	-	173,46	45,44	-	-	-	-
521	Phe	7,59	118,23	-	3,95	2,64;3,14	-	6,86	7,1;7,2	174,36	59,44	40,29	-	131,4	131,27;128,35
522	Met	8,2	127,37	-	4,04	0,79;1,90	2,33;2,44	-	1,89	-	57,27	36,11	30,96	-	16,35
523	Phe	5,91	110,8	-	4,26	3,46;3,23	-	6,81	7,11;7,2	172,63	56,6	38,51	-	131,94	130,55;129,73
524	Lys	9,11	117,99	-	5,63	1,96;1,74	1,46;1,80	1,65	2,67;2,89	176,61	55,71	36,06	26,67	30,16	42,02
525	Val	9,02	112,34	-	5,34	2,04	1,11;0,74	-	-	173,85	58,83	36,27	22,86;19,69	-	-
526	Gln	9,41	119,6	111,85	5,45	1,92;1,69	1,99	-	6,82;7,64	176,92	53,44	32,71	33,52	179,15	-
527	Ala	9,45	130,39	-	4,42	1,52	-	-	-	178	53,24	18,72	-	-	-
528	Gln	9,7	124,11	113,42	4,3	1,69;1,95	2,30;2,14	-	6,90;6,99	174,2	55,29	30,53	34,35	178,97	-
529	His	7,55	114,13	-	4,69	3,25;2,77	-	6,97	8,28	172,1	53,46	33,53	-	120,09	136,9
530	Asp	8,63	120,25	-	4,47	2,63;2,77	-	-	-	176,09	55,11	41,11	-	-	-
531	Tyr	9,12	122,36	-	4,69	2,65	-	6,83	6,82	173,95	58,68	41,93	-	132,75	117,63
532	Thr	7,75	124,99	-	4,1	3,75	1,09	-	-	172,26	61,58	69,35	21,77	-	-
533	Ala	7,75	128,66	-	4,31	1,43	-	-	-	178,83	52,68	20,13	-	-	-
534	Thr	9,14	115,4	-	4,29	4,31	1,28	-	-	173,9	62,74	70,07	22,03	-	-
535	Asp	7,7	119,35	-	4,78	2,8	-	-	-	177,08	52,98	43,36	-	-	-
536	Thr	8,79	112,09	-	4,21	4,41	1,31	-	-	174,74	64,32	69,17	22,13	-	-
537	Asp	8,64	119,31	-	4,79	2,87;2,79	-	-	-	176,02	54,57	40,34	-	-	-
538	Glu	7,59	119,03	-	5,19	2,56;2,30	2,41	-	-	175,92	55,07	32,82	36,72	-	-
539	Leu	8,84	122,09	-	4,41	1,29;1,44	1,43	0,80;0,80	-	174,47	54,04	44,41	26,7	25,76;24,53	-
540	Gln	8,01	120,98	111,8	4,65	2,06	2,39;2,54	-	7,48;6,79	176,43	55,55	28,95	33,07	180,69	-
541	Leu	8,99	124,28	-	4,97	1,15;1,91	1,73	0,54;0,55	-	176,79	53,35	45,61	26,07	24,81;24,15	-
542	Arg	9,22	125,78	-	4,81	1,71;1,72	1,71;1,59	3,2	7,49;7,18; 6,80;7,24	175,68	53,36	32,07	27,29	43,46	-
543	Ala	8,92	124,85	-	3,29	1,13	-	-	-	177,63	54,45	17,73	-	-	-
544	Gly	8,77	112,67	-	3,52;4,53	-	-	-	-	175,34	44,79	-	-	-	-
545	Asp	8,77	122,81	-	4,5	2,75;2,27	-	-	-	176,17	56,33	42,11	-	-	-
546	Val	8,61	123,58	-	4,76	2,05	1,08;0,92	-	-	176,05	62,43	32,26	22,20;22,39	-	-
547	Val	9,52	129,99	-	4,2	1,52	0,29;0,37	-	-	173,29	61,49	34,45	21,58;22,42	-	-
548	Leu	9,24	126,59	-	4,59	2,09;1,07	1,65	0,55;0,72	-	174,14	54,15	40,23	27,75	26,32;23,83	-
549	Val	8,56	126,57	-	4,39	1,14	0,91;0,80	-	-	174,88	64,34	31,31	24,65;21,77	-	-

Nr.	Typ	H	N	N <sup>o</sup> /N <sup>e</sup> /N <sup>n</sup>	H <sup>a</sup>	H <sup>b</sup>	H <sup>v</sup>	H <sup>o</sup>	H <sup>e</sup> /H <sup>v</sup> /H <sup>n</sup>	C	C <sup>a</sup>	C <sup>b</sup>	C <sup>v</sup>	C <sup>o</sup>	C <sup>e</sup> /C <sup>v</sup> /C <sup>n</sup>
550	Ile	8,1	121,9	-	4,52	1,87	0,56;0,64;1,05	0,64	-	-	58,27	39,32	25,03;17,65	13,85	-
551	Pro	-	-	-	4,36	1,70;2,33	1,9	3,80;3,36	-	177,73	62,86	32,35	28,14	50,53	-
552	Phe	8,45	119,31	-	4,13	2,84;2,71	-	7,3	7,3;7,1	176,78	59,18	39,69	-	131,65	129,5;129,38
553	Gln	8,51	122,69	112,49	4,03	2,03	2,35	-	7,55;6,84	175,88	58,27	28,88	34,11	180,22	-
554	Asn	8,13	115,32	113,29	5,16	2,68;2,85	-	7,68;6,97	-	-	50,23	39,14	177,4	-	-
555	Pro	-	-	-	4,09	1,97;2,35	1,95;2,05	3,72;3,87	-	178,13	64,89	32,23	27,41	51,12	-
556	Glu	8,72	117,48	-	4,11	2,04;1,93	2,20;2,31	-	-	177,06	58,1	28,91	36,55	-	-
557	Glu	7,73	117,68	-	4,11	2,02;2,15	2,19	-	-	175,46	56,3	30,23	36,97	-	-
558	Gln	6,96	119,49	111,38	3,35	1,62;0,58	1,62;1,85	-	6,91;7,58	174,61	55,63	28,52	33,19	180,06	-
559	Asp	8,11	127,09	-	4,64	2,52;2,23	-	-	-	175,7	53,56	42,19	-	-	-
560	Glu	8,48	122,54	-	4,11	2,01	2,27	-	-	177,84	58,14	29,77	36,2	-	-
561	Gly	8,9	112,4	-	4,24;3,78	-	-	-	-	174,32	45,44	-	-	-	-
562	Trp	8,1	122,53	130,04	4,91	3,04;3,18	-	7,03	10,13;7,24; 7,45;6,74;7,3	174,74	57,05	30,96	-	127,01	119,55;120,50; 114,28;124,68
563	Leu	8,31	121,34	-	4,69	0,58;1,11	1,17	0,94;0,96	-	172,88	52,92	46,58	27,86	26,05;22,88	-
564	Met	8,29	119,96	-	4,85	1,70;0,66	2,13;1,90	-	1,7	175,09	53,25	32,11	32,56	-	17,45
565	Gly	9,01	109,76	-	5,11;3,60	-	-	-	-	170,42	46,28	-	-	-	-
566	Val	8,52	114,29	-	4,59	1,82	1,11;0,90	-	-	174,84	58,91	35,88	22,36;20,91	-	-
567	Lys	10,3	129,04	-	4,2	1,68;2,26	1,22;1,80	1,84;1,81	2,99	177,79	59,07	31,26	27,84	29,18	42,48
568	Glu	9,02	127,18	-	3,86	1,80;2,20	2,36;2,19	-	-	177,64	60,53	30,58	37,5	-	-
569	Ser	9,19	112,92	-	4,22	3,92	-	-	-	177,07	61,29	62,15	-	-	-
570	Asp	6,7	121,89	-	4,5	2,82;2,92	-	-	-	177,92	57,64	41,3	-	-	-
571	Trp	8,37	122,24	128,58	4,44	3,26;3,14	-	7,2	10,39;7,44; 7,13;6,87;7,2	172,66	59,79	30,66	-	126,7	119,8;122,18; 114,78;124,03
572	Asn	9,04	118,19	110,15	4,16	2,92;2,83	-	7,11;7,61	-	176,46	55,27	38,06	175,58	-	-
573	Gln	7,14	116,18	111,52	4,42	2,40;2,02	2,64;2,40	-	7,28;6,89	175,04	55,98	29,74	34,94	180,72	-
574	His	7,94	112,94	-	3,61	3,26	-	6,9	8,19	174,68	57,14	25,16	-	119,7	135,84
575	Lys	7,06	116,62	-	4,19	1,59;1,69	1,43;1,43	1,64;1,53	2,92	176,69	56,95	34,39	26,52	29,72	42,61
576	Glu	8,83	122,39	-	4,14	1,94;2,10	2,4	-	-	178,66	57,18	30,01	36,75	-	-
577	Leu	9,09	130,33	-	4,13	1,91	1,63	0,96;0,96	-	178,62	59,23	42,75	27,41	25,98;25,00	-
578	Glu	9,37	114,96	-	3,84	1,92;2,06	2,40;2,31	-	-	177,37	59,62	29,25	36,83	-	-
579	Lys	7,37	114,02	-	4,48	1,90;2,06	1,51;1,41	1,69	3,00	177,12	56,41	33,65	25,65	28,88	42,43
580	Cys	7,67	113	-	4,97	2,94	2,43	-	-	174,86	58,47	29,68	-	-	-
581	Arg	8,03	122,63	85,71; 72,18	5,14	1,76;1,65	1,50;1,71	2,81;3,06	7,49;6,71; 6,83;6,76;7,45	174,84	55,61	30,76	26,33	44,38	-
582	Gly	9,00	108,48	-	3,81;4,39	-	-	-	-	171,65	46,18	-	-	-	-
583	Val	8,53	112,79	-	6,00	2,44	0,98;1,07	-	-	176,73	59,93	34,9	23,79;19,91	-	-
584	Phe	8,96	116,94	-	5,01	3,08;2,45	-	6,82	6,82;6,82	-	55,14	38,92	-	133,03	129,81;129,45
585	Pro	-	-	-	3,52	1,52;0,80	1,11;0,43	2,39;2,35	-	177,64	60,98	29,99	27,5	49,37	-
586	Glu	8,3	126,69	-	3,63	1,77;1,66	2,18;2,05	-	-	178,64	59,52	30,17	35,95	-	-
587	Asn	8,78	114,73	109,53	4,61	2,76;3,06	-	6,47;7,44	-	175,76	54,78	36,75	176,29	-	-
588	Phe	7,64	119,97	-	4,61	3,45;3,09	-	7,56	7,26;7,46	175,24	59,2	38,98	-	131,69	130,65;129,98
589	Thr	8,59	110,96	-	5,35	3,85	0,98	-	-	171,6	60,75	73,34	21,9	-	-
590	Glu	8,34	117,07	-	4,81	2,01;1,85	2,25	-	-	175,77	54,55	34,17	36,11	-	-
591	Arg	8,94	124,05	84,32	4,5	1,69;1,74	1,52;1,60	2,65;1,60	6,86;6,81;6,84	176,41	57,46	30,43	27,56	43,01	-
592	Val	7,98	121,54	-	4,31	2,02	0,84;0,95	-	-	176,25	61,78	33,87	20,79;21,61	-	-
593	Gly	8,64	112,85	-	3,96	-	-	-	-	173,92	45,41	-	-	-	-

Nr.	Typ	H	N	N <sup>o</sup> /N <sup>e</sup> /N <sup>n</sup>	H <sup>a</sup>	H <sup>b</sup>	H <sup>v</sup>	H <sup>o</sup>	H <sup>e</sup> /H <sup>s</sup> /H <sup>n</sup>	C	C <sup>a</sup>	C <sup>b</sup>	C <sup>v</sup>	C <sup>o</sup>	C <sup>e</sup> /C <sup>s</sup> /C <sup>n</sup>
594	Leu	8,13	121,62	-	4,22	1,40;1,45	1,44	0,85;0,83	-	177,21	55,84	42,67	27,07	24,86;23,99	-
595	Tyr	8,28	119,99	-	4,61	2,93;3,10	-	7,11	6,81	175,87	57,81	38,81	-	132,97	117,84
596	Ser	8,06	117,06	-	4,35	3,83	-	-	-	174,33	58,52	64,02	-	-	-
597	Glu	8,48	123,06	-	4,25	2,05;1,95	2,26	-	-	176,47	57,01	30,26	36,31	-	-
598	Arg	8,25	121,55	-	4,3	1,84;1,73	1,61	3,14	-	176,09	56,18	30,99	27,22	43,54	-
599	Ala	8,31	125,16	-	4,31	1,38	-	-	-	177,8	52,74	19,42	-	-	-
600	Ser	8,28	114,99	-	4,43	4,31	-	-	-	174,35	58,47	64,01	-	-	-
601	Asn	8,4	120,57	112,72	4,76	2,77;2,82	-	7,58;6,89	-	175,33	53,36	39,23	177,22	-	-
602	Gly	8,2	108,66	-	3,9	-	-	-	-	173,31	45,27	-	-	-	-
603	Arg	7,92	121,23	85,72	4,34	1,87;1,78	1,64	3,91	7,57;7,12; 7,52;7,58	176,61	56,5	32,12	25,88	45,24	-
604	Leu	8,81	124,13	-	4,32	1,71;1,61	1,7	0,85;0,92	-	177,26	56,12	42,99	27,24	23,39;25,12	-
605	Asp	8,84	117,16	-	4,68	2,73;2,76	-	-	-	174,99	53,07	40,63	-	-	-
606	Leu	8,46	123,51	-	4,4	1,37;0,73	1,36	0,31;0,21	-	-	52,54	42,3	26,96	24,76;22,30	-
607	Pro	-	-	-	4,06	0,95;1,19	1,13;0,29	1,81;2,73	-	-	61,51	29,87	26,55	49,22	-
608	Pro	-	-	-	4,3	2,29;1,85	2,09;2,12	3,89;3,37	-	177,42	63,65	31,4	27,99	50,89	-
609	Gly	8,76	111,31	-	3,59;3,80	-	-	-	-	173,46	45,44	-	-	-	-
610	Phe	7,59	118,23	-	3,95	2,64;3,14	-	6,86	7,09;7,12	174,36	59,44	40,29	-	131,4	131,27;128,24
611	Met	8,19	127,33	-	4,04	0,79;1,90	2,33;2,44	-	1,89	-	57,27	36,11	30,96	-	16,35
612	Phe	5,89	110,52	-	4,22	3,46;3,17	-	6,8	7,11;7,2	172,66	56,59	38,55	-	131,93	130,56;129,73
613	Lys	9,03	117,69	-	5,63	1,75;1,95	1,46;1,80	1,64	2,89;2,66	176,61	55,71	36,04	26,68	30,16	42,02
614	Val	9,03	112,43	-	5,34	2,04	0,74;1,11	-	-	173,79	58,83	36,25	19,68;22,87	-	-
615	Gln	9,36	119,64	111,86	5,45	1,91;1,69	1,98	-	7,64;6,82	176,92	53,44	32,7	33,53	179,17	-
616	Ala	9,44	130,37	-	4,42	1,52	-	-	-	178,00	53,25	18,72	-	-	-
617	Gln	9,7	124,11	113,77	4,3	1,95;1,69	2,14;2,30	-	7,07;6,89	174,2	55,28	30,54	34,36	178,98	-
618	His	7,55	114,13	-	4,69	2,77;3,25	-	6,97	8,28	172,1	53,46	33,53	-	120,09	136,9
619	Asp	8,63	120,25	-	4,47	2,63;2,77	-	-	-	176,09	55,11	41,11	-	-	-
620	Tyr	9,12	122,36	-	4,69	2,65	-	6,83	6,82	173,95	58,68	41,93	-	132,75	117,63
621	Thr	7,75	124,99	-	4,1	3,75	1,09	-	-	172,26	61,58	69,35	21,77	-	-
622	Ala	7,75	128,66	-	4,31	1,43	-	-	-	178,83	52,68	20,13	-	-	-
623	Thr	9,14	115,4	-	4,29	4,31	1,28	-	-	173,9	62,74	70,07	22,03	-	-
624	Asp	7,7	119,35	-	4,78	2,8	-	-	-	177,08	52,98	43,36	-	-	-
625	Thr	8,79	112,09	-	4,21	4,41	1,31	-	-	174,74	64,32	69,17	22,13	-	-
626	Asp	8,64	119,31	-	4,79	2,79;2,87	-	-	-	176,02	54,57	40,34	-	-	-
627	Glu	7,59	119,03	-	5,19	2,30;2,56	2,41	-	-	175,92	55,07	32,82	36,72	-	-
628	Leu	8,84	122,1	-	4,41	1,29;1,44	1,43	0,80;0,80	-	174,47	54,04	44,41	26,7	25,76;24,53	-
629	Gln	8,01	120,98	111,8	4,65	2,06	2,54;2,39	-	7,48;6,79	176,43	55,55	28,95	33,07	180,69	-
630	Leu	8,99	124,28	-	4,97	1,15;1,91	1,73	0,55;0,54	-	176,79	53,35	45,61	26,07	24,15;24,81	-
631	Arg	9,22	125,78	-	4,81	1,72;1,71	1,71;1,59	3,2	7,49;6,80; 7,18;7,24	175,68	53,36	32,07	27,29	43,46	-
632	Ala	8,92	124,85	-	3,29	1,13	-	-	-	177,63	54,45	17,73	-	-	-
633	Gly	8,77	112,67	-	3,52;4,53	-	-	-	-	175,34	44,79	-	-	-	-
634	Asp	8,77	122,81	-	4,5	2,27;2,75	-	-	-	176,17	56,33	42,11	-	-	-
635	Val	8,61	123,57	-	4,76	2,05	0,92;1,08	-	-	176,05	62,43	32,26	22,20;22,40	-	-
636	Val	9,57	130,12	-	4,2	1,52	0,37;0,29	-	-	173,29	61,5	34,45	21,58;22,42	-	-
637	Leu	9,24	126,6	-	4,59	1,07;2,09	1,65	0,55;0,72	-	174,14	54,16	40,24	27,75	23,84;26,32	-
638	Val	8,55	126,55	-	4,39	1,14	0,80;0,91	-	-	174,88	64,34	31,31	21,77;24,65	-	-

Nr.	Typ	H	N	N <sup>o</sup> /N <sup>e</sup> /N <sup>n</sup>	H <sup>a</sup>	H <sup>b</sup>	H <sup>v</sup>	H <sup>o</sup>	H <sup>e</sup> /H <sup>v</sup> /H <sup>n</sup>	C	C <sup>a</sup>	C <sup>b</sup>	C <sup>v</sup>	C <sup>o</sup>	C <sup>e</sup> /C <sup>v</sup> /C <sup>n</sup>
639	Ile	8,1	121,9	-	4,52	1,87	0,56;0,64;1,05	0,64	-	-	58,27	39,32	25,03;17,65	13,85	-
640	Pro	-	-	-	4,36	1,70;2,33	1,9	3,80;3,36	-	177,73	62,86	32,35	28,14	50,53	-
641	Phe	8,45	119,31	-	4,13	2,84;2,71	-	7,3	7,3;7,1	176,78	59,18	39,69	-	131,65	129,5;129,38
642	Gln	8,51	122,69	112,49	4,03	2,03	2,35	-	6,84;7,55	175,88	58,27	28,88	34,11	180,22	-
643	Asn	8,13	115,32	113,29	5,16	2,85;2,68	-	7,68;6,97	-	-	50,23	39,14	177,4	-	-
644	Pro	-	-	-	4,09	2,35;1,97	2,05;1,95	3,87;3,72	-	178,13	64,89	32,23	27,41	51,12	-
645	Glu	8,72	117,48	-	4,11	2,04;1,93	2,20;2,31	-	-	177,06	58,1	28,91	36,55	-	-
646	Glu	7,73	117,68	-	4,11	2,15;2,02	2,19	-	-	175,46	56,3	30,23	36,97	-	-
647	Gln	6,96	119,49	111,38	3,35	0,58;1,62	1,62;1,85	-	7,58;6,91	174,61	55,63	28,52	33,19	180,06	-
648	Asp	8,11	127,09	-	4,64	2,23;2,52	-	-	-	175,7	53,56	42,19	-	-	-
649	Glu	8,48	122,54	-	4,11	2,01	2,27	-	-	177,84	58,14	29,77	36,2	-	-
650	Gly	8,9	112,4	-	4,24;3,78	-	-	-	-	174,32	45,44	-	-	-	-
651	Trp	8,1	122,53	130,04	4,91	3,18;3,04	-	7,03	7,24;10,13; 7,45;6,74;7,3	174,74	57,05	30,96	-	127,01	119,55;114,28; 120,50;124,68
652	Leu	8,31	121,34	-	4,69	1,11;0,58	1,17	0,94;0,96	-	172,88	52,92	46,58	27,86	26,05;22,88	-
653	Met	8,29	119,96	-	4,85	0,66;1,70	2,13;1,90	-	1,7	175,09	53,25	32,11	32,56	-	17,45
654	Gly	9,01	109,76	-	3,60;5,11	-	-	-	-	170,42	46,28	-	-	-	-
655	Val	8,52	114,29	-	4,59	1,82	1,11;0,90	-	-	174,84	58,91	35,88	20,91;22,36	-	-
656	Lys	10,3	129,04	-	4,2	1,68;2,26	1,22;1,80	1,81;1,84	2,99	177,79	59,07	31,26	27,84	29,18	42,48
657	Glu	9,02	127,18	-	3,86	2,20;1,80	2,36;2,20	-	-	177,64	60,53	30,58	37,5	-	-
658	Ser	9,19	112,92	-	4,22	3,92	-	-	-	177,07	61,29	62,15	-	-	-
659	Asp	6,7	121,89	-	4,5	2,92;2,82	-	-	-	177,92	57,64	41,3	-	-	-
660	Trp	8,37	122,23	128,58	4,44	3,14;3,26	-	7,2	7,44;10,39; 7,13;6,87;7,2	172,66	59,79	30,66	-	126,7	119,8;122,18; 114,78;124,02
661	Asn	9,04	118,19	110,15	4,16	2,92;2,83	-	7,61;7,11	-	176,46	55,27	38,06	175,58	-	-
662	Gln	7,14	116,18	111,52	4,42	2,02;2,40	2,40;2,64	-	6,89;7,28	175,04	55,98	29,74	34,94	180,72	-
663	His	7,94	112,94	-	3,61	3,26	-	6,9	8,2	174,68	57,14	25,16	-	119,7	136,88
664	Lys	7,06	116,62	-	4,19	1,59;1,69	1,43;1,43	1,64;1,53	2,92	176,69	56,95	34,39	26,52	29,72	42,61
665	Glu	8,83	122,4	-	4,14	1,94;2,10	2,4	-	-	178,66	57,18	30,01	36,75	-	-
666	Leu	9,09	130,34	-	4,13	1,91	1,63	0,96;0,96	-	178,62	59,23	42,75	27,41	25,00;25,98	-
667	Glu	9,37	114,96	-	3,84	2,06;1,92	2,31;2,40	-	-	177,37	59,62	29,25	36,83	-	-
668	Lys	7,37	114,02	-	4,48	2,06;1,90	1,51;1,41	1,69	3,00	177,12	56,41	33,65	25,65	28,88	42,43
669	Cys	7,67	113	-	4,97	2,94	2,43	-	-	174,86	58,47	29,68	-	-	-
670	Arg	8,03	122,63	85,71; 72,18	5,14	1,76;1,65	1,71;1,50	2,81;3,06	7,49;6,71;6,76; 7,45;6,83	174,84	55,61	30,76	26,33	44,38	-
671	Gly	9,00	108,48	-	3,81;4,39	-	-	-	-	171,65	46,18	-	-	-	-
672	Val	8,53	112,79	-	6,00	2,44	0,98;1,07	-	-	176,73	59,93	34,9	19,91;23,79	-	-
673	Phe	8,96	116,94	-	5,01	2,45;3,08	-	6,82	6,82;6,82	-	55,14	38,92	-	133,03	129,81;129,45
674	Pro	-	-	-	3,52	1,52;0,80	0,43;1,11	2,39;2,35	-	177,64	60,98	29,99	27,5	49,37	-
675	Glu	8,3	126,69	-	3,62	1,65;1,77	2,05;2,18	-	-	178,64	59,52	30,17	35,95	-	-
676	Asn	8,78	114,73	109,53	4,61	3,06;2,76	-	7,44;6,47	-	175,76	54,78	36,75	176,29	-	-
677	Phe	7,65	119,97	-	4,61	3,45;3,09	-	7,56	7,26;7,46	175,24	59,2	38,98	-	131,69	130,65;129,98
678	Thr	8,59	110,96	-	5,35	3,85	0,99	-	-	171,64	60,75	73,34	21,9	-	-
679	Glu	8,29	116,96	-	4,81	1,85;2,01	2,24	-	-	175,62	54,56	34,19	36,07	-	-
680	Arg	8,85	123,71	84,61	4,52	1,89;1,70	1,57;1,65	2,73	6,92;6,83;6,91; 6,98;6,81	176,04	57,54	30,34	27,65	42,97	-
681	Val	7,66	125,35	-	4,19	2,12	0,75;0,91	-	-	-	63,27	34,04	20,41;22,27	-	-

Tabelle 35. Zuordnung des holo-Zustandes Bin1 Tandem-SH3

Nr.	Typ	H	N	N <sup>o</sup> /N <sup>c</sup>	H <sup>a</sup>	H <sup>b</sup>	H <sup>v</sup>	H <sup>o</sup>	H <sup>a</sup> /H <sup>b</sup> /H <sup>n</sup>	C	C <sup>a</sup>	C <sup>b</sup>	C <sup>v</sup>	C <sup>o</sup>	C <sup>a</sup> /C <sup>b</sup> /C <sup>n</sup>
508	Gly	-	-	-	4,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
509	Pro	-	-	-	4,45	1,92;2,29	1,99	3,55	-	177,00	62,89	32,12	26,87	49,42	-
510	Leu	8,52	122,4	-	4,33	1,61	1,64	0,88;0,92	-	177,94	55,17	42,09	26,85	23,37;24,75	-
511	Gly	8,39	109,95	-	3,98	-	-	-	-	174,13	45,06	-	-	-	-
512	Ser	8,23	115,59	-	4,47	3,85	5,27	-	-	174,77	58,05	63,88	-	-	-
513	Gly	8,36	110,48	-	3,91	-	-	-	-	173,3	44,82	-	-	-	-
514	Arg	7,91	121,2	-	4,33	1,76;1,84	1,59;1,64	3,9	7,61;7,61;7,52	176,65	56,08	31,78	25,5	44,87	-
515	Leu	8,83	124,18	-	4,3	1,70;1,60	1,69	0,84;0,91	-	177,29	55,81	42,64	26,88	24,79;23,05	-
516	Asp	8,83	117,07	-	4,67	2,73;2,75	-	-	-	174,97	52,69	40,27	-	-	-
517	Leu	8,46	123,43	-	4,39	1,36;0,70	1,34	0,30;0,19	-	-	52,16	41,92	26,63	21,95;24,40	-
518	Pro	-	-	-	4,05	1,18;0,95	1,13;0,27	1,79;2,71	-	-	61,16	29,51	26,2	48,86	-
519	Pro	-	-	-	4,29	1,84;2,28	2,11;2,09	3,36;3,88	-	177,43	63,29	31,04	27,63	50,53	-
520	Gly	8,77	111,28	-	3,58;3,79	-	-	-	-	173,45	45,08	-	-	-	-
521	Phe	7,58	118,2	-	3,94	3,14;2,63	-	6,85	7,09;7,17	174,35	59,1	39,92	-	131,35	131,22;128,32
522	Met	8,19	127,41	-	4,03	0,79;1,92	2,34;2,43	-	1,88	174,26	56,94	35,71	30,58	-	15,99
523	Phe	5,9	110,71	-	4,25	3,45;3,21	-	6,79	7,11;7,18	172,59	56,31	38,13	-	131,9	130,58;129,57
524	Lys	9,11	117,9	-	5,6	1,73;1,95	1,45;1,78	1,59;1,66	2,66;2,87	176,51	55,33	35,74	26,28	29,87	41,64
525	Val	8,99	112,31	-	5,31	2,03	1,11;0,70	-	-	173,83	58,44	35,85	19,50;22,51	-	-
526	Gln	9,43	119,55	111,87	5,41	1,91;1,67	1,97	-	7,63;6,83	176,94	53,11	32,34	33,16	-	-
527	Ala	9,47	130,49	-	4,4	1,56	-	-	-	177,94	52,94	18,32	-	-	-
528	Gln	9,77	124,19	113,68	4,25	1,70;1,86	2,31;2,14	-	6,99;6,87	173,6	54,66	30,27	34,22	-	-
529	His	7,44	115,11	-	4,61	3,17;2,57	-	6,62	7,59	172,79	53,68	35,58	-	120,18	138,22
530	Asp	8,65	119,74	-	4,5	2,79;2,66	-	-	-	176,09	54,46	40,76	-	-	-
531	Tyr	9,09	121,62	-	4,76	2,55;2,74	-	6,9	6,77	174,02	58,4	41,46	-	132,73	117,17
532	Thr	7,66	125,39	-	4,08	3,73	1,09	-	-	172,14	61,24	68,9	21,3	-	-
533	Ala	7,67	128,15	-	4,29	1,45	-	-	-	179,1	52,89	19,65	-	-	-
534	Thr	9,13	113,83	-	4,42	4,4	1,26	-	-	173,64	61,41	70,00	21,6	-	-
535	Asp	7,55	119,19	-	4,83	2,82;2,57	-	-	-	177,51	52,03	43,34	-	-	-
536	Thr	9,44	112,55	-	4,17	4,44	1,33	-	-	174,49	63,79	68,58	21,94	-	-
537	Asp	8,39	118,95	-	4,79	3,15;2,57	-	-	-	175,51	52,62	39,59	-	-	-
538	Glu	7,33	118,74	-	5,21	2,54;2,28	2,37	-	-	176,39	54,49	32,39	36,38	-	-
539	Leu	8,9	121,88	-	4,39	1,37;1,38	1,43	0,85;0,73	-	174,58	53,77	43,89	26,28	23,49;25,71	-
540	Gln	7,95	120,02	111,71	4,72	2,07	2,54;2,39	-	7,51;6,80	176,51	55,04	28,69	32,55	-	-
541	Leu	9,1	124,31	-	4,98	1,19;1,97	1,76	0,60;0,64	-	176,84	52,97	45,06	25,79	23,66;24,61	-
542	Arg	9,22	125,88	85,6	4,85	1,71	1,58;1,70	3,2	7,21	175,66	53,01	31,72	26,92	43,09	-
543	Ala	9,00	125,22	-	3,29	1,08	-	-	-	177,66	54,14	17,25	-	-	-
544	Gly	8,78	112,81	-	4,52;3,50	-	-	-	-	175,39	44,38	-	-	-	-
545	Asp	8,79	122,87	-	4,49	2,75;2,28	-	-	-	176,15	55,95	41,7	-	-	-
546	Val	8,63	123,63	-	4,77	2,03	1,06;0,91	-	-	176,07	61,97	31,88	21,82;22,04	-	-
547	Val	9,49	129,89	-	4,17	1,41	0,26;0,26	-	-	173,21	61,14	33,95	22,18;21,02	-	-
548	Leu	9,2	126,61	-	4,57	2,08;1,06	1,65	0,54;0,71	-	174,14	53,82	39,88	27,44	25,87;23,57	-
549	Val	8,55	126,38	-	4,38	-	0,90;0,81	-	-	174,88	64,01	30,88	21,42;24,25	-	-
550	Ile	8,07	121,78	-	4,52	1,86	0,62;1,01;0,55	0,62	-	-	57,93	39,00	24,63;17,34	13,51	-
551	Pro	-	-	-	4,35	2,33;1,67	1,9	3,79;3,34	-	177,86	62,4	32,04	27,79	50,17	-
552	Phe	8,42	118,95	-	4,06	2,74;2,72	-	7,32	7,32;7,15	176,83	58,98	39,16	-	131,76	131,26;129,28
553	Gln	8,63	123,31	112,47	4,04	2,02	2,36	-	6,84;7,55	175,92	57,92	28,52	33,77	-	-

Nr.	Typ	H	N	N <sup>o</sup> /N <sup>c</sup>	H <sup>a</sup>	H <sup>b</sup>	H <sup>v</sup>	H <sup>o</sup>	H <sup>f</sup> /H <sup>s</sup> /H <sup>n</sup>	C	C <sup>a</sup>	C <sup>b</sup>	C <sup>v</sup>	C <sup>o</sup>	C <sup>f</sup> /C <sup>s</sup> /C <sup>n</sup>
554	Asn	8,08	114,98	113,33	5,17	2,87;2,70	-	7,67;6,99	-	-	49,78	38,97	-	-	-
555	Pro	-	-	-	4,07	1,95;2,36	2,04	3,88;3,74	-	178,37	64,57	31,89	27,1	50,84	-
556	Glu	8,65	117,38	-	4,07	2,01;1,97	2,26	-	-	177,21	57,95	28,48	36,01	-	-
557	Glu	7,74	116,83	-	4,04	2,15;2,13	2,23	-	-	175,64	55,98	30,18	36,86	-	-
558	Gln	6,81	119,48	110,96	3,1	0,31;1,53	1,73	-	7,72;6,97	174,8	56,05	27,92	33,04	-	-
559	Asp	7,71	126,89	-	4,69	2,58;2,21	-	-	-	174,92	53,67	44,39	-	-	-
560	Glu	8,69	123,4	-	4,1	2,00;1,98	2,29	-	-	178,02	58,03	29,17	35,96	-	-
561	Gly	8,86	113,05	-	3,75;4,28	-	-	-	-	173,72	45,28	-	-	-	-
562	Trp	8,32	122,04	130,4	4,83	3,27;3,01	-	6,88	7,19;9,34; 7,37;6,66;7,34	174,84	56,6	30,26	-	125,43	120,11;113,42; 119,47;124,11
563	Leu	8,24	121,09	-	4,74	0,57;1,14	1,15	0,92;0,95	-	173,05	52,32	46,09	27,6	22,53;25,65	-
564	Met	8,34	120,43	-	4,8	1,70;0,49	2,11;1,87	-	1,69	175,11	52,99	30,84	32,13	-	16,94
565	Gly	9,1	110,25	-	5,14;3,56	-	-	-	-	170,54	45,8	-	-	-	-
566	Val	8,51	114,32	-	4,56	1,8	0,87;1,10	-	-	174,85	58,69	35,48	22,07;20,47	-	-
567	Lys	10,27	129,06	-	4,18	2,26;1,67	1,82;1,21	1,83;1,84	2,98	177,77	58,69	30,85	27,45	28,83	42,12
568	Glu	9,00	127,14	-	3,85	2,19;1,79	2,18;2,34	-	-	177,62	60,17	30,21	37,17	-	-
569	Ser	9,18	112,86	-	4,22	3,91;3,90	-	-	-	177,07	60,9	61,78	-	-	-
570	Asp	6,69	121,81	-	4,49	2,91;2,83	-	-	-	177,89	57,25	40,96	-	-	-
571	Trp	8,35	122,16	128,46	4,44	3,25;3,13	-	7,19	10,38;7,43; 6,86;7,15;7,19	180,07	59,42	30,31	-	126,7	119,76;114,77; 122,12;123,96
572	Asn	9,06	118,04	110,09	4,15	2,90;2,85	-	7,61;7,10	-	176,45	54,89	37,69	-	-	-
573	Gln	7,14	116,15	111,51	4,41	2,01;2,40	2,39;2,64	-	6,90;7,28	175,03	55,59	29,41	34,62	-	-
574	His	7,93	112,98	-	3,58	3,24	-	6,88	8,13	174,74	56,89	24,9	-	119,89	135,88
575	Lys	7,04	116,57	-	4,19	1,67;1,60	1,42	1,53;1,64	2,91;2,92	176,71	56,54	34,06	26,18	29,38	42,24
576	Glu	8,82	122,46	-	4,12	1,94;2,09	2,38;2,39	-	-	178,69	56,8	29,63	36,39	-	-
577	Leu	9,08	130,44	-	4,12	1,91	1,63	0,96;0,96	-	178,66	58,87	42,32	27,05	25,62;24,60	-
578	Glu	9,31	114,97	-	3,85	2,06	2,37;2,32	-	-	177,45	59,17	28,96	36,42	-	-
579	Lys	7,36	113,96	-	4,46	2,05;1,89	1,49;1,41	1,68	2,99	177,15	56,11	33,3	25,32	28,55	42,03
580	Cys	7,67	112,93	-	4,96	2,94	-	-	-	174,91	58,1	29,35	-	-	-
581	Arg	8,05	122,71	85,53	5,12	1,75;1,65	1,70;1,48	3,04;2,81	7,46;6,79	174,74	55,29	30,44	25,95	44,01	-
582	Gly	9,02	108,96	-	3,76;4,33	-	-	-	-	171,67	45,59	-	-	-	-
583	Val	8,83	112,35	-	6,07	2,48	1,09;0,90	-	-	176,72	59,36	34,38	23,66;19,44	-	-
584	Phe	9,18	117,57	-	5,06	2,94;2,59	-	6,86	7,42;7,29	-	54,56	39,15	-	131,99	130,69;129,5
585	Pro	-	-	-	3,26	0,18;1,79	1,00;0,04	2,47;2,24	-	177,19	60,41	29,22	26,89	48,25	-
586	Glu	8,28	128,08	-	3,57	1,85;1,54	2,05;2,19	-	-	178,17	59,36	29,58	35,72	-	-
587	Asn	9,02	116,52	104,91	4,51	3,05;2,83	-	6,54;7,04	-	175,39	54,21	35,28	-	-	-
588	Phe	7,81	122,03	-	4,44	3,22;3,37	-	7,33	7,34;6,89	175,41	59,43	38,66	-	131,78	131,16;130,02
589	Thr	8,69	111,26	-	5,36	3,84	5,17;1,02	-	-	171,52	60,49	73,07	21,42	-	-
590	Glu	8,32	116,98	-	4,82	1,83;1,99	2,25	-	-	175,75	54,19	33,91	35,8	-	-
591	Arg	8,93	124,07	84,29	4,49	1,73;1,70	1,58;1,55	1,59;2,66	6,82;7,11;6,85	176,44	57,09	30,09	27,22	42,66	-
592	Val	7,97	121,46	-	4,3	2,00	0,94;0,83	-	-	176,25	61,43	33,48	21,28;20,48	-	-
593	Gly	8,63	112,81	-	3,96	-	-	-	-	173,91	45,08	-	-	-	-
594	Leu	8,13	121,57	-	4,21	1,39;1,45	1,42	0,84;0,82	-	177,21	55,48	42,32	26,7	23,64;24,53	-
595	Tyr	8,27	119,97	-	4,6	3,09;2,93	-	7,11	6,8	175,85	57,49	38,4	-	132,92	117,83
596	Ser	8,05	117,04	-	4,33	3,8	-	-	-	174,32	58,16	63,61	-	-	-
597	Glu	8,47	123,05	-	4,26	2,04;1,94	2,25	-	-	176,46	56,64	29,87	36,02	-	-
598	Arg	8,24	121,51	-	4,29	1,83;1,73	1,61	3,15	-	176,08	55,89	30,63	26,86	43,17	-

Nr.	Typ	H	N	N <sup>o</sup> /N <sup>c</sup>	H <sup>a</sup>	H <sup>b</sup>	H <sup>v</sup>	H <sup>o</sup>	H <sup>f</sup> /H <sup>s</sup> /H <sup>n</sup>	C	C <sup>a</sup>	C <sup>b</sup>	C <sup>v</sup>	C <sup>o</sup>	C <sup>f</sup> /C <sup>s</sup> /C <sup>n</sup>
599	Ala	8,3	125,14	-	4,31	1,38	-	-	-	177,8	52,39	19,05	-	-	-
600	Ser	8,27	114,94	-	4,42	3,84;3,86	-	-	-	174,34	58,1	63,61	-	-	-
601	Asn	8,4	120,51	112,7	4,76	2,79;2,76	-	6,88;7,58	-	175,31	52,93	38,89	-	-	-
602	Gly	8,19	108,64	-	3,9	-	-	-	-	173,3	44,83	-	-	-	-
603	Arg	7,91	121,21	-	4,33	1,84;1,76	1,59;1,64	3,9	7,61;7,61;7,52	176,64	56,08	31,78	25,5	44,87	-
604	Leu	8,83	124,14	-	4,3	1,60;1,70	1,69	0,91;0,84	-	177,29	55,81	42,64	26,88	24,79;23,05	-
605	Asp	8,83	117,07	-	4,67	2,75;2,73	-	-	-	174,97	52,69	40,27	-	-	-
606	Leu	8,46	123,43	-	4,39	0,70;1,36	1,34	0,30;0,19	-	-	52,16	41,92	26,63	24,40;21,95	-
607	Pro	-	-	-	4,05	1,18;0,95	1,13;0,27	1,79;2,71	-	-	61,16	29,51	26,2	48,86	-
608	Pro	-	-	-	4,29	2,28;1,84	2,09;2,11	3,36;3,88	-	177,43	63,29	31,04	27,63	50,53	-
609	Gly	8,77	111,28	-	3,58;3,79	-	-	-	-	173,45	45,08	-	-	-	-
610	Phe	7,58	118,2	-	3,93	2,63;3,14	-	6,85	7,09;7,16	174,34	59,1	39,92	-	131,35	131,22;128,26
611	Met	8,18	127,34	-	4,03	0,79;1,92	2,43;2,34	-	1,88	174,21	56,95	35,72	30,58	-	15,99
612	Phe	5,88	110,45	-	4,21	3,45;3,15	-	6,79	7,11;7,19	172,62	56,32	38,18	-	131,9	130,59;129,57
613	Lys	9,02	117,61	-	5,6	1,73;1,94	1,78;1,45	1,59;1,66	2,87;2,66	176,51	55,33	35,73	26,29	29,86	41,64
614	Val	9,00	112,34	-	5,33	2,03	0,71;1,11	-	-	173,77	58,44	35,84	19,50;22,52	-	-
615	Gln	9,38	119,62	111,87	5,41	1,91;1,67	1,97	-	6,82;7,64	176,94	53,11	32,37	33,17	-	-
616	Ala	9,47	130,53	-	4,4	1,56	-	-	-	177,94	52,94	18,32	-	-	-
617	Gln	9,77	124,19	113,98	4,25	1,70;1,86	2,32;2,14	-	7,05;6,85	173,6	54,65	30,27	34,23	-	-
618	His	7,44	115,11	-	4,61	3,17;2,57	-	6,62	7,68	172,79	53,68	35,58	-	120,18	138,26
619	Asp	8,66	119,74	-	4,5	2,79;2,66	-	-	-	176,09	54,46	40,76	-	-	-
620	Tyr	9,09	121,62	-	4,76	2,74;2,55	-	6,89	6,78	174,02	58,4	41,46	-	132,73	117,17
621	Thr	7,66	125,39	-	4,09	3,73	1,09	-	-	172,14	61,24	68,9	21,3	-	-
622	Ala	7,67	128,15	-	4,29	1,45	-	-	-	179,1	52,89	19,65	-	-	-
623	Thr	9,13	113,83	-	4,4	4,39	1,26	-	-	173,64	61,41	70	21,6	-	-
624	Asp	7,55	119,19	-	4,84	2,82;2,57	-	-	-	177,51	52,03	43,35	-	-	-
625	Thr	9,44	112,55	-	4,16	4,44	1,33	-	-	174,49	63,79	68,58	21,94	-	-
626	Asp	8,39	118,95	-	4,79	2,57;3,15	-	-	-	175,51	52,62	39,59	-	-	-
627	Glu	7,33	118,74	-	5,21	2,54;2,28	2,37	-	-	176,39	54,49	32,39	36,38	-	-
628	Leu	8,9	121,87	-	4,39	1,38;1,37	1,43	0,73;0,85	-	174,58	53,77	43,89	26,28	23,49;25,71	-
629	Gln	7,95	120,02	111,71	4,72	2,07	2,39;2,54	-	6,81;7,51	176,51	55,04	28,69	32,55	-	-
630	Leu	9,09	124,31	-	4,98	1,97;1,19	1,76	0,64;0,60	-	176,84	52,97	45,06	25,79	23,66;24,61	-
631	Arg	9,21	125,88	85,6	4,85	1,71	1,58;1,71	3,19	7,22	175,66	53,01	31,72	26,92	43,09	-
632	Ala	8,99	125,22	-	3,29	1,08	-	-	-	177,66	54,14	17,25	-	-	-
633	Gly	8,78	112,81	-	4,52;3,51	-	-	-	-	175,39	44,38	-	-	-	-
634	Asp	8,79	122,87	-	4,49	2,27;2,75	-	-	-	176,15	55,95	41,7	-	-	-
635	Val	8,63	123,63	-	4,77	2,03	0,91;1,06	-	-	176,08	61,97	31,88	22,04;21,82	-	-
636	Val	9,5	130,08	-	4,17	1,41	0,26;0,26	-	-	173,21	61,14	33,95	22,18;21,02	-	-
637	Leu	9,2	126,61	-	4,57	1,06;2,08	1,65	0,54;0,71	-	174,14	53,82	39,88	27,44	23,57;25,87	-
638	Val	8,55	126,38	-	4,38	1,11	0,81;0,90	-	-	174,88	64,01	30,88	24,25;21,42	-	-
639	Ile	8,07	121,78	-	4,52	1,86	0,62;0,55;1,01	0,62	-	-	57,92	39	24,63;17,34	13,51	-
640	Pro	-	-	-	4,35	2,33;1,67	1,9	3,79;3,34	-	177,86	62,4	32,04	27,79	50,17	-
641	Phe	8,42	118,95	-	4,06	2,74;2,72	-	7,32	7,31;7,15	176,83	58,98	39,16	-	131,76	131,26;129,28
642	Gln	8,63	123,31	112,47	4,04	2,02	2,36	-	7,55;6,84	175,92	57,92	28,52	33,77	-	-
643	Asn	8,08	114,98	113,33	5,17	2,87;2,70	-	7,67;6,99	-	-	49,78	38,97	-	-	-
644	Pro	-	-	-	4,07	1,95;2,36	2,04	3,88;3,74	-	178,37	64,57	31,89	27,1	50,84	-
645	Glu	8,65	117,38	-	4,07	2,01;1,97	2,26	-	-	177,21	57,95	28,48	36,01	-	-

Nr.	Typ	H	N	N <sup>o</sup> /N <sup>c</sup>	H <sup>a</sup>	H <sup>b</sup>	H <sup>v</sup>	H <sup>o</sup>	H <sup>f</sup> /H <sup>s</sup> /H <sup>n</sup>	C	C <sup>a</sup>	C <sup>b</sup>	C <sup>v</sup>	C <sup>o</sup>	C <sup>f</sup> /C <sup>s</sup> /C <sup>n</sup>
646	Glu	7,74	116,83	-	4,04	2,15;2,13	2,23	-	-	175,64	55,98	30,18	36,86	-	-
647	Gln	6,81	119,48	110,96	3,1	0,31;1,53	1,73	-	7,72;6,97	174,8	56,05	27,92	33,04	-	-
648	Asp	7,71	126,89	-	4,69	2,58;2,21	-	-	-	174,92	53,67	44,39	-	-	-
649	Glu	8,69	123,4	-	4,1	2,00;1,98	2,29	-	-	178,02	58,03	29,17	35,96	-	-
650	Gly	8,86	113,05	-	3,75;4,28	-	-	-	-	173,72	45,28	-	-	-	-
651	Trp	8,32	122,04	130,4	4,83	3,27;3,01	-	6,88	9,34;7,19;7,37; 6,66;7,34	174,84	56,6	30,26	-	125,43	120,11;113,42; 119,47;124,11
652	Leu	8,23	121,09	-	4,74	0,57;1,14	1,15	0,92;0,95	-	173,05	52,32	46,09	27,6	25,65;22,53	-
653	Met	8,34	120,43	-	4,8	1,70;0,50	2,11;1,87	-	1,68	175,11	52,99	30,84	32,13	-	16,94
654	Gly	9,1	110,25	-	5,14;3,56	-	-	-	-	170,54	45,8	-	-	-	-
655	Val	8,51	114,32	-	4,56	1,8	1,10;0,87	-	-	174,85	58,69	35,48	20,47;22,07	-	-
656	Lys	10,27	129,06	-	4,18	1,67;2,26	1,20;1,82	1,84;1,83	2,98	177,77	58,69	30,85	27,45	28,83	42,12
657	Glu	9,00	127,14	-	3,85	2,19;1,79	2,34;2,18	-	-	177,62	60,17	30,21	37,17	-	-
658	Ser	9,18	112,86	-	4,22	3,90;3,91	-	-	-	177,07	60,9	61,78	-	-	-
659	Asp	6,69	121,81	-	4,49	2,91;2,83	-	-	-	177,89	57,25	40,96	-	-	-
660	Trp	8,35	122,16	128,46	4,44	3,13;3,25	-	7,19	7,43;10,38; 6,86;7,15;7,19	180,07	59,42	30,31	-	126,7	119,76;114,77; 122,12;123,96
661	Asn	9,06	118,04	110,09	4,15	2,90;2,84	-	7,10;7,61	-	176,45	54,89	37,69	-	-	-
662	Gln	7,14	116,15	111,51	4,41	2,01;2,40	2,39;2,64	-	7,27;6,89	175,03	55,59	29,41	34,62	-	-
663	His	7,93	112,98	-	3,58	3,24	-	6,88	8,13	174,74	56,89	24,9	-	119,89	135,88
664	Lys	7,04	116,57	-	4,19	1,67;1,60	1,42	1,53;1,64	2,91;2,92	176,71	56,54	34,06	26,18	29,38	42,24
665	Glu	8,82	122,46	-	4,12	2,09;1,94	2,39;2,38	-	-	178,69	56,8	29,63	36,39	-	-
666	Leu	9,08	130,44	-	4,12	1,91	1,63	0,96;0,96	-	178,66	58,87	42,32	27,05	25,62;24,60	-
667	Glu	9,31	114,97	-	3,85	2,06	2,37;2,32	-	-	177,45	59,17	28,96	36,42	-	-
668	Lys	7,36	113,96	-	4,46	1,89;2,05	1,41;1,49	1,68	2,99	177,15	56,11	33,3	25,32	28,55	42,03
669	Cys	7,67	112,93	-	4,96	2,94	-	-	-	174,91	58,1	29,35	-	-	-
670	Arg	8,05	122,71	85,53	5,12	1,65;1,75	1,48;1,70	3,04;2,81	7,46;6,8	174,74	55,29	30,44	25,95	44,01	-
671	Gly	9,02	108,96	-	4,33;3,76	-	-	-	-	171,67	45,59	-	-	-	-
672	Val	8,83	112,35	-	6,06	2,48	1,09;0,90	-	-	176,72	59,36	34,39	19,44;23,66	-	-
673	Phe	9,17	117,57	-	5,06	2,58;2,94	-	6,86	7,42;7,29	-	54,56	39,15	-	131,99	130,69;129,5
674	Pro	-	-	-	3,26	0,18;1,79	0,03;1,00	2,47;2,24	-	177,19	60,41	29,22	26,89	48,25	-
675	Glu	8,28	128,08	-	3,57	1,85;1,54	2,19;2,05	-	-	178,17	59,36	29,58	35,72	-	-
676	Asn	9,02	116,52	104,91	4,51	3,05;2,83	-	7,04;6,54	-	175,39	54,21	35,28	-	-	-
677	Phe	7,81	122,03	-	4,44	3,22;3,37	-	7,33	7,34;6,89	175,41	59,43	38,66	-	131,78	131,16;130,02
678	Thr	8,69	111,26	-	5,36	3,84	5,17;1,02	-	-	171,56	60,49	73,08	21,41	-	-
679	Glu	8,28	116,92	-	4,82	2,00;1,82	2,24	-	-	175,61	54,19	33,92	35,76	-	-
680	Arg	8,84	123,69	84,59	4,5	1,70;1,89	1,61;1,59	2,74	6,91;6,76; 7,11;6,80	176,08	57,18	29,99	27,27	42,62	-
681	Val	7,65	125,31	-	4,18	2,1	0,75;0,90	-	-	-	62,91	33,66	20,08;21,94	-	-

Tabelle 36. Zuordnung des Peptides NS5A(341-361)

Nr.	Typ	H	H <sup>a</sup>	H <sup>b</sup>	H <sup>v</sup>	H <sup>o</sup>	H <sup>e</sup>		
341	Gly	8,27	3,79;3,89	-	-	-	-		
342	Ser	8,29	3,96	3,47	-	-	-		
343	Pro	-	4,46	2,27	1,93;2,01	3,83;3,70	-		
344	Leu	8,12	4,65	1,82	1,56	0,87;1,03	-		
345	Pro	-	4,7	1,19;2,01	0,71	2,53	-		
346	Pro	-	4,51	2,32	2,05;1,94	3,68;3,83	-		
347	Thr	8,22	4,19	4,28	1,23	-	-		
348	Lys	8,33	4,36	1,86;1,74	1,45	1,69	2,99	7,92:H <sup>ε</sup> *	
349	Ala	8,35	4,36	1,32	-	-	-		
350	Pro	-	4,41	1,54;2,16	0,87;1,27	3,0	-		
351	Pro	-	4,56	1,72	1,48;1,31	3,63;3,79	-		
352	Ile	8,32	4,58	1,71	0,95;1,58;1,55	0,94	-		
353	Pro	-	4,71	2,37;2,05	1,90	3,63;3,87	-		
354	Pro	-	4,92	2,65	1,89;2,23	3,76	-		
355	Pro	-	4,4	2,22;2,03	1,93;1,20	3,2	-		
356	Arg	8,7	4,11	1,78	1,62	3,18	7,73	7,37:H <sup>η1a</sup>	
357	Arg	8,14	4,28	1,84	1,36	2,25;2,53	7,52	6,80:H <sup>η1a</sup>	7,29:H <sup>η1b</sup>
358	Lys	8,65	4,2	1,73;1,74	1,32	1,61	2,91	7,99:H <sup>ε</sup> *	
359	Arg	8,18	4,4	1,74;1,85	1,56	3,16	7,66	7,15:H <sup>η1a</sup>	
360	Thr	8,17	4,35	4,19	1,19	-	-		
361	Val	8,17	4,11	2,07	0,95	-	-		

### 7.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Genomorganisation vom Hepatitis C Virus. ....	2
Abbildung 2. Domänenorganisation von NS5A vom Genotyp 1b. ....	4
Abbildung 3. Domänenorganisation von Bin1. ....	7
Abbildung 4. Modell der Interaktion zweier SH3-Domänen an ein Adaptormolekül. ....	10
Abbildung 5. Der „Unstained Protein Molecular Weight Marker“ 26610. ....	15
Abbildung 6. Schematische Darstellung der Fusionsproteine GST-Bin1 SH3 und GST-Bin1 Tandem-SH3. ....	17
Abbildung 7. Schematische Darstellungen der verwendeten NS5A-Konstrukte zur rekombinanten Expression. ....	18
Abbildung 8. Schematischer Reinigungsprozess der Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3-Proteine. ....	24
Abbildung 9. Die schematische Reinigung des His-NS5A(191-447). ....	26
Abbildung 10. Expression und Reinigung des Proteins Bin1 SH3. ....	53
Abbildung 11. Expression und Reinigung von Bin1 Tandem-SH3. ....	53
Abbildung 12. Gelfiltrationschromatogramme von Bin1 SH3 und Bin1 Tandem-SH3. ....	54
Abbildung 13. Expression und Reinigung von His-Ubiquitin. ....	55
Abbildung 14. Expression und Reinigung von His-Ubiquitin-NS5A(333-369). ....	55
Abbildung 15. Gelfiltrationschromatogramme von His-Ubiquitin und His-Ubiquitin-NS5A(333-369). ....	56
Abbildung 16. Expression und Reinigung von NS5A(191-340). ....	57
Abbildung 17. Expression und Reinigung von NS5A(191-447). ....	58
Abbildung 18. Gelfiltrationschromatogramme von NS5A(191-340) und NS5A(191-477). ....	58
Abbildung 19. SPR-Sensorgramm von Bin1 SH3 an His-Ubiquitin-NS5A(333-369). ....	60
Abbildung 20. SPR-Sensorgramm von Bin1 Tandem-SH3 an His-Ubiquitin-NS5A(333-369). ....	61
Abbildung 21. Gleichgewichtsanalyse der Bindung von Bin1 (Tandem-)SH3 an NS5A(333-369). ....	64
Abbildung 22. SPR-Sensorgramme von Bin1 SH3 an His-Ubiquitin-NS5A(333-369). ....	65
Abbildung 23. SPR-Sensorgramme von Bin1 Tandem-SH3 an His-Ubiquitin-NS5A(333-369). ....	65
Abbildung 24. Gleichgewichtsanalyse der SPR-Sensorgramme von Bin1 (Tandem-)SH3. ....	67
Abbildung 25. Bio-Layer Interferometrie von Bin1 SH3 an His-Ubiquitin-NS5A(333-369). ....	68
Abbildung 26. Bio-Layer Interferometrie von Bin1 Tandem-SH3 an His-Ubiquitin-NS5A(333-369). ....	69
Abbildung 27. Gleichgewichtsanalyse der Bindung von NS5A(333-369) und Bin1 (Tandem-)SH3. ....	71
Abbildung 28. ITC-Bindekurven von NS5A(347-361) mit Bin1 (Tandem-)SH3 bei 25 °C. ....	73
Abbildung 29. ITC-Bindekurven von NS5A(347-361) mit Bin1 (Tandem-)SH3. ....	73
Abbildung 30. ITC-Bindekurven von NS5A(341-361) mit Bin1 (Tandem-)SH3 bei 25 °C. ....	75
Abbildung 31. ITC-Bindekurven von NS5A(341-361) mit Bin1 (Tandem-)SH3 bei 37 °C. ....	75
Abbildung 32. ITC-Bindekurven von His-Ubiquitin-NS5A(333-369) mit Bin1 (Tandem-)SH3 bei 25 °C. ....	76
Abbildung 33. Auswertung der ITC-Messungen von Bin1 (Tandem-)SH3 an NS5A(347-361). ....	78
Abbildung 34. Analytische Gelfiltrationschromatogramme von Bin1 Tandem-SH3 und dem Komplex Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361). ....	79
Abbildung 35. Auswertung der analytischen Gelfiltration. ....	80
Abbildung 36. Photographien der Kristalle von Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361). ....	81
Abbildung 37. SDS-Gel von Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361) im 1:1-Komplex zur Röntgenstrukturanalyse. ....	83
Abbildung 38. Position der SH3-Domäne im Kristall. ....	84
Abbildung 39. NMR-Titration von NS5A(341-361) zu Bin1 Tandem-SH3. ....	86
Abbildung 40. NMR-Titration von NS5A(341-361) zu Bin1 SH3. ....	87
Abbildung 41. NMR-Titration von NS5A(191-340) zu Bin1 Tandem-SH3. ....	89
Abbildung 42. Austauschverhalten ausgewählter Aminosäurereste der Titration NS5A(191-340):Bin1 Tandem- SH3. ....	89
Abbildung 43. NMR-Titration von NS5A(191-340) zu Bin1 Tandem-SH3. ....	90
Abbildung 44. NMR-Titration von NS5A(191-447) zu Bin1 Tandem-SH3. ....	91
Abbildung 45. Zuordnung des Bin1 Tandem-SH3 im 2D [ <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N] HSQC. ....	92
Abbildung 46. CSP der Bin1 (Tandem-)SH3-Domänen aus dem 2D [ <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N] HSQC. ....	93
Abbildung 47. CN-gefiltertes 2D [ <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H]-TOCSY von NS5A(341-361) im Komplex mit Bin1 Tandem-SH3. ....	95
Abbildung 48. CN-gefiltertes 2D [ <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H]-NOESY von NS5A(341-361) im Komplex mit Bin1 Tandem-SH3. ....	95
Abbildung 49. Abweichungen der H <sup>N</sup> - und H <sup>α</sup> -Protonen chemischen Verschiebung in den Spektren von NS5A(341-361). ....	96
Abbildung 50. Relative Intensitäten der NOEs und Strukturensamble von NS5A(341-361). ....	96
Abbildung 51. Übereinstimmung des Strukturparameters S <sup>2</sup> für Bin1 SH3 und apo- und holo-Zustand des Bin1 Tandem-SH3. ....	98
Abbildung 52. Bestimmung der Sekundärstrukturelemente für Bin1 Tandem-SH3 aus Talos-N. ....	100

Abbildung 53. Bestimmung der Sekundärstrukturelemente für Bin1 Tandem-SH3 im Komplex mit NS5A(341-361) aus Talos-N. ....	100
Abbildung 54. 2D HSQC-NOESY über <sup>13</sup> C-markierte Kohlenstoffe zeigt eine geringe Anzahl an NOEs. ....	102
Abbildung 55. 2D HSQC-NOESY über <sup>15</sup> N-markierte Stickstoffe zeigt eine geringe Anzahl an NOEs. ....	103
Abbildung 56. Strukturensamble für Bin1 Tandem-SH3 in der apo- und holo-Form. ....	106
Abbildung 57. Bindung von Bin1 (Tandem-)SH3 an His-Ubiquitin-NS5A(333-369). ....	111
Abbildung 58. Schematische Zeichnung einer Polyprolinhelix der PPR Region von NS5A(342-358). ....	120
Abbildung 59. Eine Übersicht möglicher Bindemodi von NS5A an Bin1 Tandem-SH3. ....	120
Abbildung 60. CSP der Titrations von Bin1 (Tandem-)SH3 mit NS5A(341-361). ....	123
Abbildung 61. CSP der Titrations von Bin1 Tandem-SH3 mit NS5A(191-340). ....	124
Abbildung 62. CSP der Titrations von NS5A(191-340) mit Bin1 Tandem-SH3. ....	125
Abbildung 63. CSP der Titrations von Bin1 Tandem-SH3 mit NS5A(191-447). ....	126
Abbildung 64. Übertragung der CSP auf die Strukturen der Bin1 (Tandem-)SH3. ....	127
Abbildung 65. Hydrophobe Wechselwirkungen zweier SH3-Domänen als Kristallkontakt. ....	130
Abbildung 66. Überlagerung aller zehn Strukturen des NMR-Ensembles von Bin1 Tandem-SH3. ....	131
Abbildung 67. Überlagerung der Strukturen von Bin1 (Tandem-)SH3. ....	132
Abbildung 68. Aminosäurereste des Bin1 Tandem-SH3, die NOEs zum Liganden NS5A(341-361) zeigen. ....	134
Abbildung 69. Überlagerung von Bin1 Tandem-SH3 als apo- und holo-Zustand. ....	137
Abbildung 70. Überlagerung der N-terminalen Domäne von Bin1 Tandem-SH3 im apo- und holo-Zustand. ....	137
Abbildung 71. Vergleich der distalen Schleife von Bin1 (Tandem-)SH3. ....	138
Abbildung 72. Überlagerung der Kristallstrukturen von Bin1 Tandem-SH3 mit der NMR-Struktur des holo-Proteins. ....	140
Abbildung 73. Überlagerung der Strukturen von Bin1 Tandem-SH3 und Fyn SH3 mit Ligand NS5A sowie Bin1 SH3 mit c-Myc. ....	141
Abbildung 74. ITC-Rohdaten der Referenzmessung von NS5A(347-361) in Puffer. 0,7 mM NS5A(347-361) wurden in 19 Injektionen à 2 µl injiziert. ....	158
Abbildung 75. ITC-Rohdaten von NS5A(347-361) und Bin1 SH3 bei 30 °C. 1 mM NS5A(347-361) wurde in 100 µM Bin1 SH3 bei 30 °C mit 19 Injektionen à 2 µl injiziert. ....	158
Abbildung 76. ITC-Rohdaten von NS5A(347-361) und Bin1 SH3 bei 37 °C. 0,7 mM NS5A(347-361) wurden in 100 µM Bin1 SH3 in 19 Injektionen à 2 µl injiziert. ....	159
Abbildung 77. ITC-Rohdaten von NS5A(347-361) und Bin1 Tandem-SH3 bei 25 °C. 0,7 mM NS5A(347-361) wurden in 50 µM Bin1 Tandem-SH3 injiziert. ....	159
Abbildung 78. ITC-Rohdaten von NS5A(347-361) und Bin1 Tandem-SH3. 350 µM NS5A(347-361) wurden in 19 Injektionen à 2 µl in 25 µM Bin1 Tandem-SH3 injiziert. ....	160
Abbildung 79. ITC-Rohdaten von NS5A(347-361) und Bin1 Tandem-SH3. 350 µM NS5A(347-361) wurden in 19 Injektionen à 2 µl in 25 µM Bin1 Tandem-SH3 injiziert. ....	160
Abbildung 80. ITC-Rohdaten der Referenzmessung von NS5A(341-361) in Puffer. 0,8 mM NS5A(341-361) wurden in ITC-Puffer mit 19 Injektionen à 2 µl injiziert. ....	161
Abbildung 81. ITC-Rohdaten von NS5A(341-361) und Bin1 SH3 bei 25 °C. 0,8 mM NS5A(341-361) wurden in 40 µM Bin1 SH3 in 19 Injektionen à 2 µl injiziert. ....	161
Abbildung 82. ITC-Rohdaten von NS5A(341-361) und Bin1 SH3 bei 37 °C. 0,8 mM NS5A(341-361) wurden in 40 µM Bin1 SH3 in 19 Injektionen à 2 µl injiziert. ....	162
Abbildung 83. ITC-Rohdaten von NS5A(341-361) mit Bin1 Tandem-SH3 bei 25 °C. 0,8 mM NS5A(341-361) wurden zu 20 µM Bin1 Tandem-SH3 in 19 Injektionen à 2 µl injiziert. ....	162
Abbildung 84. ITC-Rohdaten von NS5A(341-361) und Bin1 Tandem-SH3 bei 37 °C. 0,8 mM NS5A(341-361) wurden in 19 Injektionen à 2 µl zu 20 µM Bin1 Tandem-SH3 injiziert. ....	163
Abbildung 85. ITC-Rohdaten der Referenzmessung von His-Ubiquitin-NS5A(333-369) in Puffer. 250 µM His-Ubiquitin-NS5A(333-369) wurden in 31 Injektionen à 1,2 µl injiziert. ....	163
Abbildung 86. ITC-Rohdaten von His-Ubiquitin-NS5A(333-369) in Bin1 SH3. 250 µM His-Ubiquitin-NS5A(333-369) wurden in 25 µM Bin1 SH3 in 19 Injektionen à 2 µl injiziert. ....	164
Abbildung 87. ITC-Rohdaten von His-Ubiquitin-NS5A(333-369) in Bin1 Tandem-SH3. 250 µM His-Ubiquitin-NS5A(333-369) wurden in 12 µM Bin1 Tandem-SH3 in 19 Injektionen à 2 µl injiziert. ....	164

## 7.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Verwendete Materialien und deren Bezugsquellen .....	14
Tabelle 2. Bakterienstämme mit Genotyp und Bezugsquelle .....	15
Tabelle 3. Sequenzen der verwendeten Peptide.....	15
Tabelle 4. Plasmide mit Antibiotikaresistenz und dem dazu verwendeten <i>E. coli</i> -Stamm, Art des Plasmids und Bezugsquellen.....	16
Tabelle 5. Verwendete Enzyme .....	16
Tabelle 6. Verwendete Gravitationschromatographie- und Größenausschlusschromatographiesäulenmaterialien .....	19
Tabelle 7. Verwendete Geräte .....	19
Tabelle 8. Verwendete Datenbanken und Software .....	20
Tabelle 9. Übersicht der verwendeten Interaktionsmodelle zur kinetischen Auswertung von SPR- und BLI-Daten. ....	32
Tabelle 10. In Verfeinerungstest zur Kristallisation von Bin1 Tandem-SH3. ....	39
Tabelle 11. Diffraktionsaufnahmebedingungen von Bin1 Tandem-SH3 .....	39
Tabelle 12. Hergestellte NMR-Proben .....	44
Tabelle 13. Akquisitions- und Prozessierungsparameter der durchgeführten NMR-Experimente von Bin1 Tandem-SH3. ....	45
Tabelle 14. Akquisitions- und Prozessierungsparameter der durchgeführten NMR-Experimente zur Interaktion von Bin1 Tandem-SH3 und verschiedenen NS5A-Konstrukten.....	46
Tabelle 15. Akquisitions- und Prozessierungsparameter der durchgeführten NMR-Experimente vom Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361)-Komplex.....	46
Tabelle 16. Auswertung der Bindung von NS5A(333-369) an Bin1 (Tandem-)SH3.....	62
Tabelle 17. Gleichgewichtsanalyse der Bindung von Bin1 (Tandem-)SH3 an NS5A(333-369).....	64
Tabelle 18. Bindemodelle zur Interaktion von Bin1 (Tandem-)SH3 an NS5A(333-369) mit SPR. ....	66
Tabelle 19. Gleichgewichtsanalyse zur Bindung von Bin1 (Tandem-)SH3 an NS5A(333-369) mit SPR.....	67
Tabelle 20. Kinetische Auswertung der BLI-Messung von NS5A(333-369) und Bin1 (Tandem-)SH3. ....	70
Tabelle 21. Auswertung der Gleichgewichtsanalyse von Bin1 (Tandem-)SH3 an NS5A(333-369). ....	70
Tabelle 22. Auswertung der ITC-Bindekurven von NS5A(347-361) mit Bin1 (Tandem-)SH3.....	72
Tabelle 23. Auswertung der ITC-Bindekurven von NS5A(341-361) mit Bin1 (Tandem-)SH3.....	74
Tabelle 24. Auswertung der ITC-Bindekurven von His-Ubiquitin-NS5A(333-369) mit Bin1 (Tandem-) SH3. ....	76
Tabelle 25. Röntgenkristallographische Diffraktionsdaten von Bin1 Tandem-SH3 mit und ohne Ligand NS5A(341-361). ....	82
Tabelle 26. Divergenz der chemischen Verschiebung der Protonen in NS5A(341-361).....	97
Tabelle 27. Status der Zuordnung des freien Bin1 Tandem-SH3 und des Bin1 Tandem-SH3:NS5A(341-361)-Komplexes. ....	97
Tabelle 28. Mögliche intermolekulare Zuordnungen der NOEs in den gefilterten NOESY-Spektren. ....	104
Tabelle 29. Zur Strukturrechnung einbezogene Torsionswinkel- und Distanzeinschränkungen.....	105
Tabelle 30. Klassifizierung der NOEs, die für die Strukturrechnungen von Bin1 Tandem-SH3 in apo- und holo-Zustand ohne Ligand verwendet wurden. ....	106
Tabelle 31. Zusammenfassung der SPR und BLI-Messungen von Bin1 (Tandem-)SH3. ....	110
Tabelle 32. Zusammenfassung der ITC-Messungen von Bin1 (Tandem-)SH3. ....	117
Tabelle 33. Strukturmerkmale von Bin1 Tandem-SH3 mit dem KSDSSP-Algorithmus ermittelt.....	139
Tabelle 34. Zuordnung des apo-Zustandes Bin1 Tandem-SH3 .....	165
Tabelle 35. Zuordnung des holo-Zustandes Bin1 Tandem-SH3.....	169
Tabelle 36. Zuordnung des Peptides NS5A(341-361) .....	173

## 7.5. Liste der wissenschaftlichen Publikationen, Poster und Vorträge

### Veröffentlichungen

Aladag A., Hoffmann S., Stoldt M., **Bösing C.**, Willbold D., Schwarten M.: Hepatitis C virus NS5A is able to competitively displace c-Myc from the Bin1 SH3 domain in vitro; Journal of Peptide Science 2014; 20 (5); 334-340; doi: 10.1002/psc.2618

Aladag A., **Bösing C.**, Gremer L., Hoffmann S., Klinker S., Schwarten M., Stoldt M., Valda O., Willbold D.: Analysis of the Bin1 SH3 interaction with peptides derived from the hepatitis C virus protein NS5A and c-Myc reveals that NS5A can competitively displace c-Myc in vitro; European Journal of Medical Research 2014; 19 (Suppl 1)

### Poster

**Bösing C.**, Hoffmann S., Stoldt M., Willbold D.: Structural Analysis of the Interaction of HCV NS5A and Bin1 SH3; ICMRBS, Lyon, Frankreich; 19.-24.08.2012

**Bösing C.**, Schwarten M., Hoffmann S., Stoldt M., Willbold D.: Binding Properties of a domain pair derived from human Bin1 to HCV NS5A; First International Conference of Collaborative Research Center SFB 974 "Liver Damage and Regeneration", Düsseldorf, Deutschland; 15.-16.11.2013

### Präsentationen

**Bösing C.**: Structural study of the interaction of HCV NS5A and Bin1 SH3; Retreat SFB974, Trier, Deutschland; 02.02.2013

**Bösing C.**: HCV NS5A binding properties of a Bin1 SH3 domain pair; Retreat SFB974; Trier, Deutschland; 09.03.2014

## 7.6. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die jede auf Ihre Weise einen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Dieter Willbold spreche ich meinen Dank aus für die Möglichkeit, in seinem Institut der Strukturellen Biochemie am Forschungszentrum Jülich meine Dissertation anzufertigen und für die Überlassung dieses interessanten Themas. Zusätzlich danke ich für die Möglichkeit zum Besuch mehrerer nationaler und internationaler Konferenzen und Kurse und der Schaffung der exzellenten technischen Forschungsbedingungen.

Prof. Dr. Henrike Heise danke ich für die Übernahme der Rolle als Zeitgutachter, sowie die Einführung in die NMR mit Ihrem Seminar, das den Grundstein für diese Arbeit legte.

Dem Sonderforschungsbereich 974 verdanke ich die finanzielle Unterstützung, die gepaart wurde mit interdisziplinärer Zusammenarbeit und dem exzellenten Angebot an Fortbildungsmaßnahmen.

Mein Dank gilt Dr. Melanie Schwarten für die Betreuung und ihre zahlreichen Ideen bezüglich der Planung und Durchführung von Experimenten. Darüber hinaus möchte ich mich für die Hilfestellung beim Erstellen von Manuskripten und der Interpretation von Messdaten von Bin1 SH3:NS5A(333-369) bedanken.

Dr. Matthias Stoldt danke ich für die Einarbeitung in dieses Thema, die wissenschaftliche Betreuung und die Hilfe bei der Durchführung und Auswertung von NMR-Experimenten. Dr. Justin Lecher danke ich für die Ratschläge im Umgang im Linux und den molekulardynamischen Rechnungen. Bei Dr. Silke Hoffmann bedanke ich mich für die vielen konstruktiven Ratschläge bei der Darstellung meiner Ergebnisse auf Postern. Dr. Joachim Granzin und Dr. Renu Batra-Safferling danke ich für ihre fachliche Meinung rund um SH3-Domänen und die Röntgenstrukturanalyse. Bei Prof Dr. Bernhard Brutscher und Dr. Zsofia Solyom bedanke ich mich für die fruchtbare Zusammenarbeit in dem NS5A-Projekt durch Bereitstellung von NMR-Pulssequenzen und NS5A-Plasmiden.

Bei der Mitarbeiterin in meiner NMR-Arbeitsgruppe, Claudia Börger, möchte ich mich für die große Hilfe bei allerlei Fragen allgemeiner Art und den NMR-Fragen im Speziellen bedanken. Aus der entstandenen Freundschaft unternahmen wir gerne gemeinsame Freizeitaktivitäten.

Olga Valdau, Max Michel, Susanne Mödder, Stephan Weber, Dr. Yu-Fu Hung und Alexandra Böske danke ich für Ihre Hilfsbereitschaft und Diskussionen.

Bei allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeitern des ICS-6 bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft und die vielen Gespräche auch außerhalb unserer Arbeit.

## 7.7. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die Dissertation in der vorgelegten oder in ähnlicher Form wurde noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Jülich, den

Christina Winzösch