

**Entwicklung von Werkzeugen zur Optimierung
der Funktionsanalyse Tyrosin-phosphorylierter Proteine
auf Basis der zellfreien Proteinsynthese**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im

Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dipl.-Biochemiker Paul Philipp Majkut

aus Schwabach

Berlin 2013

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. Christian P. R. Hackenberger im Zeitraum vom April 2009 bis Oktober 2013 am Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian P. R. Hackenberger
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Freund

Disputation am: 31.10.2013

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Entwicklung von Werkzeugen zur Optimierung der Funktionsanalyse Tyrosin-phosphorylierter Proteine auf Basis der zellfreien Proteinsynthese“ selbstständig und ohne Benutzung anderer als der zugelassenen Hilfsmittel angefertigt zu haben. Alle aufgeführten Zitate sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder als ungenügend beurteilt.

Berlin, den 10.10.2013

(Paul Majkut)

Danksagung

An allererster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Christian Hackenberger nicht nur für die Überlassung dieses spannenden und stimulierenden Themas, sondern auch für die gute und verantwortungsvolle Betreuung. Sowie seinen unermüdlichen Einsatz, uns die bestmöglichen Bedingungen für unsere Forschung zu bieten.

Mein Dank gebührt nicht weniger Herrn Prof. Dr. Christian Freund für die Übernahme der Zweitkorrektur und für viele informative Diskussionen über ADAP.

Mein Dank gilt ebenso Dr. Eberhard Krause für die ESI-MS Analytik und Benno Kuroпка für die angenehme Atmosphäre und die gegenseitige Hilfe, von der unsere beiden Arbeiten profitiert haben.

Großen Anteil am erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit hat auch Frau Katrin Wittig, nicht nur für die fabelhafte Unterstützung bei Ankauf und Organisatorischen, sondern vor allem für ihre einfühlsame und hilfsbereite Art, falls der Schuh mal drückte.

Mein großer Dank gilt vor allem den Mitarbeitern der RiNA GmbH, in deren Laboren diese Arbeit zum allergrößten Teil entstanden ist. Zunächst möchte ich dem alten Labor 21.04 danken: für die stets angenehme und kollegiale Atmosphäre im Labor, sowie natürlich der ganzen Crew. Gerhard Schmitt für Rat und Tat bei Computerfragen. Mein herzlicher Dank gebührt dem CEO, Herrn Dipl.-Kfm. Leo W. Tristram für seine schnelle und bereitwillige Hilfe sowie für die finanzielle Unterstützung in den letzten Monaten.

Besonders hervorgehoben werden muss der Beitrag von Herrn Dr. Michael Gerrits und Herrn. Dr. Helmut Merk. Vielen Dank für eure Diskussionsbereitschaft, eure reiche Erfahrung auf dem Gebiet der zellfreien Proteinsynthese, euren analytischen Verstand und die vielen angenehmen Pausen bei Kaffee und Kippen. Ihr wart mir ein Vorbild! Danke, dass ich zuschauen durfte und nun mit euch zusammenarbeiten darf.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Ramona Schlesinger für die Möglichkeit, den Nanotemper Monolith so ausgiebig zu nutzen, ihre freundliche und unkomplizierte Art sowie der ganzen Gruppe der GBP für die herzliche Aufnahme im Labor.

Ebenso danke ich allen Mitgliedern der AG Hackenberger. Hierbei im Besonderen Frau Michaela Mühlberg und Herrn Robert Vallée, zwei Kampfgefährten der ersten Stunde.

Danke für die zahlreichen Sessions an verschiedenen Berliner Seen Robert, die vielen tiefgründigen Gespräche über die wichtigen und interessanten Dinge des Lebens, manchmal sogar auch über Chemie.

Mein besonderer Dank gilt auch meinem Orgellehrer Herrn Dipl.-Ing. Erik Hoeppe, der mir die Möglichkeit gegeben hat, das Spiel auf der Königin zu erlernen, das mein Leben nachhaltig bereicherte. Danke Erik! LAVDATE DOMINVM IN CHORDIS ET ORGANO.

Meiner Familie. Am allermeisten danke ich meinen Eltern, Jan und Margarete Majkut. Egal wie trist die Lage manchmal war, ich war Euer Stolz und Eure Freude und ihr ließt mich dies immer wissen. Und das erfüllt mich mit Dankbarkeit und Liebe. Doahoam is dohoam, pjeronje!

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Vermittlung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in Eukaryoten	1
1.2.	Proteinphosphorylierung	4
1.2.1.	Phosphorylierung von Ser/Thr	5
1.2.2.	Phosphorylierung von His/Asp/Cys/Lys/Arg	5
1.3.	Detaillierte Betrachtung der Tyrosin-Phosphorylierung	7
1.3.1.	Proteinphosphorylierung durch Tyrosinkinasen	7
1.3.2.	Phosphotyrosin-bindende Proteindomänen	8
1.3.3.	Dephosphorylierung durch Protein-Tyrosinphosphatasen	11
1.4.	Die Bedeutung der Dissoziationskonstante im Kontext größerer Protein-Interaktionsnetzwerke	13
1.4.1.	Definition der Dissoziationskonstante	13
1.5.	Werkzeuge zur Darstellung und Charakterisierung Tyrosin-phosphorylierter Proteine	15
1.5.1.	Die experimentelle K_d Bestimmung von Protein-Protein-Wechselwirkungen	16
1.5.2.	Strategien zur ortsspezifischen Phosphorylierung von Proteinen	19
1.5.3.	Chemoselektive und bioorthogonale Reaktionen zur Protein-Modifikation	24
1.5.4.	Überblick über die zellfreie Proteinsynthese	30
1.6.	Das Modellprotein ADAP	32
1.6.1.	Allgemeine Eigenschaften von ADAP	32
1.6.2.	Bekannte Interaktionen von ADAP	35
1.6.3.	Modellsysteme	36
2.	Zielsetzung der Arbeit	37
3.	Ergebnisse	38
3.1.	Werkzeuge zur verbesserten Analyse von Phosphoprotein-Interaktionen	39
3.1.1.	Expression von ADAP-Varianten	39
3.1.2.	Synthese einer Bibliothek biotinylierter SH2-Proteine	46
3.1.3.	Weitere Konstrukte von ADAP und wichtige Kontrollkonstrukte	48
3.2.	Funktionsuntersuchungen an Tyrosin-phosphorylierten Proteinen	50
3.2.1.	Pulldown-Screening zur Bestätigung von ADAP-Bindungspartnern	50
3.2.2.	Bestimmung der Dissoziationskonstanten von phosphoryliertem ADAP	54

3.3.	Überprüfung eines chemoselektiv durch Staudinger-Reaktion generierten Phosphotyrosinanalogs	60
3.3.1	Umsetzung von AzPhe ₂ ADAP mit dem Caging Phosphit	61
3.3.2.	Überprüfung der Zugänglichkeit der Azidofunktionen in ADAP	64
3.3.3.	Optimierung und Detektion der Staudinger-Phosphit-Reaktion auf Proteinebene	65
3.3.4.	Umsatz von ADAP-Varianten an biologisch relevanten Stellen	71
4.	Diskussion	75
4.1.	Zellfreie Synthese von Bindungspartnern für nachfolgende Analysen	75
4.2.	Messung Phosphotyrosin-abhängiger Interaktionen von ADAP	78
4.3.	Eignung des gewählten Arbeitsflusses und des Modellsystems	80
4.3.1	Bewertung der Bindungskonstanten	82
4.4	Eignung der Staudinger-Phosphit-Reaktion für die chemoselektive Tyrosin-Phosphorylierung	85
5.	Ausblick	88
6.	Kurzzusammenfassung	90
7.	Summary	91
8.	Material und Methoden	92
8.1.	Materialien	92
8.1.1.	Chemikalien	92
8.1.2.	Verwendete Kits	92
8.1.3.	Zusammensetzung allgemein gängiger Puffer	92
8.1.4.	Spezielle Geräte	93
8.1.5.	Verwendete Oligonukleotide	93
8.2.	Methoden	99
8.2.1.	Mikrobiologische Methoden	99
8.2.2.	Molekularbiologische Methoden	100
8.2.3.	Zellfreie Synthese von Proteinen	103
8.2.4.	Proteinbiochemische Methoden	104
8.2.5.	Modifikation von Proteinen	114
9.	Literaturverzeichnis	117
10.	Verzeichnis der erfolgten Publikationen	128

1. Einleitung

Die korrekte Funktion eukaryotischer Zellen wird durch Proteininteraktionsnetzwerke kontrolliert, für deren Ausbildung die Phosphorylierung von Tyrosinresten einen wichtigen Beitrag leistet, indem diese Interaktionen mit SH2-Domänen ermöglicht. Das Ziel dieser Arbeit war es, neue Werkzeuge zur Optimierung der Funktionsanalyse Tyrosin-phosphorylierter Proteine auf Basis der zellfreien Proteinsynthese zu entwickeln. Ein Fokus lag hierbei auf der Erleichterung der Synthese ortspezifisch markierter Bindungspartner bei gleichzeitiger Sensitivitätserhöhung für die Phosphoproteine durch ortspezifische Fluoreszenzmarkierung. Das experimentelle Ziel war es, neben dem direkten, schnellen und hochsensitiven Nachweis Tyrosin-phosphorylierungsabhängiger Protein-Protein-Wechselwirkungen auch handhabbare Mittel zur Bestimmung von K_d -Werten (Dissoziationskonstanten) zu liefern. Hierbei sollte für die Darstellung der zu untersuchenden Proteine die zellfreie Proteinsynthese verwendet werden. Ein weiterer Ansatzpunkt zur Analyse bestand im Vorgang der Phosphorylierung selbst: Hier sollte die Funktionalität eines durch Staudinger-Phosphit-Reaktion ortspezifisch einfühbaren arylischen Phosphoramidats als Phosphotyrosin-Analogon getestet werden. Als Modellsystem sollte dabei hauptsächlich das menschliche T-Zell Adapterprotein ADAP dienen, welches phosphorylierungsabhängige Interaktionen mit SH2-Domänen verschiedener Proteine eingeht.

In den folgenden Kapiteln wird zunächst die Vermittlung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in eukaryotischen Zellen skizziert. Nach einem kurzen Überblick über die Proteinphosphorylierung *in vivo* folgt dann eine Betrachtung der Bedeutung von K_d -Werten im Kontext von Proteininteraktionsnetzwerken sowie eine kurze Erörterung der Methoden zur Bestimmung von K_d -Werten. Es schließt sich ein kurzer Überblick über Werkzeuge zur ortspezifischen Proteinmodifikation durch biochemische und chemobiologische Techniken, sowie über die zellfreie Proteinsynthese an.. Die Einleitung endet mit einer kurzen Beschreibung des Modellproteins ADAP und seinen physiologischen Funktionen.

1.1. Vermittlung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in Eukaryoten

Die Fähigkeit von Proteinen, spezifische Wechselwirkungen untereinander eingehen zu können, ist essentiell für die Kontrolle der Abläufe eukaryotischer Zellen. Diese Kontrolle wird vor allem durch dynamische Proteininteraktionsnetzwerke bewerkstelligt, in der die beteiligten Proteine oft mehrere Funktionen (z.B. spezifische Bindung zu mehreren anderen Proteinen, Enzymaktivität) gleichzeitig erfüllen müssen. Daher weisen eukaryotische Proteine typischerweise eine modulare Organisation auf. Vergleichbar mit einem

Baukastenprinzip enthalten sie separate Domänen, die eine selbständige Faltung aufweisen sowie eine spezifische Funktion ausüben, wodurch das Protein unterschiedliche Funktionalitäten in sich vereinigt. Ihre Einzelfunktion kann die Domäne auch außerhalb des Rahmens des Gesamtproteins ausüben.

Viele modulare Domänen sind für die Wechselwirkung mit Partnerproteinen verantwortlich, wodurch insbesondere im Rahmen der Signaltransduktion regelrechte Proteininteraktionsnetzwerke entstehen (Jadwin et al., 2012). Bindungsdomänen erkennen in der Regel kurze Peptidsequenzen ihres Zielproteins. Die Bindung der Zielsequenz kann von permanenter Natur sein, wie im Fall der Bindung Polyprolin-reicher Sequenzen (PXXP) an SH3-Domänen (Mayer, 2001) oder der Bindung der C-terminalen Sequenz E(S/T)X(V/I) durch PDZ-Domänen (Songyang et al., 1997). Eine Bindung kann aber auch durch posttranslationale Modifikationen (PTM) induziert werden. Beispielfür zu nennen sind die Phosphorylierung von Tyrosinresten, welche die Interaktion des modifizierten Proteins mit SH2- und PTB-Domänen ermöglicht (Pawson et al, 2001; Yaffe, 2002), die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten, welche die Interaktion mit 14-3-3 oder FHA-Domänen (Muslin et al., 1996; Durocher et al., 1999) induziert, sowie die Methylierung von Lysinresten, die durch MBT- und Chromo-Domänen erkannt werden. (Yun et al., 2011). Eine detaillierte Übersicht über wichtige eukaryotische Bindungsdomänen findet sich in Tabelle 1. Des Weiteren gibt es Proteindomänen, welche Membranassoziation bewerkstelligen können. Ein gutes Beispiel hierfür sind die PH (Pleckstrin homology) Domänen mit ihrer Fähigkeit Phosphatidylinositollipide zu binden (Wang & Shaw, 1995). Posttranslationale Modifikationen werden durch spezielle Enzyme eingeführt, welche zur Entfaltung ihrer katalytischen Aktivität erst selbst aktiviert werden müssen und somit ein Signal weiterleiten. Sie stellen somit ein hervorragendes Mittel zur Erzeugung von räumlich und zeitlich dynamisch modulierbaren Signalnetzwerken dar, wodurch die komplexe Steuerung eines eukaryotischen Organismus erst ermöglicht wird (Seet et al., 2006).

Hervorzuheben ist, dass posttranslationale Modifikationen im Gegensatz zur Primärstruktur von Proteinen nicht eindeutig genetisch kodiert sind. Die Spezifität einer Bindung wird sowohl durch die Peptidsequenz des Zielmotivs als auch durch die spezifische Modifikation (z.B. Phosphotyrosin) erzielt. Eukaryotische Bindungsdomänen weisen somit keine absolute Spezifität auf. Viele Mitglieder einer Domänenfamilie können die gleiche (modifizierte) Zielsequenz binden und umgekehrt. Dieser breitgefächerte Spezifitätsbereich ist eine typische Eigenschaft eukaryotischer Systeme (Jadwin *et al.*, 2012). Daher ist und bleibt das vollständige Verständnis über diese Vorgänge noch einige Zeit Gegenstand der Forschung. Diese Arbeit soll einen Beitrag zu deren Gelingen sein.

Tabelle 1: Übersicht über die Eigenschaften modularer Proteindomänen nach Jadwin et al., 2012. Angegeben sind die Art der Ligandensequenz (Ligand), der Name der Domänenklasse (Domäne), deren durchschnittliche Größe in Aminosäureresten (AS), die Anzahl aller Mitglieder, sowie die Anzahl der Proteine auf denen sie gefunden werden (es können mehrere gleichartige Domänen auf demselben Protein vorkommen), sowie die Größenordnung der Dissoziationskonstanten von Protein zu Ligand (Affinität).

Ligand	Domäne	Größe (AS)	Domänenanzahl	Proteinanzahl	Affinität
Phosphotyrosin	SH2	~100	120	110	nM- μ M
	PTB	100-150	36	31	nM- μ M
Phosphoserin und Phosphothreonin	14-3-3	~250	8	8	nM- μ M
	BRCT	90-100	46	24	nM- μ M
	FF	50-60	25	6	nM- μ M
	FHA	65-100	31	31	nM- μ M
	MH2/DWB	~200	8	8	nM- μ M
	POLO-Box	~200	5	5	nM- μ M
Polyprolin	EVH1/WH1	~115	8	8	μ M
	GYF	~60	3	3	μ M
	SH3	~60	291	217	nM- μ M
	WW	38-40	88	48	μ M
Methyllysin	LRR	22-28	1967	228	μ M
	PHD	~50	168	96	μ M
	Chromo	30-70	43	31	μ M
	MBT	100	29	9	μ M
	Tudor	~50	55	27	μ M
	PWWP	~135	17	14	μ M
Acetyllysin	BROMO	~110	64	46	μ M
Spez. C-Terminus	PDZ	~90	264	151	nM- μ M

1.2. Proteinphosphorylierung

Phosphorylierungen sind die mit Abstand häufigste PTM in Proteinen. Schätzungen zufolge ist durchschnittlich ein Anteil von 30% der Proteine einer Wirbeltierzelle zu jedem Zeitpunkt phosphoryliert (Zhang *et al.*, 2002; Olsen *et al.*, 2006).

Unter der Phosphorylierung von Proteinen versteht man die Übertragung einer Phosphatgruppe an die funktionellen Gruppen bestimmter Aminosäuren, vornehmlich der alkyischen Alkohole von Serin und Threonin sowie des arylischen Enols von Tyrosin. Diese Reaktion wird durch spezielle Enzyme, die sogenannten Proteinkinasen, katalysiert.

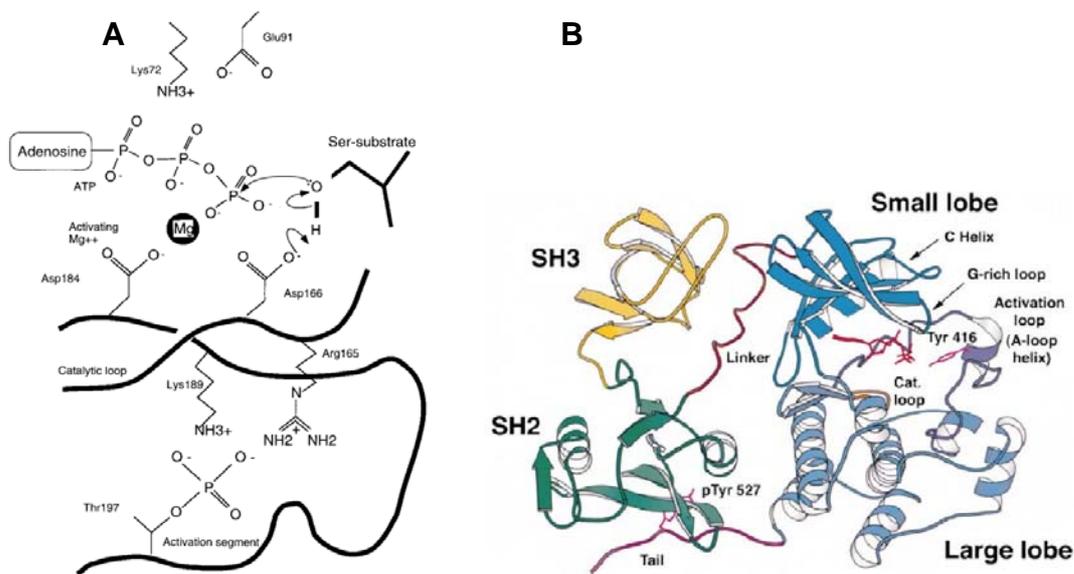


Abb. 1: Reaktionsmechanismus von Proteinkinasen A) Reaktionsmechanismus der Protein Kinase A (PKA) aus Johnson *et al.*, 1996 B) Struktur der c-Src Kinase im inaktiven Zustand gemäß Hunter *et al.* 2000.

Als Phosphatdonor dient die γ-Phosphatgruppe von ATP, welche als Phosphorsäureanhydrid vorliegt. Im menschlichen Genom wurden bisher 518 Kinasen (Manning *et al.*, 2002) identifiziert, davon sind 92 Tyrosinkinasen. Der Reaktionsmechanismus der Kinasen ist trotz der verschiedenen Substrate weitestgehend ähnlich. Er wird am Beispiel der Proteinkinase A verdeutlicht (Abb. 1).

Alle Kinasen weisen einen hochkonservierten Aspartat-Rest auf (im Falle von PKA Asp161, für c-Src Asp387), welcher als Base wirkend das Proton des Substratrestes aktiviert und somit den nukleophilen Angriff des Ser-Alkoholats an die γ-Phosphatgruppe des ATP ermöglicht. Die korrekte Positionierung von ATP wird neben konservierten Aminosäuren auch durch ein bis zwei bivalente Kationen (meist Mg²⁺) erzielt. Eine aktivierende Phosphorylierung (Thr197 bei PKA, Tyr416 bei c-Src) ist immer vorhanden, wobei diese für

die aktive Konformation des Enzyms sorgt und die eigentliche Katalyse nicht direkt beeinflusst.

1.2.1. Phosphorylierung von Ser/Thr

Die Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten stellt die mit Abstand häufigste PTM dar. Diese Modifikation wurde bereits 1906 entdeckt, die erste Serinkinase wurde 1959 identifiziert. Die Phosphorylierung von Serin und Threonin leistet einen bedeutenden Beitrag zur Konformationsänderung von Proteinen und ist daher für die Regulation von Enzymen bedeutend.

Der Versuch hierüber einen umfassenden Überblick zu geben, würde die Dimension der Arbeit sprengen. Im Zusammenhang mit der Serinphosphorylierung sei auf die Cyclin-abhängigen Kinasen und ihre zahlreichen Substrate verwiesen, welche eine entscheidende Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielen (Satyanarayana & Kaldis, 2009); ebenso auf die große Klasse der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinasen (CaM Kinasen), deren Unterfamilie CaM KII an der Vermittlung des Erinnerungsvermögens beteiligt ist (Lisman et al. 2002), sowie auf die Rhodopsinkinase zur Regulation der Sehsinns (Benovic *et al.*, 1986).

1.2.2. Phosphorylierung von His/Asp/Cys/Lys/Arg

Neben Serin- und Threonin-Resten wurde auch die Phosphorylierung von Histidin-, Aspartat-, Cystein-, Arginin- und Lysinresten beobachtet.

Die Phosphorylierung von Histidin- und Aspartat-Resten tritt in sogenannten „Zwei-Komponenten Signalwegen“ auf. Diese stellen den häufigsten Signaltransduktionsweg in Bakterien dar (Stock et al., 2000), sind aber auch in Eukaryoten (Schaller *et al.*, 2011; Thomason & Kay, 2000) anzutreffen. Kernstück dieser Systeme ist eine an einen Transmembran-Rezeptor gekoppelte Histidin-spezifische Kinase. Nach Aktivierung des Rezeptors erfolgt die Autophosphorylierung eines Histidinrestes, welcher als Phosphatdonor die Phosphatgruppe an einen Argininrest überträgt. Da Phosphohistidin in wässrigen Lösungen nur geringe Stabilität besitzt, ebbt dieses Signal schnell ab.

Die Phosphorylierung von Cystein wurde erstmals als Zwischenprodukt im bakteriellen Kohlenhydrattransport entdeckt, genauer gesagt im Mechanismus der PEP-abhängigen Phosphotransferase (Meins et al., 1993; Nuoffer et al., 1988), sowie als Zwischenschritt im Katalysemechanismus von Protein-Tyrosinphosphatasen (Guan & Dixon, 1991). Neue Forschungen konnten die Existenz eines Cystein kinase/-phosphatase-Paars (Stk1/Stp1) im pathogenen Bakterium *Staphylococcus aureus* belegen (Sun *et al.*, 2012), wobei Transkriptionsfaktoren der SarA/MgrA Familie als Substrate identifiziert wurden.

Zur Phosphorylierung von Lysin-Resten ist sehr wenig bekannt. Zum Beispiel wird das

Histon H1 in *Rattus norvegicus* an Lysin phosphoryliert (Chen *et al.*, 1974, 1977). Es ist anzunehmen, dass dies auch bei menschlichen Histonen der Fall ist. Die biologische Funktion dieser Modifikation ist unbekannt. Neben den Histonen wurden im Zellkern auch saure Nicht-Histonproteine im Lysin-phosphorylierten Zustand identifiziert (Chen *et al.*, 1974).

Die Phosphorylierung von Arginin-Resten konnte in *Bacillus subtilis* 2009 durch Fuhrmann *et al.* gezeigt werden. Das Protein McsB wurde als Arginin-spezifische Kinase identifiziert, welches das Hitzeschockprotein CtsR inhibiert. Mittlerweile wurden 121 Arg-Phosphorylierungsstellen auf 87 Proteinen von *B. subtilis* identifiziert (Elsholz *et al.*, 2012).

1.3. Detaillierte Betrachtung der Tyrosin-Phosphorylierung

Wie alle Proteinphosphorylierungen wird auch die Modifikation von Tyrosin durch Kinasen (Proteintyrosinkinasen, PTK) katalysiert.

Phosphorylierte Tyrosine sind vor allem in mehrzelligen Eukaryoten anzutreffen. Zwar wurde auch in Bakterien Tyrosin-Phosphorylierung beobachtet (Grangeasse *et al.*, 2007; Macek *et al.*, 2007), es besteht aber keine Homologie zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Kinasen. Obwohl etwa 10% aller menschlichen Kinasen PTKs sind und gut 10000 Tyrosin-Phosphorylierungsstellen im menschlichen Proteom identifiziert wurden (Liu *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2009), beträgt der Anteil an Tyrosin-Phosphorylierungen weniger als 1% des Massentanteils aller Phosphorylierungen (Hunter & Sefton, 1980). Die statistische Seltenheit dieser Modifikation lässt sich auf die stringente Kontrolle der PTK-Aktivität sowie eine hohe Aktivität von Tyrosinphosphatasen zurückführen. Dennoch sind Tyrosin-Phosphorylierungen von sehr großer Bedeutung.

Tyrosin-Phosphorylierungen stellen die wichtigste Modifikation in Transmembranrezeptor-vermittelten Signalwegen dar. Sie stellen die Grundlage der Zell-Zell-Kommunikation, der Proliferierung und der Immunantwort dar. Es überrascht nicht, dass Gendefekte in diesem Bereich eine häufige Ursache für das Auftreten diverser Karzinome sind. Im Gegensatz zur Serin-/Threonin-Phosphorylierung findet die ausschließliche Verwendung in der Ausbildung von Proteinkomplexen. Die zelluläre Wirkungsweise lässt sich wie folgt skizzieren:

- a) Phosphorylierung eines Substratproteins durch eine PTK als Signalantwort
- b) Erkennung des Substratproteins durch Phosphotyrosin-bindende Domänen und Weiterleitung des Signals durch Bildung von Proteinkomplexen
- c) Dephosphorylierung des Substratproteins durch Protein-Tyrosinphosphatasen (PTP) als Signalbeendigung

1.3.1. Proteinphosphorylierung durch Tyrosinkinasen

Tyrosinkinasen lassen sich in zwei Gruppen aufteilen, die Rezeptortyrosinkinasen (RTK) sowie die Nicht-Rezeptortyrosinkinasen (NRTK). Von den 92 Tyrosinkinasen im menschlichen Genom sind 60 Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) und 32 Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen (NTRK) (Robinson *et. al.*, 2000). Die RTK sind Transmembranproteine, welche auf der extrazellulären Seite Ligandenbindungsstellen verschiedener Architekturen aufweisen, während die Kinasedomäne auf der cytoplasmatischen Seite lokalisiert ist (Lemmon & Schlessinger, 2010). In der Regel liegen RTK im inaktiven Zustand als Monomere vor. Durch Ligandenbindung wird eine Dimerisierung eingeleitet, welche mit der Aktivierung der Tyrosinkinaseaktivität einhergeht. Einige RTK gehen allerdings auch in Abwesenheit ihres Liganden eine Dimerisierung ein. Beispiele hierfür sind der Insulin-Rezeptor und der IGF1-Rezeptor, welche als Disulfid-verbrückte Homodimere an der Zelloberfläche vorliegen (Ward *et al.*, 2007), wobei Konformationsänderungen durch Insulin- oder IGF1-Bindung die Aktivität der Kinase stimulieren. Neben Dimeren treten auch oligomere Zustände bei RTK auf, wie etwa im Falle der Rezeptoren von Tie2 und Eph (Barton *et al.*, 2006; Himanen & Nikolov, 2003). Obwohl die Oligomerisierung von RTK spontan vonstatten gehen kann, ist die Bindung des Liganden entscheidend für die Stabilisierung des aktiven Zustands der Moleküle. Beispiele für RTKs sind u.a. die Familie der EGF-Rezeptoren (Garrett *et al.*, 2002; Burgess *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2006) (epidermal growth factor receptor), FGFR (Bae *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2007; Schlessinger *et al.*, 2000; Mohammadi *et al.*, 1996) (fibroblast growth factor receptor) und der Insulin Rezeptor (Cobb *et al.*, 1989; Favelyukis *et al.*, 2001).

Die Nicht-Rezeptortyrosinkinasen hingegen liegen löslich im Cytosol vor, können aber unter Umständen durch Lipidierung eine Membranlokalisierung aufweisen, wie etwa die zehn Proteine umfassende Familie der Src-Kinasen (Miller, 2003). Sie finden sich häufig im Umfeld von Rezeptoren ohne Kinaseaktivität und führen diese Aktivität stellvertretend aus. NTRKs verfügen neben der katalytisch aktiven Kinasedomäne immer über modulare Bindungsdomänen wie SH2 und SH3, welche das Gesamtprotein regulieren. Dies kann am Beispiel der Src-Kinasen veranschaulicht werden (Abb. 2). Im inaktiven Zustand befinden sich die Src-Kinasen in einem intramolekular gebundenen Zustand. Typisch ist die Wechselwirkung einer C-terminalen Phosphorylierungsstelle mit der eigenen SH2-Domäne. Zusätzlich findet häufig die Bindung eines Prolin-reichen Motivs des Linkers zwischen SH2 und Kinasedomäne an die SH3-Domäne statt. Der für die Stabilisierung der Kinaseaktivität wichtige Tyrosinrest (Tyr416 für Src) ist im inaktiven Zustand dephosphoryliert und in das aktive Zentrum zurückgefaltet. Aktiviert werden kann die Kinase entweder durch Dephosphorylierung des C-terminalen Phosphotyrosins (pTyr), was für Lck-Kinase in hämatopoetischen Zellen durch die Phosphatase CD45 katalysiert wird, durch die

Verdrängung des C-terminalen pTyr durch einen höheraffinen SH2-Liganden, oder durch einen höheraffinen Polyprolin-Liganden (Miller, 2003).

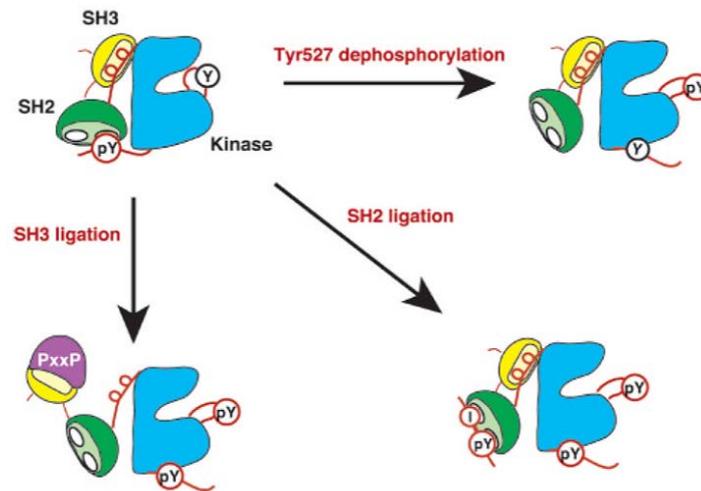


Abb. 2: Kontrolle der Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase am Beispiel der Src-Familie, aus Miller, 2003.

Es bleibt festzuhalten, dass die intrinsischen (inaktivierend wirkenden) Liganden der Kinase deutlich geringere Affinität aufweisen als ihre eigentlichen Liganden. Das als optimales Bindungsmotiv für die Src-SH2 beschriebene Tyr324 des Middle-T Antigens (Hamster Polyomavirus) bindet mit zehnfach höherer Affinität als das C-terminale Motiv von Src (Ladbury et al., 1995). Diese inaktivierende Interaktion soll gerade stark genug sein, um diesen Zustand zu erhalten, soll aber durch die richtigen Substrate sofort aufgelöst werden können. Begünstigt werden diese schwachen Wechselwirkungen vor allem durch die entropische Begünstigung einer intramolekularen Interaktion.

Die Substratspezifität der NTRK wird durch die räumliche Koordinierung geschaffen, jedoch nur unwesentlich durch die Sequenzmotive der zu phosphorylierenden Tyrosine. Untersuchungen haben gezeigt, dass Hyperphosphorylierung von Substratproteinen nicht durch voneinander unabhängige Kollisionen bewirkt wird, sondern kooperativ durch die Bindung des Substrats an die Kinase.

1.3.2. Phosphotyrosin-bindende Proteindomänen

Peptidsequenzen mit phosphorylierten Tyrosinen werden von spezifischen Proteindomänen erkannt. Hierbei wurden bisher vor allem zwei verschiedene Formen identifiziert: die Gruppe der SH2-Domänen (Src-homology 2) und die Gruppe der PTB (Phosphotyrosine (pTyr) binding)-Domänen (Kavanaugh et al., 1995). Ferner konnte bei Vertretern der C2-Domänen die Fähigkeit der selektiven Bindung von tyrosinphosphorylierten Peptiden nachgewiesen werden (Benes et al., 2005), bei der menschlichen Pyruvatkinase PKM2

(Christofk et al., 2008) und der HYB-Domäne von Hakai-E3-Ubiquitinligase (Mukherjee et al., 2012). Im Vergleich zu den 121 SH2-Domänen im menschlichen Proteom sind nur etwa 60 menschliche PTB-Domänen bekannt (Uhlik et al., 2005). Dazu kommen PTB-Domänen - im Gegensatz zu SH2-Domänen - ausschließlich in Adapter- und Gerüstproteinen vor und adressieren so einen kleineren Zielbereich (Yaffe, 2002). Darüber hinaus gibt es in zwei Dritteln aller PTB-haltigen Proteine noch weitere modulare Erkennungsdomänen wie SH2, SH3, PDZ oder SAM (Uhlik et al., 2005).

Zur Gruppe der C2-Domänen zählen zwar über 200 Mitglieder im menschlichen Proteom, womit sie eine der größten Domänengruppen überhaupt darstellt, ihre Hauptfunktion besteht aber in der Ca^{2+} -abhängigen Bindung von Phosphatidylserin in der Zellmembran. (Lemmon, 2008; Li et al., 1998). Bisher wurde nur bei den Vertretern von PKC δ und PKC θ die zusätzliche Fähigkeit der Phosphotyrosin-abhängigen Bindung beobachtet, nämlich die von CDCP1, einem Membranglykoprotein (Benes et al., 2005; Stahelin et al., 2012).

1.3.2.1. SH2-Domänen als pTyr-bindende Elemente

Wie bereits erwähnt, stellen die SH2-Domänen (Src homology 2) die mit Abstand größte Gruppe pTyr-bindender Elemente dar. Die grundlegende Funktion der SH2-Domänen besteht in der Verknüpfung aktivierter Rezeptoren (entweder RTK oder TK-assoziiert) mit cytoplasmatischen Signalmolekülen, wodurch sowohl zeitlich als auch räumlich definierte Information übertragen wird. Im menschlichen Genom finden sich 121 SH2-Domänen verteilt auf 111 Proteine, welche sich in 38 Familien aufteilen lassen. Ihren Namen erhielten sie von der Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase Src. SH2-Domänen finden sich als regulatorische Elemente unter anderem in Tyrosinkinasen, Phosphatasen, Adapterproteinen, Transkriptionsfaktoren, Regulationsproteinen des Aktin-Zytoskelettes, Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEF) und Phospholipid-basierten Second Messenger Proteinen (Liu et al., 2011; Pawson & Nash, 2003; Pawson & Gish, 1992). SH2-Domänen haben keine katalytische Aktivität und beinhalten etwa 100 Aminosäurereste. Ihre Funktion besteht ausschließlich in der Erkennung und Bindung kurzer pTyr-haltiger Peptidsequenzen. Allen Mitgliedern dieser Gruppe ist eine hochkonservierte pTyr-Bindungstasche gemein (Pawson & Gish, 1992), welche pTyr-haltige Liganden mit einer um den Faktor 10^3 -höheren Affinität bindet als die gleichen, nicht-phosphorylierten Liganden (Waksman et al., 1992, 1993).

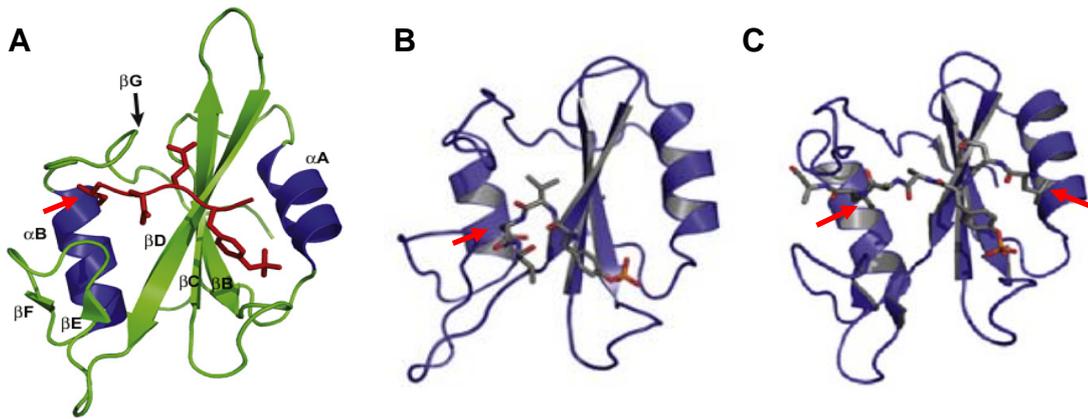


Abb. 3: Kristallstrukturen verschiedener SH2-Domänen mit deren optimalen Bindungsmotiven. A) Src SH2 mit dem Liganden pYEEI (PDB:1 SPS). B) Grb2 SH2 mit pYVNV (PDB: 1BMB). C) SHP2-N SH2 mit LNpYAQL (PDB: 3TL0). Die rot unterlegten Positionen zeigen die spezifitätsbestimmenden Reste an und werden durch die Pfeile hervorgehoben. Darstellung entnommen von Liu et al. 2012.

Die typische Tertiärstruktur einer SH2-Domäne besteht aus sieben β -Faltblättern (β A- β G) sowie zwei α -Helices (α A und α B). Dabei bilden die Faltblätter β B- β D einen Kernbereich, der von den beiden α -Helices flankiert wird (s. Abb. 3A). Die zweite Helix wird von den verbleibenden Faltblättern stabilisiert. Im Bereich zwischen dem Faltblattkern und der Helix α A bilden drei konservierte Aminosäurereste die Bindungstasche für pTyr aus: Arg β B5 (Arg an der fünften Position des Faltblatts β B), sowie Arg α A2 und His β D4. Punktmutationen in den Aminosäurecodons für Arg β B5 und His β D4 führen zum vollständigen Verlust der pTyr-Bindungsfähigkeit (Bibbins et al., 1993). Die Interaktion des pTyr-Restes mit dieser Bindungstasche steuert etwa 50% der Ligandenbindungsenergie bei und ist für SH2-Domänen charakteristisch.

Von den Faltblättern β D und β E sowie den Verbindungsschleifen CD (zwischen β C und β D), DE und BG wird eine weitere Bindungstasche gebildet (Kaneko et al., 2010), welche die Substratselektivität bestimmt. Punktmutationen in diesem Bereich können die Selektivität einer Domäne verändern. Konsequenterweise finden sich hier deutliche Sequenzunterschiede zwischen den verschiedenen SH2-Familien. Studien mit pTyr-haltigen Festphasenpeptiden konnten Sequenzpräferenzen einzelner SH2-Familien belegen (Huang et al., 2008). Die SH2-Domänen der Src-Kinasefamilie zeigen beispielsweise eine hohe Affinität für das Sequenzmotiv pYEEI (aus dem Middle-T-Antigen des Hamster-Polyomavirus), wobei neben pTyr eine zweite Bindungstasche den Isoleucin-Rest an Position +3 (relativ zu pTyr) koordiniert (Waksman et al., 1992). Dieses Bindungsmotiv (pY-x-x-I) wird als zweizähniger Stecker (engl. „two-pronged plug“) bezeichnet. Andere SH2-Familien bevorzugen andere Sequenzmotive. Hier sei Grb2-SH2 erwähnt, welches Asparagin an Position +2 (pY-x-N-x) bevorzugt (Abb.3 B) (Ettmayer et

al., 1999), sowie BRDG1-SH2 mit der Präferenz für Leucin an Position +4 (Kaneko et al., 2010). In der Regel wird die Substratspezifität durch Aminosäurereste bestimmt, die C-terminal zum pTyr liegen. Eine die Regel bestätigende Ausnahme ist die N-terminale SH2-Domäne der Proteintyrosinphosphatase SHP2, welche Leucin an Position -2 bevorzugt (L-x-pY-x-x-L) (Imhof et al., 2006, Abb. 3C).

Neben der Bindungsselektivität ist die Frage, mit welcher Affinität SH2-Domänen ihre Liganden binden, von fundamentaler Bedeutung für das Verständnis und die Interpretation von Signaltransduktionsnetzwerken. Die Affinitätsbestimmung, d.h. die Ermittlung der Dissoziationskonstanten (K_d -Werte) dieser Interaktionen ist seit langer Zeit Gegenstand der Forschung. Bisher wurde anhand kurzer, pTyr-haltiger Peptide eine Vielzahl von K_d -Werten unterschiedlichster Phosphopeptid/SH2-Interaktionen bestimmt. Die Größenordnung der ermittelten K_d -Werte liegt grob im Bereich zwischen 50 nM und 10 μ M (Jones et al., 2006; Ladbury & Arold, 2011; Kaushansky et al., 2008a, 2008b; Hause et al., 2012). Damit handelt es sich um mittelstarke Affinitäten, welche häufige Assoziations- und Dissoziationsereignisse erlauben und damit ein dynamisches Steuernetzwerk ermöglichen. Es konnte gezeigt werden, dass sich eine künstliche Affinitätssteigerung durch gezielte Punktmutationen nachteilig auf die Zelle auswirken kann (Kaneko et al., 2012).

1.3.3. Dephosphorylierung durch Protein-Tyrosinphosphatasen

Der abschließende Schritt der Phosphotyrosin-Signalgebung ist die Signalbeendigung durch Abspaltung des Phosphats durch Protein-Tyrosinphosphatasen (PTP). Insgesamt kodiert das menschliche Genom 105 PTP (Andersen *et al.*, 2004; Tonks 2006; Alonso *et al.*, 2004), von denen 37 Substratspezifität für Phosphotyrosin (pTyr) aufweisen. Die übrigen Enzyme werden als Doppelt Spezifische Phosphatasen bezeichnet (DUSP, engl. dual specificity phosphatases), da sie *in vitro* sowohl pTyr als auch pSer/pThr dephosphorylieren können (Patterson *et al.*, 2009). Von den 37 spezifischen PTPasen sind 21 membranständig (RPTP, Receptor Protein Tyrosine Phosphatase) (Mohebiany et al., 2012), während die verbleibenden 16 Enzyme im Zytosol löslich sind. Wie im Fall der PTK verfügen PTPasen neben der katalytisch aktiven Phosphatasedomäne auch über regulative Elemente. Die katalytisch aktive Tyrosinphosphatasedomäne umfasst etwa 280 Aminosäurereste und enthält zehn hochkonservierte Motive (M1-10) (Andersen *et al.*, 2001; Tonks, 2012). Hierbei beinhaltet das Motiv M9 (HC-(X)₅-R) das katalytisch aktive Cystein. Zusammen mit den WPD- (M8) und Q-Schleifen (M10) wird das minimale katalytische Zentrum gebildet (Abb. 4A). Die Substratspezifität für pTyr wird durch das Motiv M1 über eine Vertiefung der Bindungstasche beeinflusst, sodass nur ein pTyr-Rest die optimale Positionierung einnehmen kann. Im Falle der DUSP ist die Bindungstasche abgeflacht,

wodurch pSer/pThr ebenfalls als Substrat erkannt wird (Andersen *et al.*, 2001; Tonks, 2012).

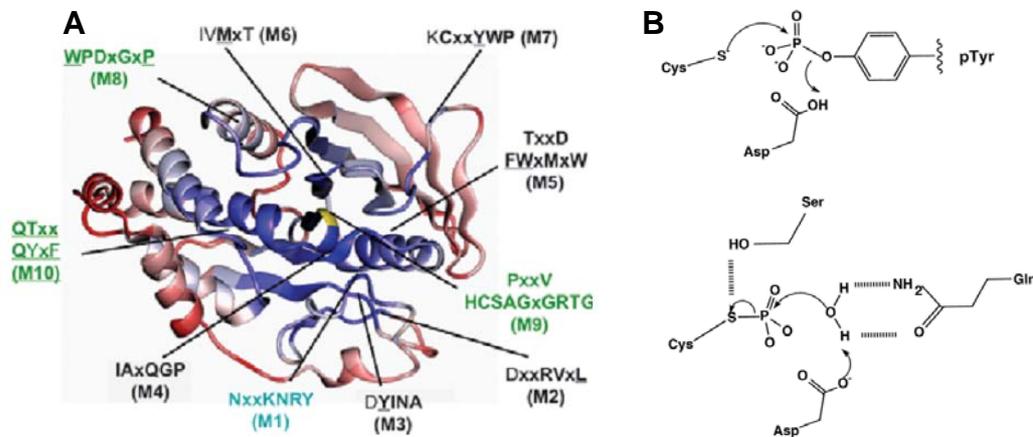


Abb.4 A) links: Übersicht der katalyt. Domäne von PTP1B mit den Motiven M1-M10, entnommen aus Andersen *et al.*, 2001, B) Reaktionsmechanismus aus Wikipedia in Anlehnung an Referenz (Jia *et al.*, 1995).

Der Reaktionsmechanismus verläuft in zwei Stufen (Abb. 4B). Nach der Positionierung des pTyr erfolgt zunächst ein nukleophiler Angriff des aktiven Cystein-Restes aus Motiv M9, wobei die Phosphatgruppe auf das Cystein übertragen wird. Parallel dazu fungiert der Asp-Rest im WPD-Motiv als Säure und protoniert das dabei entstehende Tyrosylalkoholat des Substrats, welches daraufhin als Abgangsgruppe freigelassen wird. Im zweiten Schritt erfolgt die Regeneration des Phosphocysteins. Dabei wird durch das Glutamin in Motiv M10 ein Wassermolekül in der passenden Stellung koordiniert, wobei das deprotonierte Aspartat des WPD-Motivs als konjugierte Base fungiert. Das dabei entstehende Hydroxidion sorgt schließlich für die Abspaltung des Phosphatrestes vom Cystein (Jia *et al.*, 1995; Pannifer *et al.*, 2010).

PTPasen besitzen sowohl eine hohe Aktivität als auch Affinität ($K_m < 1 \mu\text{M}$) sowie *in vitro* auch eine breite Substratspezifität zu tyrosinphosphorylierten Proteinen (Tonks *et al.*, 1988). Daher rührte vormals die Annahme her, dass PTPasen reine Haushaltsenzyme sind mit der Funktion, PTK-induzierte Signale schnell wieder zu beenden. Allerdings hat sich herausgestellt, dass PTPasen durchaus einer engen Regulation unterliegen. Beispielsweise weist die menschliche NPTPase PTPD1 eine FERM-Domäne auf, welche das Enzym zur Kontaktfläche zwischen Plasmamembran und Zykoskelett dirigiert (Chishti *et al.*, 1998). In ähnlicher Weise beinhaltet die NPTPase PTPN9 eine SEC14-Domäne, welche Lipidbindung und Targeting zu Membranen vermittelt (Saito *et al.*, 2007). Weiterhin kann eine sogenannte BRO1-Domäne eine Phosphatase zu Endosomen dirigieren. Ein Beispiel hierfür ist die menschliche NPTPase PTPN23 (Kim *et al.*, 2005). Neben der gerichteten Adressierung zu bestimmten Zielorten innerhalb der Zelle können

Phosphatasen auch durch SH2-vermittelte Wechselwirkungen reguliert werden. Sehr klar wird dies am Beispiel der NTPase SHP-2. Neben der Phosphatasedomäne weist SHP-2 zwei SH2-Domänen auf, welche durch Bindung Tyr-phosphorylierter Proteine die Enzymaktivität auslösen. Im inaktiven Zustand wird das Enzym allosterisch gehemmt, indem die Aminosäurereste Asp61 und Glu76 aus der Verbindungsschleife der N-Terminalen SH2-Domäne mit dem aktiven Zentrum interagieren. Durch Ligandbindung wird dieser Zustand aufgelöst (Neel et al., 2003).

1.4. Die Bedeutung der Dissoziationskonstante im Kontext größerer Protein-Interaktionsnetzwerke

Bisher wurde dargelegt, dass die Signalerzeugung durch post-translationale Modifikation sowie durch Protein-Protein-Wechselwirkungen in Zellen definiert abläuft. Aber durch die Divergenz der Bindungsdomänenspezifität können Signalwege nicht zwingend als isolierte Wege von Wechselwirkungen betrachtet werden.

Sehr eindrucksvoll wird dieser Sachverhalt von Jones et al. 2006 deutlich gemacht. Im Rahmen dieser Studie wurde die Interaktion von 33 pTyr-haltigen Festphasenpeptiden (abgeleitet von den vier EGF-Rezeptoren) mit fast allen menschlichen SH2- und PTB-Domänen durch einen Protein-Microarray untersucht. Dabei wurden K_d -Werte für alle Interaktionen bestimmt. Die Autoren setzten für die K_d eine minimale Affinität von 2 μM als Schwellenwert fest. Bei einer geringeren Affinität wurde eine Interaktion als physiologisch unbedeutend eingestuft.

Es zeigte sich, dass eine einzige Phosphorylierungsstelle des Rezeptors Erb2 (pTyr1139) insgesamt 26 SH2- und 2 PTB-Domänen mit einem K_d von unter 2 μM binden konnte. Alle Phosphorylierungsmotive von Erb2 konnten zusammen sogar 60 verschiedene Proteine binden. Weiterhin konnte die N-terminale SH2-Domäne des Proteins Rasa1 unterhalb des Schwellenwertes an insgesamt 17 Phosphorylierungs-Stellen aus vier untersuchten Rezeptoren binden, wobei die Sequenzen der Erkennungsmotive wenig systematische Überlappung aufwiesen. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, K_d -Werte für die verschiedenen Interaktionen zu bestimmen, die dazu verwendet werden können, Bindungshierarchien aufzustellen und prädiktive Modelle zu unterstützen.

1.4.1. Definition der Dissoziationskonstante

Protein-Protein-Wechselwirkungen sind in aller Regel bimolekulare Reaktionen, die in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 verlaufen. Die Bildung von oligomeren Proteinkomplexen erfolgt durch die Verkettung dieser einzelnen Interaktionen (Pollard, 2010). Die Bindung zweier Moleküle A und B lässt sich mit folgender Reaktionsgleichung beschreiben.



Durch Kollision von Protein A und Protein B entsteht der Komplex AB. Die Komplexbildung steht im Gleichgewicht mit dem Zerfall in die Monomere A und B. Die Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion k_+ beschreibt eine Reaktion zweiter Ordnung. Sie ist abhängig von den Konzentrationen [A] und [B] der beiden Monomere und hat die Einheit $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Im Falle von Protein-Protein Wechselwirkungen bewegen sich die Werte für k_+ aufgrund des großen Proteinvolumens verglichen mit kleinen Molekülen in einem relativ engen Rahmen. Ein guter Richtwert hierfür ist $10^6\text{-}10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Pollard & Earnshaw, 2007). Die Umsatzrate der Bindung R_B beträgt

$$R_B = k_+ [A] [B] \quad (\text{Gleichung 2})$$

Grund hierfür ist die Größe von Proteinen, die Diffusionsvorgänge innerhalb einer Lösung bei allen Proteinen vergleichbar macht.

Die Rückreaktion, der Zerfall des Komplexes AB in die Monomere, ist dagegen eine Reaktion erster Ordnung. Sie hängt allein von der Konzentration des Komplexes ab. Ihre Geschwindigkeitskonstante k_- hat die Einheit s^{-1} und drückt im Wesentlichen die Zerfallswahrscheinlichkeit des Komplexes in einer bestimmten Zeiteinheit aus. Die Umsatzrate der Dissoziation R_D beträgt

$$R_D = k_- [AB] \quad (\text{Gleichung 3}).$$

Befindet sich die Reaktion nach Gleichung 1 im Gleichgewicht, so sind R_B und R_D gleich groß und es gilt

$$k_+ [A] [B] = k_- [AB] \quad (\text{Gleichung 4}).$$

Die Gleichgewichtskonstante K_{eq} der Reaktion ist definiert als das Verhältnis der Umsatzraten von Hin- zu Rückreaktion, gleichbedeutend mit dem Verhältnis der Produktkonzentration zur Eduktkonzentration im Gleichgewicht gemäß

$$K_{eq} = k_+ / k_- = [AB_{eq}] / [A_{eq}] [B_{eq}] \quad (\text{Gleichung 5}).$$

Die Einheit von K_{eq} ist M^{-1} . Je höher der Wert ist, desto mehr Produkt AB wird gebildet und desto stärker ist die Bindung. Über K_{eq} lässt sich auch die freie Enthalpie der Bindung ermitteln:

$$\Delta G = -RT \ln K_{eq} \quad (\text{Gleichung 6}).$$

In den Biowissenschaften findet allerdings traditionsgemäß der reziproke Wert Verwendung, die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_d . Sie ist definiert als

$$K_d = k_- / k_+ = [A_{eq}] [B_{eq}] / [AB_{eq}] \quad (\text{Gleichung 7}).$$

Die Einheit von K_d ist M, je niedriger der Wert, desto stärker die Bindung. Die K_d von A zu B sagt aus, bei welcher Konzentration von B 50% von A als AB gebunden sind. Erhöht man die Konzentration von B, wird sämtliches A als Komplex AB gebunden vorliegen. Senkt man die Konzentration von B, werden Kollisionsereignisse beider Moleküle immer seltener und beide Partner liegen als Einzelmoleküle vor.

Unterhalb eines K_d -Wertes von 10 nM spricht man von einer hochaffinen Bindung, 100 nM gelten als mittelstarke Bindung, Werte oberhalb von 10 μ M als schwache Bindung. Die Interaktion zwischen Biotin und Streptavidin lässt sich beispielsweise aufgrund ihrer enormen Bindungsstärke ($K_d \sim 10^{-15}$ M) als quasi-kovalent bezeichnen. Wie in den Gleichungen 5 bis 7 vermerkt, muss zur Bestimmung von K_{eq} oder K_d die Reaktion im Gleichgewicht vorliegen.

1.5. Werkzeuge zur Darstellung und Charakterisierung Tyrosin-phosphorylierter Proteine

In den vorherigen Abschnitten wurde die physiologische Bedeutung Tyrosin-phosphorylierter Protein-Protein-Wechselwirkungen dargelegt, wie auch die Notwendigkeit der Affinitätsbestimmung zur Interpretation von Protein-Interaktionsnetzwerken. Im Folgenden soll nun auf Werkzeuge der Interaktionsanalyse eingegangen werden. Hierzu zählt ein qualitativer Nachweis der direkten Bindung ebenso wie die Quantifizierung der Bindungsaffinität in Form der Dissoziationskonstante. Dabei wird das Augenmerk insbesondere auf Methoden zur K_d -Bestimmung gerichtet, wie auf die Wege zur Synthese ortsspezifisch phosphorylierter Proteine. Der Zielsetzung der Arbeit folgend werden wichtige Aspekte der zellfreien Proteinsynthese erläutert.

1.5.1. Die experimentelle K_d Bestimmung von Protein-Protein-Wechselwirkungen

Zur K_d -Bestimmung von Protein-Protein-Wechselwirkungen werden häufig zwei Methoden verwendet, die Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR, engl. surface plasmon resonance) sowie die Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC, engl. isothermal titration calorimetry).

1.5.1.1. Oberflächen-Plasmon-Resonanz und Isotherme Titrationskalorimetrie

Die K_d -Bestimmung durch SPR wurde durch die schwedische Firma BIACORE (mittlerweile ein Teil von GE Healthcare) kommerzialisiert, wodurch der Name häufig synonym für SPR steht. Die Messmethode basiert grob gesagt auf der Messung der Schichtdicke eines Sensorchips, auf dem einer der Bindungspartner immobilisiert wird (End et al., 1993; Gruen et al., 1993). Der zweite Bindungspartner befindet sich in Lösung und wird auf dem Chip inkubiert. Findet eine Bindung statt, vergrößert sich die Schichtdicke. Ein Referenzchip mit immobilisierten Liganden und leerem Puffer dient als Kontrolle. Die Auslesung der Messung erfolgt kontinuierlich, sodass das Bindungsereignis in Echtzeit beobachtet und die Geschwindigkeitskonstante k_+ (im BIACORE-Sprachgebrauch k_{on}) gemessen werden kann. Nach erfolgter Bindung werden beide Zellen mit leerem Puffer gespült, wobei gemäß Gleichung 1 (Kapitel 1.4.1.) die Dissoziation des Komplexes in Echtzeit beobachtet wird. Hierdurch erhält man die Geschwindigkeitskonstante k_- (oder k_{off}). Gemäß Gleichung 7 wird dann daraus der K_d bestimmt. Obwohl diese Methode gut durchdacht ist und sich etabliert hat, weist sie einige Nachteile auf. Neben der Tatsache, dass ein Partner immobilisiert werden muss, soll für ein aussagekräftiges Ergebnis die Messung mehrfach wiederholt werden. Dafür muss der gesamte Komplex wieder aufgelöst und der Chip regeneriert werden, wofür die richtigen Pufferbedingungen ausgetestet werden müssen. Im Fall von immobilisierten Nukleinsäuren, Oligosacchariden oder Peptiden kann dies aufgrund der erhöhten Stabilität bzw. der nicht vorhandenen Sekundärstruktur durch harsche Bedingungen wie Detergenzien (SDS) oder starke Säuren und Basen geschehen. Ein immobilisiertes Protein würde dabei denaturieren, wodurch ein neuer Chip beladen werden müsste. Dies ist nicht nur teuer. Darüber hinaus ist die Vergleichbarkeit der Beladung und Proteinqualität nicht vollständig zu gewährleisten. Es verwundert daher nicht, dass zur Bestimmung von K_d -Werten SH2-abhängiger Bindungen durch BIACORE üblicherweise ein kurzes Phosphopeptid immobilisiert wird.

Eine weitere instrumentelle Methode zur Bestimmung von K_d -Werten ist die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC). Wie der Name andeutet, wird die freigesetzte Bindungswärme (-enthalpie) detektiert, die bei jeder Wechselwirkung anfällt (Baker & Murphy, 1997; Jelesarov & Bosshard, 1999). Experimentell wird ein spezielles Kalorimeter verwendet, welches zwei Messzellen enthält, eine Hauptzelle sowie eine Referenzzelle. In die Hauptzelle wird ein Bindungspartner vorgelegt, der zweite Bindungspartner wird in

mehreren Schritten (mind. 20) per Mikroinjektion zugesetzt bis die Sättigungsphase erreicht ist. Anders als im BIACORE wird die K_d hier in Lösung bestimmt.

Die Methode ist hochsensitiv, ihr Hauptproblem besteht aber darin, dass sehr große Mengen an Material für eine einzelne Messung benötigt werden. Im Falle einer isolierten SH2-Domäne ($M \sim 12$ kDa) liegt der Proteinbedarf sehr schnell im Milligramm-Bereich. Zum Vergleich: Per Coomassie-Färbung kann im SDS-PAGE eine Bande mit einer Masse von 100 ng (0,0001 mg) noch detektiert werden. Im Falle unmodifizierter Bindungspartner lassen sich diese Proteinmengen ohne weiteres darstellen. Für ein postranslational-modifiziertes (z.B. phosphoryliertes) Protein mit vergleichbarem Modifizierungsgrad ist dies allerdings beinahe unmöglich, im Besonderen falls z.B. die K_d -Werte eines Phosphoproteins gegen mehrere SH2-Domänen bestimmt werden sollen. Es verwundert abermals nicht, dass alle K_d -Werte für SH2-vermittelte Interaktionen mittels ITC anhand von tyrosinphosphorylierten Festphasenpeptiden bestimmt wurden.

1.5.1.2. K_d -Bestimmung mittels Microscale Thermophoresis

Die Microscale-Thermophoresis (MST) ist eine verhältnismäßig neue Methode zur Messung von Dissoziationskonstanten. Sie beruht auf dem Effekt der Thermophoresis, wonach sich Teilchen durch einen Temperaturgradienten innerhalb einer Flüssigkeit oder einem Gas bewegen. Der Effekt ist auch als Ludwig-Soret-Effekt bekannt und wurde bereits im 19. Jahrhundert von Carl Ludwig (1856) und Charles Soret (1879) beschrieben.

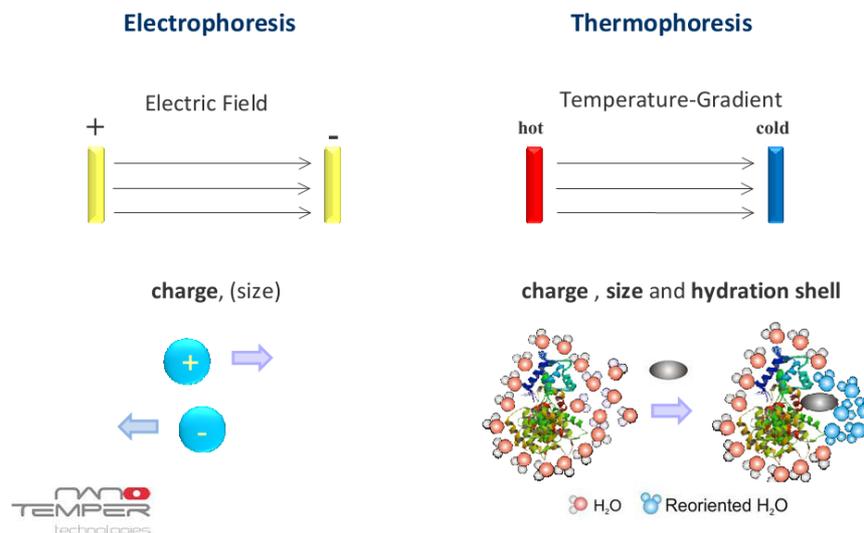


Abb. 5.: Grundlage der MST. Im Vergleich zur Elektrophorese basiert die Qualität der thermophoretischen Auftrennung auf der Änderung der Ladung, der Größe und der Anordnung der Hydratationshülle eines Makromoleküls durch Komplexbildung. Quelle: Nanotemper Technologies, München.

Im Gegensatz zu Trennmethoden wie der Elektrophorese findet bei der Thermophorese keine gerichtete, sondern eine statistische Verteilung statt. In der Regel haben Teilchen innerhalb des Temperaturgradienten am wärmeren Pol eine niedrigere Aufenthaltswahrscheinlichkeit, da sie hier stärker auswandern. Dies kann sich allerdings je nach der Natur der Teilchen und des Lösungsmittels auch umkehren.

Die Methode der Anwendung des Ludwig-Soret-Effekts zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten von Makromolekülen wurde vor wenigen Jahren in der Arbeitsgruppe von Prof. Braun entwickelt (Duhr et al., 2004, 2006) und im Weiteren unter dem Namen Microscale Thermophoresis (MST) als Technologie vermarktet. Grundlegend für die Anwendung im Bereich biologischer Moleküle sind der Einsatz moderner optischer Techniken und Fluoreszenzmarkierung eines der beiden Zielmoleküle. Die Erzeugung des Temperaturgradienten wird durch einen stark fokussierten Infrarotlaser erreicht. Dieser wird auf einen Bereich von nur 1 μm Durchmesser fokussiert. Obwohl nur eine Erwärmung von 1-2 K erzeugt wird, entspricht dies einem Gradienten einer Größenordnung von 1000 K/mm. Parallel dazu wird das fluoreszenzmarkierte Molekül durch einen vis-Laser angeregt und das Diffusionsverhalten im zu erheizenden Kernbereich verfolgt.

Die Möglichkeit der Bestimmung molekularer Wechselwirkungen ist in Abb. 5 veranschaulicht. Durch die Bindung eines Liganden an das (fluoreszenzmarkierte) Zielmolekül verändert sich dessen Größe, Nettoladung und Hydratationshülle. Gemessen wird der Unterschied zwischen gebundenem und freiem Zielmolekül. Eine Messung besteht aus einer Verdünnungsreihe des unmarkierten Partners, während der fluoreszenzmarkierte Partner jedem Glied der Reihe in konstant niedriger Konzentration zugegeben wird. Die Proben werden in jeweils eine Glaskapillare aufgezogen und im Messgerät vermessen. Für eine einzelne Messung reicht eine Stoffmenge von 4 pmol des fluoreszenzmarkierten Partners (entsprechend 160 ng für ein 40 kDa Protein). Mittels MST können nicht nur Protein-Protein-Wechselwirkungen bestimmt werden, sondern auch die von Nukleinsäuren sowie Interaktionen zwischen Makromolekülen und kleinen Liganden.

Der geringe Fokussierungsradius sowie die Sensitivität von Fluorophoren stellt den Hauptgrund dar, warum dieses Verfahren gegenüber den Methoden SPR und ITC bemerkenswerte Vorteile in sich birgt. Im Rahmen der Arbeit wurde der Entschluss gefasst, Dissoziationskonstanten der Bindung von ADAP an SH2-Domänen mit MST zu bestimmen. Dadurch gelang es, nach bestem Wissen und Gewissen, zum ersten Mal K_d -Werte für die SH2-Domänen vermittelte Bindung mit einem pTyr-haltigen Vollängen-Ligandprotein zu bestimmen.

1.5.2. Strategien zur ortsspezifischen Phosphorylierung von Proteinen

Wie dargelegt wurde, besteht das Problem der Darstellung eines ortsspezifisch phosphorylierten Proteins in der Abhängigkeit von Proteinkinasen und der Tatsache, dass Phosphorylierungen wie alle anderen post-translationalen Modifikationen nicht genetisch kodiert sind. Auf der Hand liegende Lösungen wie die gerichtete Mutagenese aller modifizierbaren Aminosäurereste mit Ausnahme der gewünschten Position sowie die Totalsynthese des Proteins über Festphasenpeptidsynthese stellen nur unzureichende Hilfsmittel dar.

Die gerichtete Mutagenese aller nicht-gewünschten phosphorylierbaren Aminosäurereste (z.B. Tyrosin zu Phenylalanin oder Alanin) ist neben der Zeitaufwendigkeit auch vor dem Hintergrund problematisch, dass Hydroxygruppen gute Donoren für Wasserstoffbrückenbindungen sind. Hierdurch kann die Tertiärstruktur von Proteinen stark beeinflusst werden. Über Festphasenpeptidsynthese lassen sich bekanntermaßen Peptide bis zu einer Kettenlänge von etwa 80 Aminosäuren synthetisieren, die Synthese längerer Peptide steht nicht mehr im ökonomischen Verhältnis zur *in vivo* Synthese.

1.5.2.1. Ortspezifische Mutationen

Die ersten und am leichtesten zugänglichen Studien zum ortsspezifischen Einfluss von Phosphorylierungen bestehen in der ortsspezifischen Mutagenese des betreffenden Aminosäurerestes. Typischerweise werden Serin bzw. Threonin gegen Alanin ausgetauscht und Tyrosin gegen Phenylalanin, wodurch an betreffender Stelle keine Phosphorylierung mehr möglich ist (Tarrant & Cole, 2009). Auf diese Weise lassen sich phänotypische Differenzen betrachten, die sich auf das Fehlen einer entsprechenden Phosphorylierung zurückführen lassen. Neben der Tatsache, dass es sich hierbei um eine indirekte Beweisführung handelt, liegen die Schwächen dieser Strategie in der Veränderung der Polarität des Proteins sowie der möglichen Beeinflussung von Proteinfaltung und Stabilität. Darüberhinaus kann das Fehlen der recht häufigen O-Glykosylierungen an Serin und Threonin sowie der Sulfatisierung von Tyrosin das Verhalten eines Proteins im zellulären Kontext weitreichend verändern.

1.5.2.2. Ortspezifischer Ersatz durch ähnliche Aminosäurereste

Eine sehr einfache Strategie besteht im Austausch des betreffenden Aminosäurerestes durch eine natürliche Aminosäure, welche den Zustand einer phosphorylierten Aminosäure nachahmt. In der Praxis bedeutet dies einen Austausch von Phosphoserin (pSer) oder Phosphotyrosin (pTyr) gegen Aspartat und Glutamat (Thorsness & Koshland, 1987). Die dadurch eingeführte negative Ladung ist primär für die Erkennung als Pseudosubstrat verantwortlich, wenngleich die Seitengruppen sich strukturell, hinsichtlich der Größe - der

Phosphoester ist deutlich größer als eine Carbonsäuregruppe - und der Koordinationsmöglichkeiten merklich unterscheiden. In einigen Beispielen (Potter & Hunter, 1998; Hao et al., 1996) konnte die Serinphosphorylierung ausreichend imitiert werden. Insbesondere gilt dies für die phosphorylierungsabhängige Trimerisierung des Signalproteins Smad3 (Chacko et al., 2001). Allerdings lässt sich dieser Weg nicht auf sonderlich viele Proteine übertragen. Insbesondere die Wechselwirkung von pSer-haltigen Ligandproteinen mit 14-3-3 Domänen lässt sich auf diese Weise nicht vermitteln (Zheng et al., 2003).

Ein anderer Ansatz besteht in der Nachahmung von pTyr-Resten durch p-Carboxymethyl-Phenylalanin (cmF). Diese Aminosäure lässt sich durch Suppression des *amber*-Stop-Codons (TAG) ortsspezifisch in Proteine einbauen (Xie et al., 2007). Die Röntgenstrukturanalyse des Komplexes aus dem modifizierten Tetrapeptidliganden cmFEEI und der Lck-SH2-Domäne konnte ein Koordinationsverhalten der unnatürlichen Aminosäure zeigen, welches einem pTyr-haltigen Liganden (pYEEI) ähnlich ist (Tong et al., 1998). Allerdings war in der gleichen Studie die Dissoziationskonstante des cmF-haltigen Liganden 450-fach schwächer als die des pTyr-haltigen Gegenstücks. Damit ist diese Modifikation für die Untersuchung pTyr/SH2-vermittelter Proteinkomplexe wenig geeignet (Waksman et al., 1992, 1993). Somit sind andere Strategien erforderlich.

1.5.2.3. Ersatz der Phosphorylierung durch Sulfatierung

Eine weitere einfache Möglichkeit der Imitation von Phosphoserin kann laut Lamoureaux und Lee 2011 durch Umsetzung von Proteinen mit $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ erfolgen, wodurch Cysteinresten sulfoniert werden. Dadurch wird eine Phosphoserin ähnliche und geladene Struktur erzeugt. Zur Modifikation einer Serin-Phosphorylierungsstelle muss diese lediglich mittels ortsspezifischer Mutagenese durch Cystein ersetzt werden. Durch Behandlung der Proteine mit Reduktionsmitteln wie DTT konnte die Sulfatgruppe wieder entfernt werden. Der Vorgang ist reversibel und durch Pufferaustausch beliebig oft wiederholbar.

Mit dieser Methode gelang es, die wichtigen Phosphorylierungsstellen 218 und 222 der menschlichen MEK1-Kinase (einer MAP-Kinase) umzusetzen und deren Erkennung nachzuweisen. Dem großen Vorteil der einfachen Darstellung und Handhabung steht allerdings die nicht vorhandene Selektivität der Reaktion gegenüber, da auch nativ vorkommende Cysteinreste modifiziert werden.

In ähnlicher Weise wurde die Substitution von pTyr durch O-Sulfotyrosin (sTyr) untersucht. Attraktiv ist diese Aminosäuremodifikation durch das Vorhandensein einer sTyr-spezifischen Aminoacyl-tRNA-Synthetase, die den ortsspezifischen Einbau durch *amber*-Suppression ermöglicht (Liu & Schultz, 2006). Die Tatsache, dass es sich bei sTyr um eine natürlich vorkommende, posttranslationale Modifikation handelt (Sako et al., 1995; Stone et

al., 2009), ist interessant, zumal beobachtet wurde, dass sTyr-haltige kompetitive Inhibitoren der Phosphatase PTP1N diese ähnlich dem pTyr-haltigen Substrat koordinieren (Glover & Tracey, 1999). Allerdings weist die Sulfonatgruppe im Vergleich zur Phosphatgruppe Unterschiede in der Komplexierungsgeometrie sowie eine veränderte Ladung bei physiologischen pH-Werten auf. Weiterhin konnten *in vitro* gebildete sTyr-spezifische Antikörper pTyr nicht erkennen (Hoffhines et al., 2006).

Eine Studie (Ju et al., 2013) zur Wirksamkeit von sTyr als Ersatz für pTyr zeigt ähnliche Resultate wie beim Ersatz von pTyr durch cmF (siehe Kapitel 1.5.2.2.). In der Studie konnte die phosphorylierungsabhängige Dimerisierung des Transkriptionsfaktors STAT1 durch sTyr701 anhand der spezifischen DNA-Bindung belegt werden. Den Autoren zufolge würde das sTyr-modifizierte Protein allerdings eine deutlich geringere Bindungseffizienz *in vivo* erzielen: Für den Komplex aus dem bereits mehrfach genannten (pY)EEI-Peptid und der SH2-Domäne von Src wurde ein K_d von etwa 60 nM ermittelt, während der Austausch des Phosphotyrosins gegen sY zu einem dramatischen Abfall der Affinität auf etwa 9600 nM führte. Durch Punktmutationen der für die pTyr-Bindung wichtigen Aminosäuren der pTyr-Bindungstasche von Src-SH2 konnte eine Angleichung der Affinitäten beider Modifikationen erzielt werden, allerdings mit K_d -Werten im mikromolaren (μ M) Bereich und somit mit schwindender Affinität für den regulär phosphorylierten Zustand.

1.5.2.4. Direkter Einbau von Phosphoserin über *amber*-Suppression

Eine direkte Möglichkeit zum ortsspezifischen Einbau von Phosphoserin in Proteine wurde kürzlich in der Arbeitsgruppe von Dieter Söll gezeigt (Park et al., 2011). Hierbei wird eine metabolische Besonderheit methanogener Archaeen genutzt: eine Aminoacyl-tRNA-Synthetase, welche Phosphoserin auf eine CysteinyI-tRNA überträgt (Sep-tRNA^{Cys}). Benötigt wird diese ungewöhnlich beladene tRNA als Edukt zur Biosynthese von Cystein (Cys-tRNA^{Cys}), da diesen Archaeen eine CysteinyI-tRNA-Synthetase fehlt.

Um Phosphoserin ortsspezifisch in *E. coli* durch *amber*-Suppression einbauen zu können, wurde eine Cys-tRNA aus *Methanocaldococcus jannaschii* (mit mutiertem *amber*-Anticodon) sowie eine Phosphoseryl-tRNA-Synthetase aus *Methanococcus maripaludis* gewählt. Obwohl die Beladung der tRNA mit Phosphoserin *in vitro* gelang, konnte der Einbau in Proteine in *E. coli* zunächst nicht bewerkstelligt werden. Der Grund hierfür war die fehlende Wechselwirkung der beladenen Sep-tRNA^{Cys} mit dem Elongationsfaktor EF-Tu. Dieses Problem wurde durch Punktmutationen von sechs Aminosäureresten in EF-Tu gelöst. *E. coli*-Stämme mit dem modifizierten Elongationsfaktor (EF-Sep) konnte schließlich Phosphoserin direkt eingebaut werden. Belegt wurde dieser abermals anhand der menschlichen MEK1 Kinase.

1.5.2.5. Einbau unnatürlicher Aminosäuren als Ersatz für Phosphotyrosin

Neben den bereits erwähnten Phosphotyrosin-Analoga cmF und sTyr (vgl. Kapitel 1.5.2.2. und 1.5.2.3.) wurden unterschiedliche substituierte Phosphonate (Pmp) beschrieben (Abb. 6), welche anstelle des Phosphoesters eine Methyleneinheit aufweisen und Phosphatase-stabil sind (Burke et al., 1994). Entsprechende Verbindungen wurden als Phosphatase-stabile Phosphotyrosin-Analoga über Festphasenpeptidsynthese in Peptide eingebaut. Hierbei stellte sich heraus, dass das difluorsubstituierte Phosphonat (F_2Pmp) mit pTyr vergleichbare Eigenschaften besitzt, während die Funktionalität des einfach fluorsubstituierten (FPmp) über das unsubstituierte (Pmp) bis zum Monohydroxysubstituierten Phosphonat (HPmp) merklich abnahm.

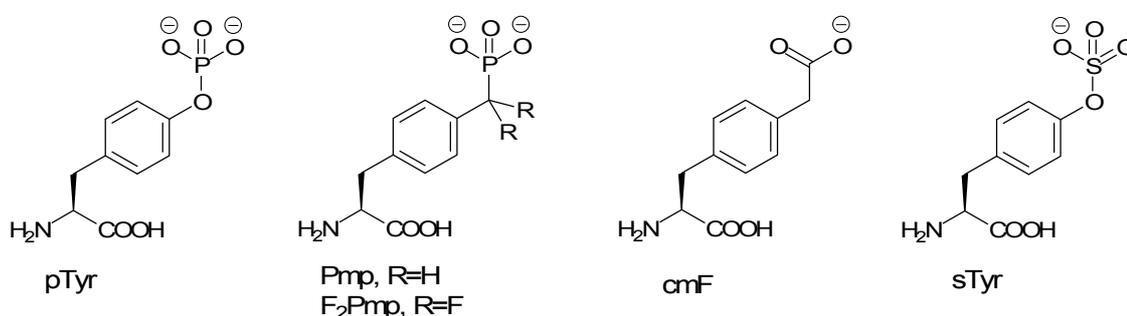


Abb. 6: Phosphotyrosin und literaturbekannte Anaolga

Beim Versuch, durch Deprotonierung von Pmp eine dem F_2Pmp ähnliche Wirkung zu erzeugen, wurde festgestellt, dass die Funktionalität pH unabhängig war und eher auf die Imitation der polaren Wechselwirkungen der freien Elektronenpaare des Sauerstoffs durch die Fluorsubstituenten beruht (Chen et al., 1995).

1.5.2.5.1. Semisynthese von ortsspezifisch phosphorylierten Proteinen

Dieser Ansatz bedient sich einer geradlinigen Strategie. Der Großteil des Proteins wird in einem Wirtsorganismus überexprimiert und aufgereinigt, während der Sequenzbereich mit der zu modifizierenden Position per Festphasenpeptidsynthese dargestellt und anschließend an das Zielprotein ligiert wird. Die Ligationsmethode der Wahl ist die EPL (Expressed Protein Ligation), welche auf der Methode der NCL (native chemische Ligation) basiert (Hackenberger & Schwarzer, 2008).

Bei der nativen chemischen Ligation (NCL) handelt es sich um ein Ligationsverfahren ungeschützter Peptide, das spontan und chemoselektiv unter milden Bedingungen abläuft. Die zu ligierenden Peptide werden als N- und C-Peptid bezeichnet. Für die NCL muss der C-Terminus des N-Peptids als Thioester modifiziert sein; die N-terminale Aminosäure des C-Peptids muss ein Cystein sein (Dawson et al., 1994, Hackenberger et al., 2005). Der

Schlüsselschritt der NCL ist die reversible Umesterung des Thioesters durch Cystein, anschließend erfolgt der irreversible Angriff der N-terminalen NH_2 -Gruppe des C-Peptids (geläufig als „Capture and Rearrangement“). Hierdurch wird per Umlagerung eine neue Peptidbindung geknüpft. Die Chemoselektivität der Reaktion wird durch die räumliche Nähe der freien Aminogruppe zum Thioester erzeugt, andere Cysteine des C-Peptids können nur die reversible Umesterung eingehen, nicht jedoch die Umlagerung. Die NCL bietet die Möglichkeit, im Rahmen der Festphasensynthese modifizierte Peptide an Proteine zu ligieren und somit ortsspezifisch modifizierte Proteine darzustellen. Allerdings hat diese Methode auch Nachteile. Durch reine NCL von Peptiden lassen sich diese zwar über mehrere Ligationsschritte zu kurzen Proteinen verbinden, allerdings ist dies sehr langwierig und zu aufwendig, wenn der Anwendungsfokus nicht auf der Synthese selbst liegt.

Die Erweiterung der Methode zur Ligation von Peptiden mit Proteinen wird als Expressed Protein Ligation (EPL) bezeichnet, wobei ein Peptid an ein exprimiertes Protein ligiert wird (Abb. 7). Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass erheblich längere Polypeptidketten gebildet werden können als durch NCL (Perler, 2002; Hackenberger & Schwarzer, 2008). Die Ligation des Peptids kann dabei sowohl am N- als auch am C-Terminus des Proteins erfolgen. Die häufigere Variante ist die Ligation eines N-Proteins mit einem (modifizierten) C-Peptid. Hierfür wird das Protein als Fusionsprotein mit einem Intein und einer C-terminalen Chitin-Bindungsdomäne (CBD) exprimiert. Durch die CBD kann das ganze Protein auf einer Chitin-Affinitätsmatrix zur Aufreinigung immobilisiert werden. Durch das Intein wird auf natürliche Weise der Thioester gebildet. In einer folgenden Einzelschritt-Reaktion wird durch Zugabe eines Thiols (meist 2-Mercaptoethansulfonat, MESNA) und des Cystein-haltigen Peptids in Lösung über den Thioester das semisynthetische Protein gebildet. Diese Variante wurde erstmals von Muir et al. 1998 beschrieben, wobei die Semisynthese von Csk-Kinase mit einem C-terminal pTyr-haltigen Peptid gelang.

Die andere Möglichkeit ist die Ligation eines N-terminalen Peptids an das exprimierte Protein. Hierfür benötigt das Peptid wie bei der NCL einen Carboxythioester, das Protein muss ein N-terminales Cystein besitzen. Da der genetische Code in der Regel ATG als Startcodon vorsieht und damit Methionin als erste Aminosäure eingebaut wird, muss der N-Terminus des Proteins so gespalten werden, dass ein N-terminales Cystein entsteht. Dies lässt sich mit verschiedenen Proteasen frei nach Wahl bewerkstelligen, z.B. durch Met-Aminopeptidasen, Sumo-Protease oder Faktor Xa (Xu et al., 1999). Es folgt wie im vorigen Fall eine Umesterung nebst Ligation. Eine nicht minder große Limitation besteht darin, dass durch EPL zwar große Proteine selektiv markiert werden können, die Positionierung der Modifikationen allerdings auf den Bereich beider Termini limitiert ist.

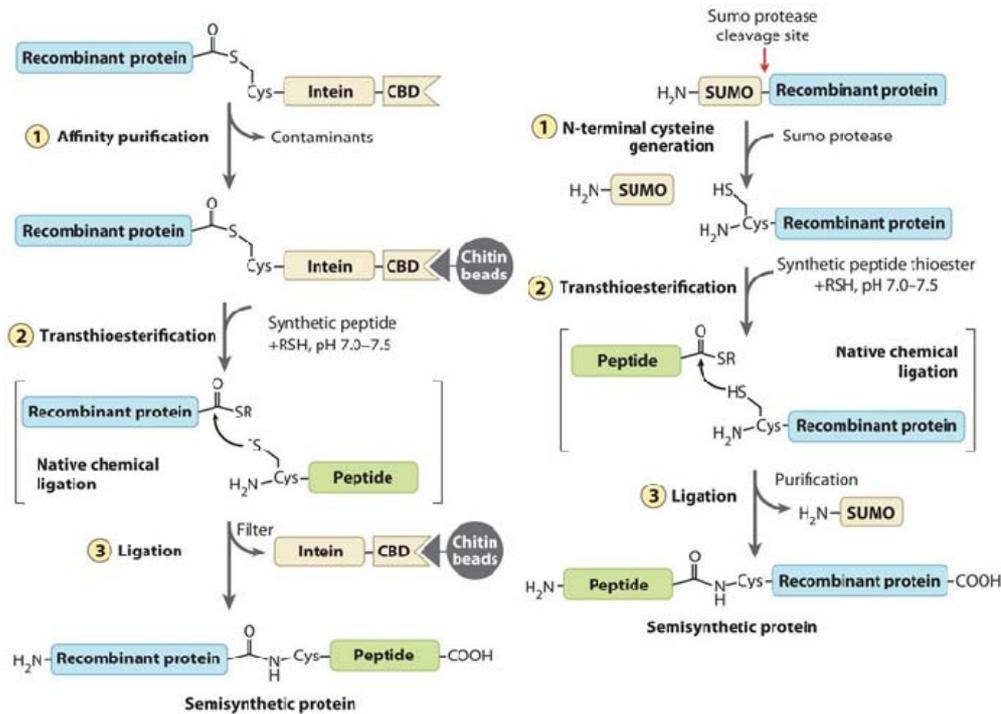


Abb. 7: Semisynthese von Proteinen durch Expressed Protein Ligation (nach Tarrant & Cole, 2009)

1.5.3. Chemoselektive und bioorthogonale Reaktionen zur Proteinmodifikation

Chemoselektive, bioorthogonale Reaktionen haben die Forschungsmöglichkeiten im Bereich der Chemischen Biologie entscheidend bereichert, wenn nicht gar revolutioniert. Beide Attribute werden häufig synonym verwendet, jedoch sollte man diese unterscheiden. Chemoselektivität ist definiert als die bevorzugte Reaktion eines chemischen Reagens mit einer oder mehrerer funktioneller Gruppen. Von hoher Chemoselektivität spricht man, falls die betreffende Reaktion nur mit einer geringen Zahl funktioneller Gruppen verläuft (IUPAC, 1997).

Bioorthogonalität bezeichnet eine Reaktion, die in einem biologischen System ablaufen kann und mit diesem weder wechselwirkt noch es behindert (Sletten & Bertozzi, 2011). Bioorthogonalität wird häufig durch die Verwendung hoch chemoselektiver funktioneller Gruppen erreicht, allerdings kann diese effektiv auch durch Enzymspezifität vermittelt werden. Ein Beispiel hierfür ist der in dieser Arbeit zur bioorthogonalen Fluoreszenzmarkierung verwendete Snap-Tag (Keppler et al., 2003, 2004), der Halo-Tag (Los et al., 2008) oder der Avi-Tag, der zur ortsspezifischen Biotinylierung verwendet wird (Athavankar & Peterson, 2003).

1.5.3.1. Ortspezifischer Einbau nicht-kanonischer Aminosäuren

Chemoselektive Reaktionen benötigen als Edukte funktionelle Gruppen, welche nicht auf anderen Molekülen im Reaktionsgemisch vorhanden sind. Für den Einsatz chemoselektiver

Reaktionen auf Proteinebene bedeutet dies, dass die funktionellen Gruppen sämtlicher kanonischer Aminosäuren für ortspezifische, bioorthogonale Reaktionen nicht zur Verfügung stehen. Daher wird eine Strategie benötigt, unnatürliche Aminosäuren ortspezifisch in Proteine einzubauen.

Die Ortspezifität auf Proteinebene wird allein durch den genetischen Code vermittelt, der bekanntermaßen 64 Codons, also 64 Signale umfasst. Von dieser Auswahl werden 61 Codons zum Einbau der kanonischen 20 Aminosäuren verwendet. Um unnatürliche Aminosäuren ortspezifisch einbauen zu können, kann eines der drei Nonsense-Codons verwendet werden, welche normalerweise zum Translationsabbruch führen (Chin, 2011; Wang et al., 2009a; Robertson et al., 1989). Diese sind UAG (genannt *amber*), UAA (*ochre*) sowie UGA (*opal*). Die Trivialnamen leiten sich von UAG ab, das nach dessen Entdecker Harris Bernstein (Bernstein, engl. *amber*) in Analogie benannt wurde. Des Weiteren wird die 22. proteinogene Aminosäure Pyrrolysin (Pyl) (Hao et al., 2002) *in vivo* durch *amber* kodiert, während die 21. proteinogene Aminosäure Selenocystein (Sec) durch *opal* kodiert wird. Allerdings treten diese Aminosäuren selten auf, Pyl nur in einigen methanogenen Archaeen. Im Regelfall liegen für die drei Stopcodons keine tRNAs mit passendem Anticodon vor.

Um ein Stopcodon als Sense-Codon für die Einführung einer unnatürlichen Aminosäure nutzen zu können, wird eine Suppressor-tRNA benötigt, für die Suppression des *amber*-Codons beispielsweise eine tRNA_{CUA}. Für die Beladung mit der gewünschten Aminosäure wird darüber hinaus eine zugehörige Aminoacyl-tRNA-Synthetase (aaRS) benötigt, welche sowohl die tRNA als auch die Aminosäure erkennt und diese unter ATP-Verbrauch verestert. Um zu verhindern, dass die unnatürliche Aminosäure auf tRNAs mit Sense-Codons, und die tRNA_{CUA} mit kanonischen Aminosäuren beladen wird, müssen sowohl aaRS als auch tRNA_{CUA} aus einem anderen Organismus entnommen werden. Sie werden als orthogonales Paar bezeichnet. Anschließend wird die AS-Bindungstasche der aaRS soweit mutiert, dass sie die gewünschte unnatürliche AS erkennt. Ebenso wird das Anticodon der tRNA zu CUA (also Anti-UAG) ausgetauscht. Zum ersten Mal wurde dies in der Arbeitsgruppe um Peter G. Schultz im Jahr 2001, demonstriert. Es wurde ein TyrRS/tRNA^{Tyr} Paar aus *Methanococcus jannaschii* zum ortspezifischen Einbau von O-Methyl-Tyr in *E.coli* umfunktioniert (Wang et al., 2001). Es folgten orthogonale Paare für p-Azidophenylalanin (Chin et al., 2002a), p-Benzophenon (Chin et al., 2002b) und viele andere.

1.5.3.2. Einige gebräuchliche bioorthogonale Reaktionen zur Modifizierung von Proteinen

Nachdem beschrieben wurde, wie unnatürliche Aminosäuren in Proteinen positioniert werden können, nun einige Beispiele für chemoselektive, bioorthogonale Reaktionen (Abb. 8). Hierzu zählen die Hydrazon- sowie die Oximbildung. Hierbei wird die Ketogruppe als Aldehyd oder Keton in ein Biomolekül eingeführt, das Hydrazon oder das Oxim werden auf kleinen organischen Molekülen hinzugeführt. Die Einführung der Ketogruppe kann entweder über *amber*-Suppression als p-Aceto-Phe erfolgen (Wang et al., 2003), ebenso lassen sich endständige Ser-Reste mit NaIO_4 zum α -Ketoaldehyd oxidieren (Geoghegan & Stroh, 1992).

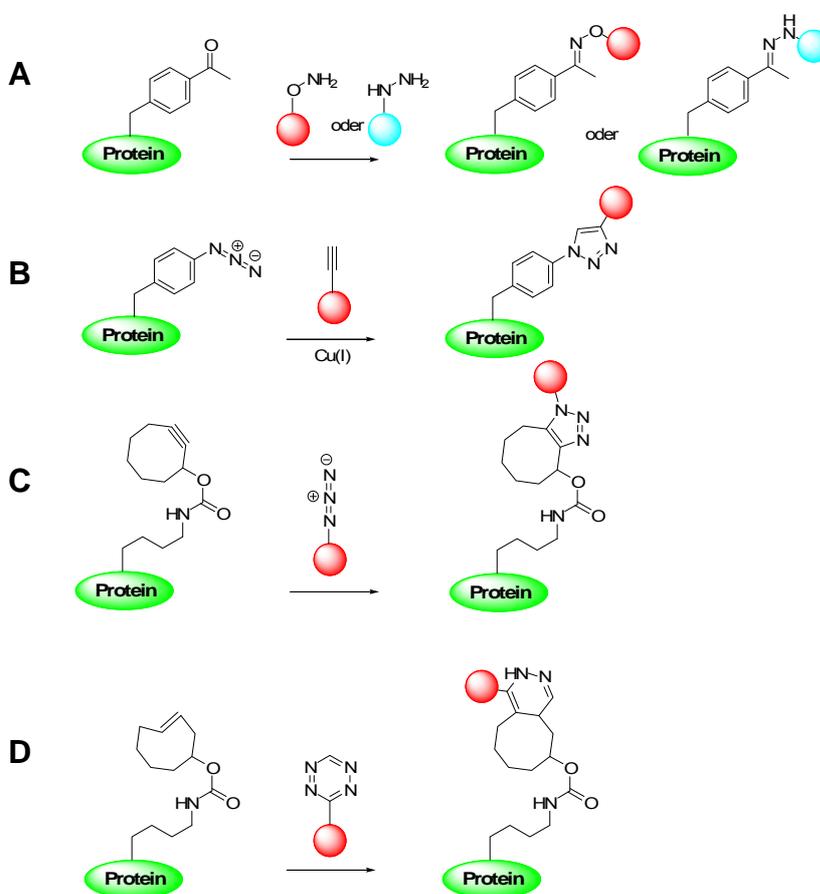


Abb. 8: Überblick über einige typische, gebräuchliche bioorthogonale Reaktionen ((nach Lemke)). A) Oxim- oder Hydrazonligation an Ketogruppen. B) Cu-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC). C) Spannungsinduzierte Alkin-Azid-Cycloaddition (SPAAC). D) Spannungsinduzierte Diels-Alder-Reaktion mit inversen Elektronenbedarf (SPIEDAC).

Eine weitere, wichtige Klasse bioorthogonaler Reaktionen ist die Alkin-Azid-Cycloaddition unter Bildung eines Triazols. Die Funktionalisierung der Azidogruppe kann variabel sein, für die Reaktionsführung entscheidend ist das Alkin. Die Reaktion wurde von Huisgen 1963

erstmals charakterisiert, allerdings erforderte die Reaktion Hitze, wodurch sie für die Anwendung in biologischen Systemen zunächst nicht nutzbar war. Die Führung der Reaktion bei Raumtemperatur gelang erst durch den Zusatz katalytischer Mengen von Cu(I) (Rostovtsev et al., 2002; Tornøe et al., 2002), wodurch diese Variante als Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC) bezeichnet wird. Die Verwendung von Cu(I) *in vivo* ist aufgrund seiner cytotoxischen Natur (Link & Tirrell, 2003) nicht unproblematisch, *in vitro* kann sich das Problem der koordinierten Bindung von Cu-Ionen an das Peptidrückgrat von Proteinen stellen, welches sich nur mühsam wieder entfernen lässt.

Eine Weiterentwicklung dieser Reaktion verwendet cyclische Alkine (typisch: Cyclooctatriene), welche durch die Ringspannung eine erhöhte Aktivierung aufweisen. Dieses Verfahren wurde von Bertozzi *et. al* als spannungsinduzierte Alkin-Azid-Cycloaddition entwickelt (SPAAC) (Agard et al., 2004; Baskin et al., 2007).

Die Reaktion zeichnet sich durch hohe Umsatzraten aus, wobei diese zum Teil auf Kosten der Chemoselektivität anfallen und sich dadurch für den *in vivo* Einsatz im Cytosol nur bedingt eignen (van der Linden et al. 2012). Eine weitere wichtige bioorthogonale Reaktion ist die spannungsinduzierte Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (SPIEDAC). Hierbei reagiert ein Tetrazin mit einem *trans*-Cycloalken (Devaraj et al., 2009). Für den Einbau der Cycloalkene liegen geeignete Aminosäuren und orthogonale Systeme vor (Borrmann et al., 2012; Plass et al., 2012). Eine weitere große Gruppe bioorthogonaler Reaktionen hat die Staudinger-Reaktion als Grundlage, welche zwischen Azidogruppen und P-(III)-Verbindungen ohne Katalysator verläuft. Durch die Verwendung einer Phosphor-Spezies eröffnet diese Reaktionsklasse die Möglichkeit der direkten Addition einer Phosphoreinheit. Daher sollte die Generierung einer chemoselektiven Phosphorylierung über die Staudinger-Reaktion verlaufen. Aus diesem Grund wird diese Reaktionsklasse im Folgenden genauer betrachtet.

1.5.3.3. Die Klasse der Staudinger-Reaktionen

Reaktionen von Phosphor-(III)-verbindungen und Aziden zu Phosphiniminen werden heutzutage unter dem Namen *Staudinger Reaktion* zusammengefasst. Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts gelang Hermann Staudinger und Jules Meyer (Staudinger & Meyer, 1919) erstmalig die Bildung von Triphenylphosphin-phenylimin unter Freisetzung von Stickstoff aus Phenylazid und Triphenylphosphin (Abb. 9A).

Die Reaktion beginnt mit dem nukleophilen Angriff des Phosphins an das terminale Stickstoffatom des Azids und der Bildung eines Phosphazids. Das Phosphazid ist ein Zwitterion und reagiert nun über einen viergliedrigen Übergangszustand unter Abspaltung von elementarem Stickstoff zum Phosphinimin welches im Gleichgewicht zur Stickstoff-Ylidform vorliegt (Widauer et al. 1999; Tian & Wang, 2004).

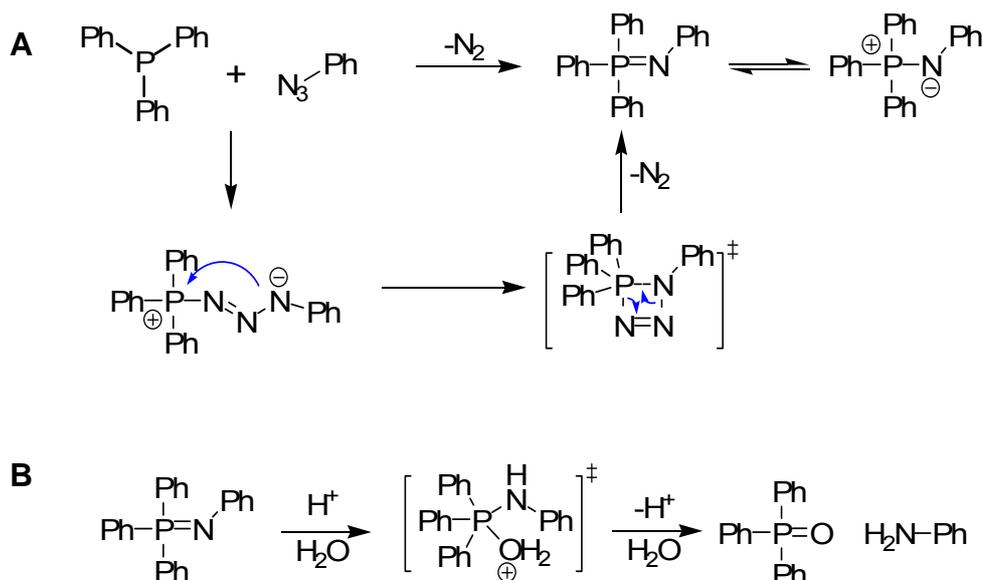


Abb. 9: A) Staudinger Reaktion von Triphenylphosphin und Phenylazid. B) Staudinger Reduktion des Phosphorimins zum primären Amin unter Freisetzung von Phosphinoxid

Phosphinimine ermöglichen die Darstellung einer Vielzahl an unterschiedlichen Phosphor-(V)-verbindungen, in Abhängigkeit der zugegebenen Reagenzien und Reaktionsbedingungen (Gololobov & Kasukhin, 1992). Meyer und Staudinger hatten bereits 1919 die wässrig saure Aufarbeitung von Triphenylphosphinphenylimin beschrieben (Staudinger & Meyer, 1919), in deren Verlauf die P=N Bindung gespalten wird und ein primäres Amin sowie Triphenylphosphinoxid erhalten wird, die sog. Staudinger Reduktion (Abb. 9B). Diese fand in der organischen Synthese zur Einführung primärer Amine Verwendung.

Eine Weiterentwicklung der Staudinger Reaktion zur Anwendung unter physiologischen Bedingungen wurde erst Anfang des einundzwanzigsten Jahrhunderts vorgestellt: die Staudinger Ligation (Saxon & Bertozzi, 2000). Mittels einer am Phenylphosphin angebrachten elektrophilen Falle gelang es, den negativ geladenen Stickstoff des Stickstoff-Ylids als Amid abzufangen (Abb. 10). Die physiologische Anwendbarkeit dieser Reaktion wurde an Jurkat Z-Zellen demonstriert, deren Oberfläche durch Metabolisierung azidhaltiger Sialinsäuren markiert wurde. Die Zellen wurden mit einem biotinhaltigen Phosphin inkubiert, der Umsatz wurde im Anschluss durch FITC-markiertes Avidin sichtbar gemacht. Kontrollen mit unmodifizierten Zellen konnten belegen, dass die Markierung der Zelloberfläche nur in Gegenwart von Azidogruppen stattfand, die Staudinger Ligation ist demnach *in vivo* chemoselektiv und bioorthogonal.

Kurz darauf stellten sowohl Raines *et. al.* (Nilsson *et al.*, 2000) als auch Bertozzi *et. al.* (Saxon *et al.*, 2000) unabhängig voneinander eine Variante der Staudinger Ligation vor, in der die elektrophile Falle über eine Thio-Esterbindung an ein Peptid angebracht wird und

durch den elektrophilen Stickstoff des angreifenden Stickstoff-Ylids wieder verdrängt wird – die spurlose Staudinger Ligation.

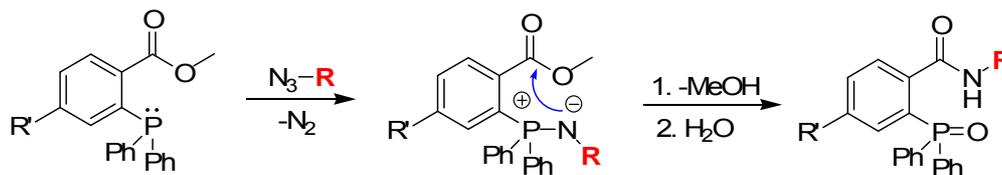


Abb. 10: Mechanismus der Staudinger Ligation.

Die Verwendung von Phosphiten (Serwa et al., 2009) und Phosponiten (Vallée et al., 2010, 2013) als Funktionalisierungsmethode für azidhaltige Peptide, Proteine und Polyglycerole wurde in der Gruppe von C. P. R. Hackenberger eingehend untersucht. Hierbei wird die Tatsache genutzt, dass die Hydrolyse der Stickstoff-Ylide von Phosphiten und Phosponiten nicht zur Spaltung der P-N Bindung führt, sondern stattdessen eine Alkoxy-Gruppe abgespalten wird, wodurch ein Phosphoramidat bzw. Phosponamidat entsteht.

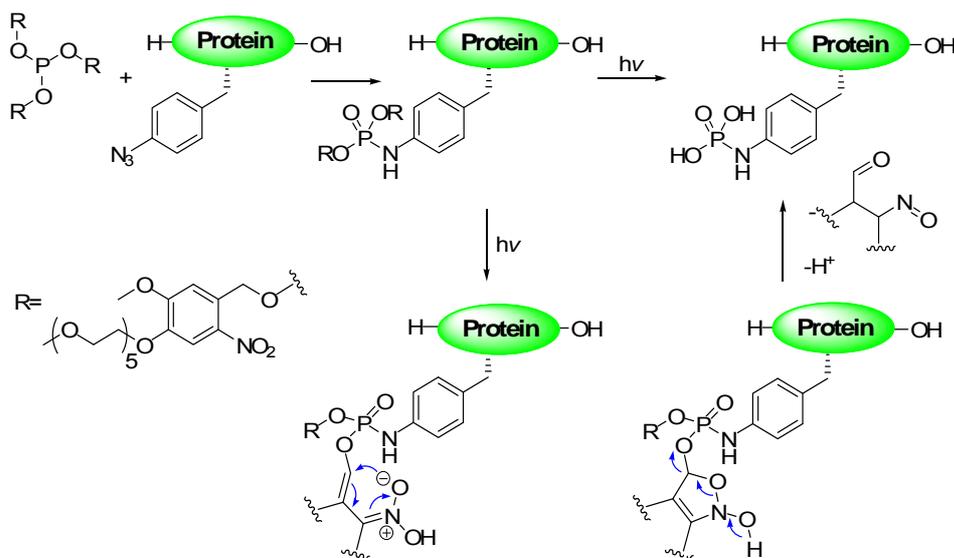


Abb. 11: Synthese eines ungeschützten Phosphoramidats auf Proteinebene mittels Staudinger-Phosphit-Reaktion

Diese P-Amidate sind unter physiologischen Bedingungen stabil und ermöglichen so beispielsweise die Einführung von Polyethylenglykol (Serwa et al., 2010), Kohlenhydraten (Böhrsch et al., 2012), Biotineinheiten (Böhrsch et al., 2010) oder Fluorophoren (Möller et al., 2012). Die Reaktion eines symmetrischen *ortho*-Nitrobenzylphosphits mit einem *para*-Azidophenylalanin-haltigem Peptid oder Protein führt zu einem geschützten Phosphoramidat, welches anschließend durch Lichtinduktion abgespalten werden kann

(Abb. 11). Auf diese Weise lassen sich auf Protein und Peptidniveau ungeschützte Phosphoramidate darstellen, welche aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit vermutlich als Analoga für Phosphotyrosin dienen können (Serwa et al., 2009, 2010). Weiterhin lässt sich über diesen Weg die bisher wenig charakterisierte natürliche posttranslationale Modifikation des Phospholysins darstellen.

1.5.4. Überblick über die zellfreie Proteinsynthese

Der Leser könnte vermuten, dass es sich bei der zellfreien Proteinsynthese um ein neuartiges Konzept handelt. Dem ist allerdings nicht so. Bereits Anfang der Fünfzigerjahre des vergangenen Jahrhunderts wurde die Beobachtung gemacht, dass isolierte Zellfraktionen in der Lage waren, Proteine zu synthetisieren (Borsook 1950; Winnick 1950a; 1950b; Siekevitz & Zamecnik 1951; Peterson and Greenberg 1952). Mithilfe der zellfreien Proteinsynthese gelang es Nirenberg und Matthaei 1961, das erste Codon des genetischen Codes zu bestimmen (UUU kodiert Phe, Nirenberg & Matthaei, 1961). Bereits bei diesem Experiment basierte die Translation auf einer exogenen Nukleinsäure, hier Poly-U-RNA. Marshall Nirenberg wurde hierfür (neben Gobind Khorana und Robert Holley) 1968 der Medizinnobelpreis verliehen.

Zellfreie Proteinsynthese basiert auf drei grundlegenden Komponenten: einem Zelllysate, welches die eigentliche Translationsmaschinerie enthält, darunter die Ribosomen, tRNAs, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, einer Mischung aller proteinogenen Aminosäuren sowie Energie in Form von ATP (zur Aminoacylierung der tRNAs) und GTP (für die Aktivität der Elongationsfaktoren, EF-Tu und EF-Ts in *E. coli* basierten Systemen, EF-1 in eukaryotischen Systemen) sowie der Genmatrize des zu synthetisierenden Proteins in Form von Boten-RNA. Zelllysate für die zellfreie Proteinsynthese können aus prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen gewonnen werden. Prokaryotische Systeme basieren meist auf *E. coli* (Matthaei & Nirenberg, 1961) während sich bei eukaryotischen Systemen die Verwendung vor allem von Weizenkeimen („Wheat germ“, Roberts & Patterson, 1973), Kaninchenretikulozyten („Retic“, Pelham & Jackson, 1976) sowie *Spodoptera frugiperda* („Insect“, Swerdel & Fallon, 1989) etabliert hat.

Im Rahmen der zellfreien Proteinsynthese müssen die Prozesse der Transkription und der Translation voneinander getrennt betrachtet werden. Frühe Synthesysteme hatten das Problem der Verunreinigung durch endogene Proteinsynthese. Erste Lösungen dieses Problems wurden von Zubay (Lederman & Zubay, 1967; DeVries & Zubay, 1967) sowie von Gold und Schweiger (1969, 1971) gefunden. Das Zubay-System setzte auf den Verdau endogener Nukleinsäuren (DNA und mRNA) durch endogene Nukleasen, das Schweiger-Gold-System auf deren Entfernung durch Ionen-Austauschchromatographie sowie dem anschließenden Zusatz separat aufgereinigter Ribosomen. Später wurde die Zugabe

aufgereinigter RNA-Polymerasen von Bakteriophagen (T7 und SP6) (Spirin, 1991; Craig et al., 1992; Baranov & Spirin, 1993) als zweckdienlichste und einfachste Variante erkannt, welche heute der allgemeine Standard ist.

Im Regelfall sind zellfreie Systeme nur begrenzte Zeit aktiv, die Syntheseleistung sinkt nach relativ kurzer Zeit aufgrund inhibierender Effekte von Nucleosidmonophosphaten und steigender Phosphatkonzentration. Dieses Problem wurde durch die Entwicklung des CECF-Systems (continuous exchange cell-free) gelöst, wobei die Synthesereaktion in einer Dialyseapparatur durchgeführt wird (Alakhov et al, 1995). Hierbei werden der Synthese durch Verbindung über eine semipermeable Membran kontinuierlich frische Aminosäuren und Nucleosidtriphosphate zugesteuert, während inhibitorische Moleküle verdünnt werden. So erhielten Davis et al. 1996 in einem *E. coli* basierten CECF-System eine Ausbeute von 120-240 µg/ml Luciferase nach 20 h Synthesedauer, während Madin et al. 2000 mehrere aktive Proteine (Dihydrofolat-Reduktase, GFP, Luciferase) mit einer Ausbeute von 1-4 mg/ml nach 60 h in einem Weizenkeim-CECF publizierten. Mittlerweile erlauben kommerziell verfügbare Systeme, beispielsweise das *E. coli*-basierte CECF-System der RiNA GmbH (Berlin, Deutschland), Proteinausbeuten bis zu 5 mg pro Milliliter Reaktion.

Die zellfreie Proteinsynthese hat viele Vorteile, wodurch sie eine gute Ergänzung zur Proteinexpression in Zellen darstellt. Zum einen sind zellfreie Systeme offen, so dass beliebige gewünschte Komponenten der Reaktion einfach zugesetzt werden können. Ebenso wenig existiert das Problem der Membranpermeabilität bestimmter Substanzen. Nach Synthese des Proteins lässt sich dieses ohne einen Zellaufschluss reinigen. Cytotoxische Proteine können ohne weiteres synthetisiert werden, da kein lebendiger Organismus gestört werden kann.

Zwei wesentliche Entwicklungen der RiNA GmbH, welche im Rahmen dieser Arbeit Verwendung fanden, sollen hier erläutert werden:

Zum einen handelt es sich um die Fähigkeit zellfreier Systeme, lineare DNA-Matrizen transkribieren und translatieren zu können, während diese in Zellen sofort degradiert würden und keine Proteinexpression stattfinden würde. Merk *et al.* entwickelten 2003 eine zwei Stufen umfassende PCR-Methode, die es erlaubt, ein Zielgen nach der Amplifikation mit genspezifischen Primern in einer zweiten PCR-Stufe mit den notwendigen regulatorischen Elementen für die gekoppelte Transkription-Translation zu versehen. Hierzu gehören der Promotor und Terminator der T7 RNA-Polymerase, eine Shine-Dalgarno-Sequenz, das Stopcodon sowie ein optimierter 3'-Endbereich mit helikalen RNA-Bereichen, welcher einen Schutz für die resultierende mRNA vor exonukleolytischem Abbau bietet. Das so generierte „Linear Template“ kann zusätzlich wahlweise N- und C-

terminal mit einem Strep-(II)- oder einem His₆-Reinigungstag versehen werden. Der dafür geprägte Begriff E-PCR (Expressions-PCR) umfasst die Matrizengenerierung sowie die anschließende Expression des Proteins im Batch-System, welche sich innerhalb eines einzigen Tages bewerkstelligen lässt (Merk, et al. 2003).

Eine weitere Entwicklung ist durch die Offenheit der zellfreien Proteinsynthese ermöglicht. Gerrits *et al.* beschrieben 2007 die ortsspezifische Markierung zellfrei synthetisierter Proteine durch chemisch beladene tRNA_{CUA}. Eine unnatürliche, markierte Aminosäure wird dabei über ein *amber*-Stopcodon (TAG) in ein Protein eingeführt. Hierbei lassen sich durch Einführen von Biocytin (biotinyliertes Lysin) und Farbstoffen der BODIPY-Reihe Proteine immobilisieren oder visualisierbar markieren. In diesem Rahmen wurde auch ein *amber*-Stop haltiger N-terminaler Initiator entwickelt, der sich vom Beginn des Elongationsfaktors EF-Tu (*E. coli*) ableitet. TAG wird hierbei an Position zwei des Leserahmens in einem definierten, vom Zielprotein unabhängigen Sequenzkontext eingebaut. Dieses Biotinylierungssystem wird unter dem Namen EasyXpress ssp Biotin Kit von Qiagen kommerziell vertrieben.

Es ist im Vergleich zu herkömmlichen Systemen überlegen, da der Biotineinbau stöchiometrisch erfolgt. Im Gegensatz zur posttranslationalen Umsetzung mit einem Biotinylierungsreagenz ist hier die direkte Immobilisierung auf Streptavidin-Matrices ohne einen vorherigen Aufreinigungsschritt möglich.

1.6. Das Modellprotein ADAP

Nachdem im bisherigen Verlauf die Bedeutung von Tyrosin-Phosphorylierungen sowie Strategien zu deren Untersuchung aufgezeigt wurden, soll nun das im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchende Modellprotein ADAP vorgestellt werden. Bei ADAP (adhesion and degranulation promoting adapter protein) handelt es sich um ein menschliches Adapterprotein (ohne enzymatische Aktivität), welches in allen Blutzellen außer B-Zellen und Erythrozyten vorkommt. Seine Funktion wurde vor allem in T-Zellen untersucht.

1.6.1. Allgemeine Eigenschaften von ADAP

Bei ADAP (Adhesion and Degranulation Promoting Adapter Protein) handelt es sich um ein menschliches Adapterprotein, welches keine enzymatische Aktivität besitzt. Es wurde als SLAP-130 (Musci et al., 1997) und FYB-120 (Fyn-binding protein of 120 kDa) (da Silva et al., 1997) nahezu zeitgleich identifiziert. Obwohl die letztere Arbeit das Protein als Fyn-Bindungspartner beschreibt, wurde hier auch die dominante Interaktion mit SLP-76 beobachtet. ADAP ist ein verhältnismäßig großes Protein von 783 Aminosäureresten. Seine Primärstruktur weist eine eigenständige N-terminale Region auf, während sich im C-terminalen Bereich zwei helikal erweiterte SH3 Domänen, eine mögliche Ena/VASP

Bindungsstelle sowie zwei nukleare Lokalisierungsmotive befinden (Heuer et al., 2004, 2005).

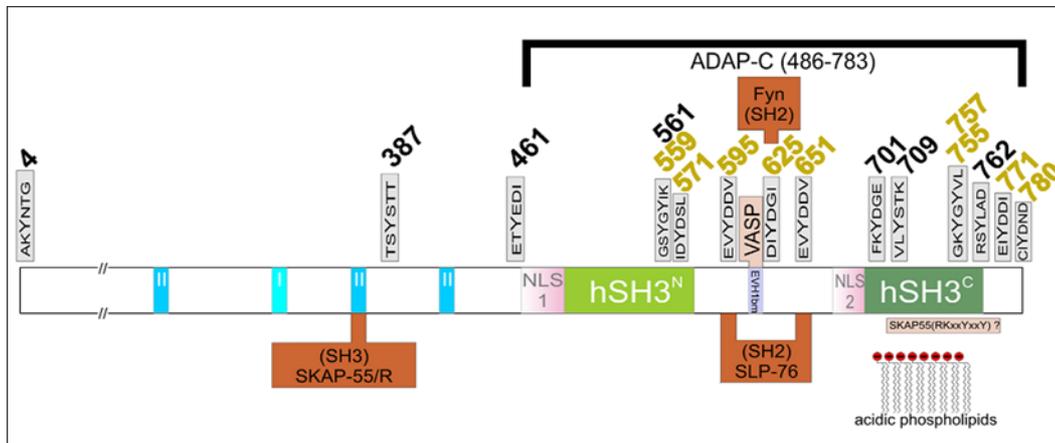


Abb. 12: Primärstruktur von ADAP. Angezeigt sind die beiden SH3-Domänen (grün) mit den vorgelagerten Kernlokalisationssequenzen (NLS1, 2), die Prolin-reichen Sequenzen (blau) sowie die Bindungsstellen für SKAP55, SLP-76 und Fyn. Angezeigt sind ebenfalls die bestätigten phosphorylierten Tyrosinreste *in vivo* (goldene Beschriftung), sowie Tyrosine, deren Phosphorylierungsstatus ungekärt ist (schwarze Beschriftung). Entnommen von Sylvester et al., 2010.

Zudem wird hauptsächlich der C-terminalen Bereich durch die Fyn-Kinase hyperphosphoryliert (da Silva et al., 1997; Huang et al., 2000), wodurch ADAP die Möglichkeit der SH2-Domänen vermittelten Interaktionen mit verschiedenen Partnern ermöglicht (Abb. 12).

1.6.1.1. Der T-Zell Rezeptor

T-Zellen sind ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems. Sie sind in der Lage, schadhafte und infizierte Zellen zu beseitigen. Grundlage hierfür ist ein physischer Kontakt zwischen einer Zielzelle, die ein Antigen präsentiert (APC, antigen presenting cell) und der T-Zelle. Dieses wird auf Seite der APC durch einen großen Rezeptor, den MHC (major histocompatibility complex) vermittelt, dessen Gegenstück der T-Zell Rezeptor (TCR) ist. Der T-Zell Rezeptor ist ein oligomerer Komplex mehrerer Proteine: das Heterodimer CD3 $\alpha\beta$ bildet seinen Kernbereich und interagiert mit dem MHC. Die Heterodimere CD3 $\mu\epsilon$ und CD3 $\delta\epsilon$ stabilisieren den Kernbereich extrazellulär, wobei sie nur kurze cytoplasmatische Bereiche haben. Zum TCR gehört weiterhin das Homodimer CD3 $\zeta\zeta$, welches lange zytoplasmatische Bereiche hat und als Ankerpunkt für zytoplasmatische Proteine dient. Nach Aktivierung und Ko-Stimulierung durch CD4 oder CD8 (abhängig von T-Zelltyp) werden die ζ -Ketten durch die Lck-Kinase an ihren sogenannten ITAM's (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) hyperphosphoryliert. Diese ITAMs weisen Tandem-

Tyrosinmotive der Form YXXI/LX₆₋₈YXXI/L auf, die als Ligand der Tyrosinkinase ZAP-70 dienen, welche damit an den TCR rekrutiert und aktiviert wird. ZAP-70 phosphoryliert daraufhin mehrere Substratproteine wie PLCG1, LAT, Vav1 und SLP-76. Durch die TCR-Stimulierung wird die Proliferation der Zellen stimuliert, ebenso wie die Expression und Sekretion von IL-2, das wiederum umliegende T-Zellen als Signalverstärkung stimuliert sowie die Aktivierung von Integrinen.

1.6.1.2. Integrine verstärken den TCR-vermittelten Zell-Zell Kontakt

Integrine sind immunglobulinartige Ankerproteine, die einen spezifischen Liganden auf der Zelloberfläche anderer Zellen erkennen und binden können. Hierbei handelt es sich um heterodimere Transmembranproteine der Form $\alpha\beta$, mit einem großen, extrazellulären, immunoglobulinartigen Bereich und kurzem cytoplasmatischen Abschnitt. Bisher wurden in Wirbeltieren 24 α - und acht β - Untereinheiten charakterisiert, welche nur 24 unterschiedliche Integrine bilden (Zhang & Wang, 2012), wobei in Leukozyten bisher die Expression von zwölf Integrinen bekannt ist (Hogg et al., 2003; Springer 1994).

Ihre kurzen cytoplasmatischen Bereiche dienen als Ankerpunkte für Signalproteine und Proteine des Cytoskeletts (Luo et al., 2007). Sie sind notwendig, um den physisch auf die T-Zelle wirkenden Scherkräfte des Blutstroms entgegenzuwirken und das TCR Signal zu stabilisieren. Daher werden nach der TCR-Stimulierung Integrine zum TCR rekrutiert, um den Zell-Zell-Kontakt zu festigen. Die Aktivierung der Integrine kann auf zwei Wegen erfolgen: durch das sogenannte „inside-out“ sowie das „outside-in“ Signalling.

Beim Inside-out signalling wird die Integrinaktivierung durch die Aktivierung eines Rezeptors, meist des TCR, aber auch durch chemokine Rezeptoren an die Integrine weitergeleitet, wobei die Adhäsion der Zelle als Antwort auf die Rezeptoraktivierung verstärkt wird. Beim Outside-in signalling wird ein Integrin durch Erkennung eines Liganden aktiviert, die dadurch verursachte Konformationsänderung lässt Interaktionen an den cytoplasmatischen Ende der Inteine zu, die sich wiederum als Signal weiter auf die Zelle übertragen lassen. ADAP ist an beiden Prozessen beteiligt.

1.6.2. Bekannte Interaktionen von ADAP

Insgesamt wurden Interaktionen von ADAP mit den Proteinen SLP-76, Fyn, SKAP-55, Carma1 und VASP beschrieben, wobei die ersten beiden durch Tyrosin-Phosphorylierung induzierbar, und die letzten drei von transientser Natur (also unabhängig von posttranslationalen Modifikationen) sind (Abb. 13).

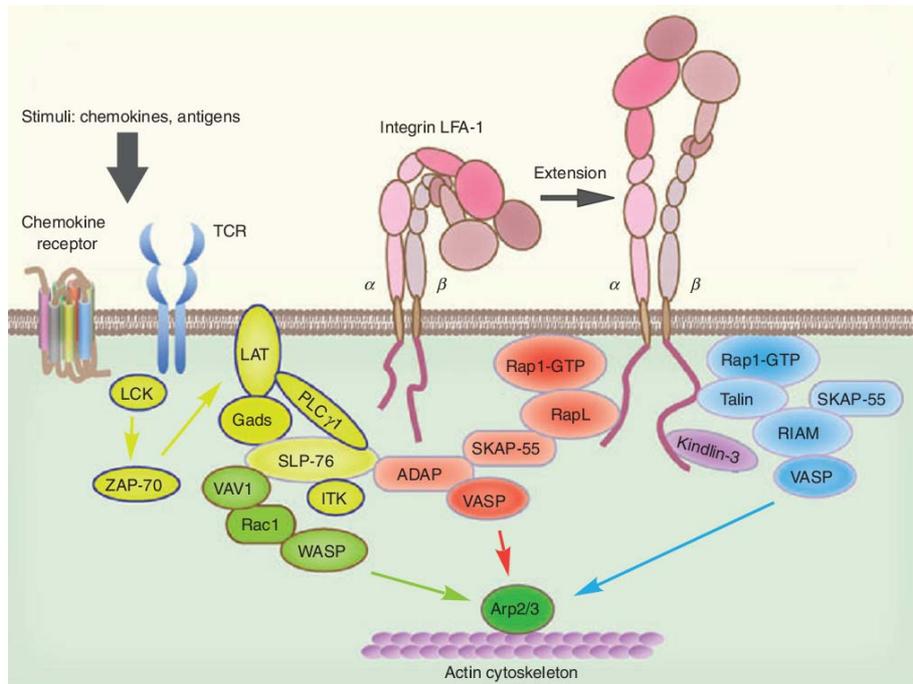


Abb. 13: Übersicht der Integrin-vermittelten Signalwege in T-Zellen. Aus Zhang & Wang, 2012.

Phosphorylierungsabhängige Interaktionen geht ADAP zum Beispiel mit SKAP-55 ein, welches ebenfalls ein Adapterprotein ist. Hierbei interagiert der Prolin-reiche Abschnitt von ADAP um P360 (vgl. Abb. 12, S. 33) mit der SH3-Domäne von SKAP-55 (Kliche et al., 2006). Darüber hinaus kann ein prolinunabhängiges Motiv in SKAP-55 an die C-terminale SH3-Domäne von ADAP binden, wobei diese verstärkende Wirkung der ADAP-P360-SKAP-SH3 Interaktion hat.

Ebenfalls wird angenommen, dass die Interaktion von ADAP mit SKAP-55 zwei unterschiedliche Fraktionen von ADAP erzeugt (Burbach et al., 2011), die unterschiedliche Funktionen aufweisen. Mit SKAP-55 assoziiertes ADAP interagiert (phosphorylierungsabhängig) mit SLP-76 und wird so dem Inside-out sowie dem Outside-In Signalling zur Verfügung gestellt, wobei der Komplex zwischen ADAP und SLP-76 direkt am Outside-In Signalling beteiligt ist (Baker et al., 2009). Freies ADAP interagiert dagegen mit Carma1 (Medeiros et al., 2007) und greift in die Aktivierung von NF-κ-B ein.

Die Interaktion von ADAP mit SLP-76 wurde bereits bei dessen Charakterisierung beobachtet (Musci et al., 1997). Sie wird durch die phosphorylierten Tyrosine pTyr595 und pTyr651 an die SH2-Domäne von SLP-76 erzeugt. Dieser Komplex wird durch SLP-76

weiterhin mit Vav1 verknüpft, wodurch Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett genommen wird. Ebenfalls kann SLP-76 mit Grap2 (Gads) interagieren. Der Komplex wird dann an LAT und somit in die Nähe des aktivierten TCR dirigiert. Unabhängig von Grap2 und LAT leitet der SLP-76/ADAP Komplex als Antwort auf die Aktivierung des TCR das Inside-out Signalling ein.

Durch Aufhebung der Interaktion zwischen SLP-76 und ADAP (Y_{2595,651F}₂) kann das Integrin LFA-1 keine durch Inside-Out Signalling ausgelösten Cluster mehr ausbilden (Geng et al., 1999; Raab et al., 1999; Veale et al., 2000) und LFA-1 kann des Weiteren nicht mehr zur Verstärkung der immunologischen Synapse herangezogen werden. Ebenso wird die Expression von Interleukin IL-2 inhibiert (Wang et al., 2004).

1.6.3. Modellsysteme

Um die Analyse Phosphotyrosin-vermittelter Protein-Protein-Wechselwirkungen weiter zu entwickeln, stellen sowohl ADAP als auch das Phosphorylierungsmotiv YEEI des MT-Antigens gut geeignete Modellsysteme dar.

Das Phosphorylierungsmotiv des MT-Antigen ist bezüglich seiner phosphorylierungsabhängigen Interaktion zu den SH2-Domänen der Src-Familie (Src, Lck, Fyn) sehr gut charakterisiert worden. Die Struktur seiner Interaktion mit Src-SH2 wurde gelöst (Waksman et al., 1993). Ebenso liegen Informationen zur physiologischen Relevanz der Bindung von Fyn *in vivo* vor (Dunant et al., 1997). Ausschlaggebend für die Wahl dieses Motives als eines der beiden Modellsysteme war zudem, dass detaillierte Ergebnisse zur Affinität von phosphoryliertem YEEI zu den SH2-Domänen von Src, Lck und Fyn vorliegen (Ladbury et al., 1995; Payne et al., 1994). Hierdurch eignet sich diese Sequenz zur Validierung von Messmethoden und ermittelten K_d-Werten sehr gut.

Entscheidende Gründe für die Wahl von ADAP als Modellprotein liegen in dessen gut charakterisierten phosphorylierungsabhängigen Wechselwirkungen mit den SH2-Domänen von SLP-76, Fyn und Nck. Des Weiteren ist die Phosphorylierung von überexprimiertem ADAP *in vitro* eine etablierte Methode (Sylvester et al., 2010). Der Zugang zu phosphoryliertem Protein als Bindungspartner und Kontrolle ist somit gewährleistet.

Neben den oben genannten Interaktionspartnern wurden in einem proteombasierten Ansatz weitere potenzielle Bindungspartner von ADAP identifiziert (Lange et al., 2010). Diese Studie stellt einen idealen Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit dar: In dieser gemeinsamen Studie der Arbeitsgruppen von Christian Freund (Freie Universität Berlin) und Eberhard Krause (FMP Berlin) wurde durch Pulldown an immobilisierten Festphasenpeptiden, die die ADAP-Phosphorylierungsstellen pTyr595, pTyr625 und pTyr771 enthielten, in SILAC-markierten Jurkat T-Zell Lysaten ein gutes Dutzend weiterer möglicher Interaktionspartner gefunden, die größtenteils dem TCR-Umfeld angehören.

2. Zielsetzung der Arbeit

Das Globalziel der Arbeit war es, Methoden und Werkzeuge zur Optimierung der Untersuchung Phosphotyrosin-abhängiger Protein-Protein Wechselwirkungen zu entwickeln. Ein wesentlicher Punkt bestand hierbei in der Beantwortung der Frage, ob funktionelle Interaktionspartner durch zellfreie Proteinsynthese darstellbar sind. Hierzu zählten sowohl die phosphorylierten Ligandproteine als auch die modular aufgebauten Bindungspartner in Form von SH2-Domänenproteinen.

Bisher wurden für die Untersuchung SH2-vermittelter Interaktionen von Phosphoproteinen kurze Peptidsequenzen als ausreichende Liganden betrachtet. Es gelang bisher noch nicht, K_d -Werte für Interaktionen mit phosphorylierten Vollängen-Proteinen zu bestimmen. Darüber hinaus sind für die meisten Phosphoproteine gar keine K_d -Werte verfügbar. Ein wichtige Aufgabe innerhalb der vorliegenden Arbeit war deshalb die Bestimmung von K_d -Werten Tyrosin-phosphorylierungsabhängiger Protein-Protein Wechselwirkungen auf Proteinniveau. Hierfür sollte anhand des Modellsystems ADAP ein Arbeitsfluss entwickelt werden, wobei es besonders darauf ankam, geeignete Methoden für die Proteinsynthese der beiden Interaktionspartner ausgehend von DNA-Sequenzen, für die qualitative Funktionsanalytik und für die abschließende quantitative Bestimmung von Dissoziationskonstanten auszuwählen und in einem fein aufeinander abgestimmten Arbeitsschema zu optimieren und zu kombinieren. Als Nebeneffekt sollten hierdurch auch potenzielle Interaktionen von ADAP, die in einer vorangegangenen *in vivo*-Studie (Lange et al., 2010) erstmalig gefunden wurden, auf biochemischer Ebene weiter charakterisiert werden.

Die Fähigkeit zur Generierung einer ortsspezifischen, selektiven Tyrosin-Phosphorylierung kann ein wertvolles Werkzeug für die Erforschung dieses Gebietes darstellen, da hiermit bestimmte Phosphorylierungsstellen innerhalb eines Proteins selektiv adressiert und so stöchiometrisch einheitlich phosphorylierte Proteine hergestellt werden könnten. Anhand des neu aufgebauten Modellsystems sollte deshalb in einem weiteren Arbeitspaket die Eignung eines durch eine Staudinger-Phosphit-Reaktion generierbaren arylischen Phosphoramidats, welches in der Arbeitsgruppe entwickelt wurde (Serwa et al., 2009), als Phosphotyrosinanalogue unter physiologisch realistischen Bedingungen untersucht werden, wodurch eine vielversprechende Alternative zur ortsspezifischen, stöchiometrisch einheitlichen und quantitativen Phosphorylierung von Proteinen umgesetzt werden sollte.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst anhand des menschlichen T-Zell Proteins ADAP ein Arbeitsfluss entwickelt werden, der die Charakterisierung direkter Interaktionen Tyrosin-phosphorylierter Proteine mit SH2-Domänenproteinen unter Zuhilfenahme der zellfreien Proteinsynthese schnell und zuverlässig ermöglicht. Dieser Arbeitsfluss beginnt mit der unabhängigen zellfreien Darstellung beider Interaktionspartner in einer für die Analyse benötigten funktionalisierten Form (Abb. 14).

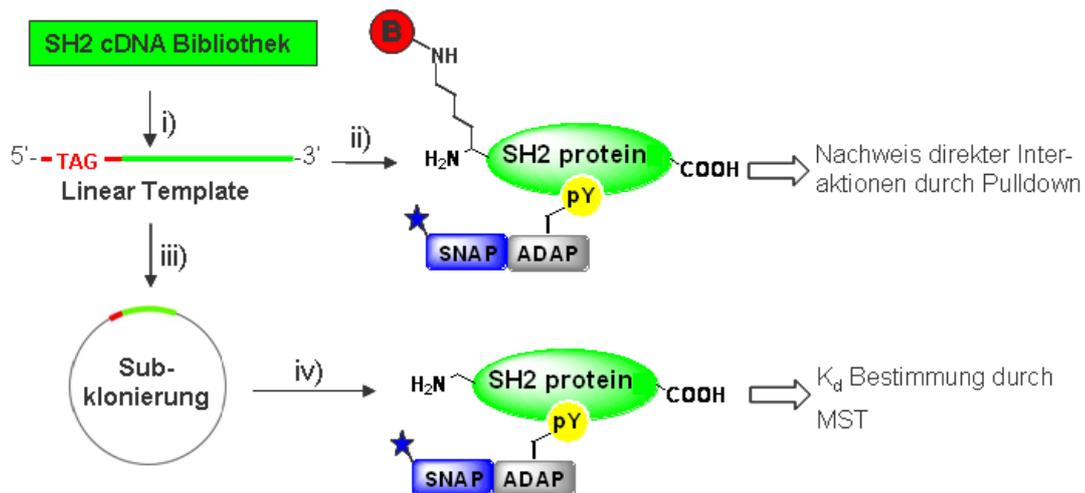


Abb. 14: Geplanter Arbeitsfluss zur Optimierung der Funktionsanalyse Tyrosin-phosphorylierter Proteine am Beispiel von ADAP. i) Generierung ortsspezifisch markierbarer Linearer Templates von SH2-Domänenproteinen. ii) Synthese ortsspezifisch biotinylierter SH2-Domänenproteine durch das EasyXpress ssp Biotin Kit. Anschließende Immobilisierung auf Streptavidin-beladenen Kügelchen und Pulldowns mit fluoreszenzmarkiertem ADAP. iii) Klonierung ausgewählter Linear Templates zur iv) Synthese von unmarkierten SH2-Domänenproteinen im größeren Maßstab. Abschließend K_d Bestimmung in Lösung durch Microscale Thermophorese (MST).

Durch die Möglichkeit, Proteine ausgehend von PCR-generierten linearen Matrizen (Linear Templates) zellfrei synthetisieren zu können, wird eine größere Anzahl verschiedener SH2-Domänenproteine zugänglich. Als Quelle für die PCR dient eine Vektor-basierte cDNA-Bibliothek. Die linearen Matrizen werden im 5'-Initiatorbereich mit einem *amber*-Stopcodon ausgestattet, welches den ortsspezifischen Einbau unnatürlicher Aminosäuren ermöglicht. Zum ersten Analyseschritt wird hierbei durch das EasyXpress site specific Biotin Kit eine Biotineinheit in Form von Biocytin in die Proteine eingeführt. Dadurch können die SH2-Domänenproteine direkt an Streptavidin-beschichteten Affinitätsmatrices immobilisiert werden, es folgen Pulldown-Experimente für jedes SH2-Protein mit in Lösung befindlichem ADAP. Hierbei wird neben phosphoryliertem ADAP auch nicht-phosphoryliertes ADAP als Negativkontrolle verwendet. Die so gewonnenen Daten beantworten die Frage, ob eine

direkte Interaktion mit dem jeweiligen SH2-Protein stattfindet oder nicht. Darüber hinaus dient der Pull-down als Qualitätskontrolle für die synthetisierten Proteine. Der Pulldown-Ansatz kann durch die Methode der Überstandsabreicherung (Pollard 2010) erweitert werden. Auf diese Weise können K_d -Werte abgeschätzt und die Aussagekraft des Pulldowns in einen größeren Kontext gesetzt werden, indem beispielsweise eine erste Bindungshierarchie aufgestellt wird.

Um die Bestimmung von K_d -Werten in Lösung durch Microscale Thermophorese zu ermöglichen, müssen die SH2-Proteine im größeren Maßstab synthetisiert werden. Hierfür werden die Linear Templates durch Klonierung in den Vektor pIX3.0 in eine passende Form zur Durchführung von CECF-Synthesereaktionen gebracht. Das *amber*-Stopcodon wird dabei durch eine modifizierte *E. coli* tRNA^{Ser}_{CUA} unter Einbau von Serin unterdrückt.

Die zu untersuchenden Phosphoproteine, in dieser Arbeit ADAP und eine Positivkontrolle für die K_d -Wertbestimmung (das YEEI-Motiv aus dem Middle T Antigen), werden in der Form eines Fusionsproteins mit dem Snap-Tag synthetisiert. Dies erlaubt vor allem eine ortsspezifische Fluoreszenzmarkierung über den Snap-Tag, ermöglicht aber auch eine Handhabung kürzerer Phosphopeptidmotive in Form von richtigen Proteinen, wie im Falle des YEEI-Motivs. Die in dieser Arbeit untersuchten Phosphoproteine werden durch *in vitro*-Phosphorylierung mit aufgereinigter Fyn-Kinase modifiziert, was sowohl ko-als auch posttranslational möglich war.

Bevor der Arbeitsfluss zusammengeführt werden konnte, musste zunächst die Darstellung der einzelnen Komponenten in funktionaler Form untersucht werden. Hierzu wurde als Erstes ADAP sowie dessen Phosphorylierung *in vitro* untersucht.

3.1. Werkzeuge zur verbesserten Analyse von Phosphoprotein-Interaktionen

3.1.1. Expression von ADAP-Varianten

ADAP ist ein Gerüstprotein mit einer Kettenlänge von 783 Aminosäuren, welches keine enzymatische Aktivität besitzt und dessen Zweck in der Ausbildung von Proteinkomplexen besteht. In vorherigen Studien konnte nachgewiesen werden, dass ADAP vorwiegend im C-terminalen Bereich ab Position 486 mehrfache Tyrosin-Phosphorylierungen erfährt (Abb. 15A). Im besonderen Maße konnte den phosphorylierten Tyrosinresten 595 und 651 die Bindung an die SH2-Domäne von SLP-76 zugeordnet werden, während Tyr625 zur Bindung an die SH2-Domäne von Fyn-Kinase beiträgt. In Abbildung 15A ist ersichtlich, dass sich diese drei Hauptphosphorylierungsstellen zwischen den beiden SH3-Domänen in einer unstrukturierten Linkerregion befinden. Somit sollte dieser Bereich den größten Anteil an der Bindung von SH2-Domänen beitragen. Folglich wurden sechs unterschiedliche Varianten des C-terminalen Bereichs von ADAP durch Expressions-PCR, basierend auf

Linearen Matrizen (Linear Templates) dargestellt. Die Linear Templates wurden hierbei im Hinblick auf die Proteinreinigung mit Sequenzen für einen N-terminalen Strep-Tag und einen C-terminalen His-Tag ausgestattet. Die erfolgreiche Expression aller sechs Linear Templates ist in Abb. 15B dargestellt. Wie erwartet, war die Expression der linearen Matrizen etwas schwächer als die eines plasmidbasierten Kontrollproteins (EF-Ts). Die Synthese lieferte aber mit 90-140 µg/ml ausreichend Material für nachfolgende Untersuchungen. Interessant ist die Tatsache, dass alle sechs ADAP-Varianten im SDS-Gel das Laufverhalten eines etwa 20 kDa größeren Proteins aufweisen.

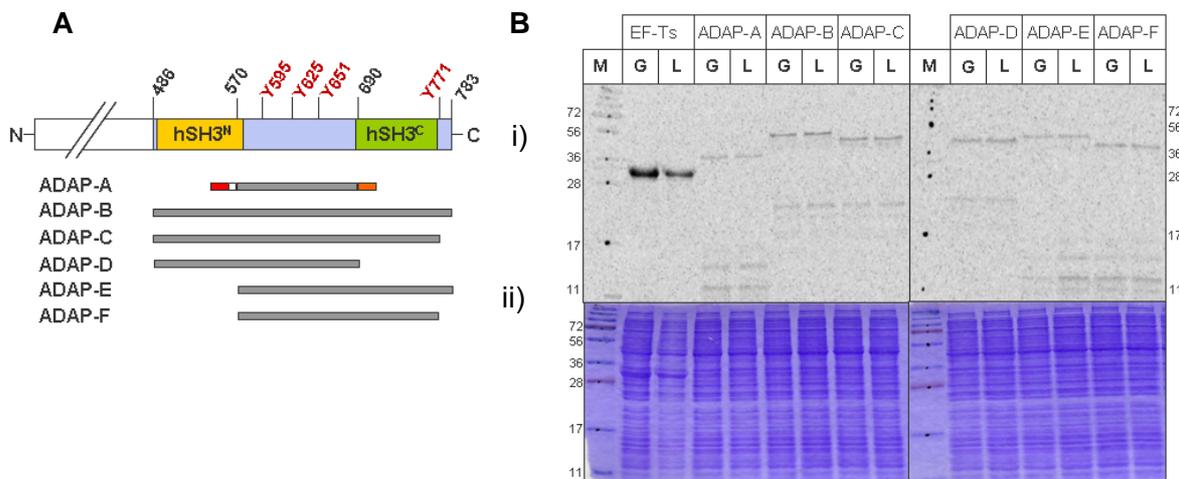


Abb 15: A) Sequenzabdeckung der generierten Linear Templates für ADAP. Stellvertretend sind für ADAP-A die Sequenzen des N-terminale S-(II)-Tags sowie des C-terminalen His-Tags skizziert B) Zellfreie Synthese der generierten Templates unter Einbau von ¹⁴C-Leu als Marker. i) Autoradiogramm, ii) Coomassie-Färbung der Gele. Bahnen: G: Auftrag des Gesamtansatzes, L: Auftrag des löslichen Anteils nach Zentrifugation.

Dieser Befund deckt sich mit Erfahrungswerten aus der Arbeitsgruppe von Prof. Freund (Freie Universität Berlin). Vermutlich lässt sich das veränderte Laufverhalten auf die Prolin-reiche Ena/VASP Bindungsstelle (P⁶¹⁶⁻⁶²⁰) zurückführen, möglicherweise in Kombination mit der stark negativen Ladung dieses Bereiches (ADAP⁵⁷⁰⁻⁶⁹⁰ pI 4,1). Es ist bekannt, dass Prolin-reiche Sequenzen in der SDS-PAGE ein scheinbar höheres Molekulargewicht aufweisen (Ziemer et al., 1982).

Ebenfalls interessant ist die Tatsache, dass bei allen ADAP-Varianten niedriger laufende Banden auftreten. Da diese wie die Vollängenproteine ¹⁴C-Leu enthalten, müssen sie aus der frischen Synthese stammen. Hierfür kommen zwei Erklärungen in Betracht. Zum einen kann es sich um Abbruchprodukte der Translation handeln. Zum anderen können die Proteine an Sollbruchstellen zum Teil fragmentiert sein. Ein Beispiel einer labilen Peptidbindung in Proteinen ist Pro-Asp. Um den Befund zu überprüfen, wurden vier Varianten von ADAP jeweils über beide Tags gereinigt. (Abb. 16). Bei der Aufreinigung

über den N-terminalen Strep-Tag zeigt sich, dass neben dem Hauptprodukt auch Proteinfragmente kleinerer Größe eluiert werden. Die Eluate der über den C-terminalen His-Tag immobilisierten Proteine zeigen hingegen nur das gewünschte Vollängenprodukt. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Herkunft der kürzeren Fragmente auf einem vorzeitigen Translationsabbruch beruht. Eine posttranslationale Spaltung der Proteine ist auf Grund der fehlenden Restfragmente sehr unwahrscheinlich.

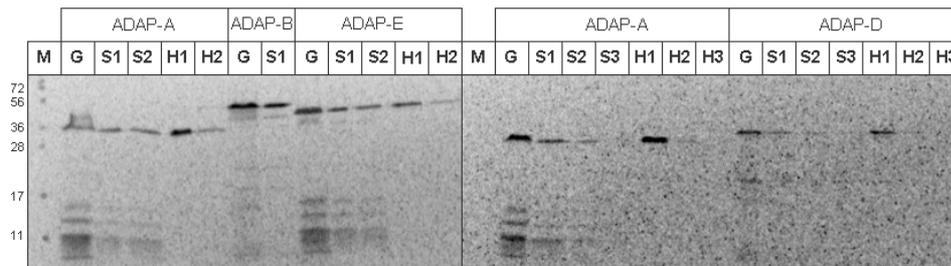


Abb. 16: Autoradiogramme der Aufreinigungsfractionen der ADAP-Varianten A, B, D und E. Bahnen: G: Unaufgereinigter Gesamtansatz nach der Synthese. S: Eluat der Aufreinigung über den N-terminalen Strep-Tag (StrepTactin-Matrix). H: Eluat der Aufreinigung über den C-terminalen His-Tag (Ni-NTA-Matrix). Die Zahl gibt die Reihenfolge der Eluate an, H2 entspricht dem 2. Eluat der Aufreinigung.

Besonders deutlich wird dies anhand von ADAP-A und -E. In beiden Varianten zeigen sich kürzere Fragmente mit gleichem Molekulargewicht. Da beide Matrizen mit Position 570 beginnen, lässt sich folgern, dass der Translationsabbruch an den gleichen Positionen erfolgt. Die Varianten B und E enthalten jeweils den gesamten C-Terminus von ADAP. In beiden Fällen lässt sich zusätzlich eine leicht kürzere Nebenbande verglichen mit dem Hauptprodukt beobachten, was auf eine Abbruchstelle kurz vor Ende des Leserahmens hindeutet. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die erzeugten Proteine stabil und löslich sind. Beide Termini sind aufgrund der erfolgreichen Immobilisierung zugänglich. Im Hinblick auf die Reinigung von Vollängenprotein eignet sich der C-terminale His-Tag offensichtlich besser.

Die Linear Templates der Varianten A, B und E wurden in das Expressionsplasmid pIX3.0 kloniert, um langfristig stabile Templates verfügbar zu haben. Plasmide und Linear Templates zeigten vergleichbare Ausbeuten (Tabelle 2).

Tabelle 2: Syntheseausbeuten der ADAP-Varianten A-F und des Kontrollproteins EF-Ts

Ausbeute	ADAP-A	ADAP-B	ADAP-C	ADAP-D	ADAP-E	ADAP-F	EF-Ts
Gesamt	8,5 μ M (140,3 μ g/ml)	2,5 (91,1)	2,9 (102,4)	4,4 (115,4)	4,8 (132,7)	5,1 (133,8)	17,7 (559,1)
Löslich	8,6 μ M (142,3 μ g/ml)	2,6 (95,2)	2,7 (96,8)	4,1 (106,9)	4,9 (134,6)	4,9 (126,1)	17,6 (522,3)

3.1.1.1. *In vitro* Phosphorylierung und Qualitätskontrolle von ADAP

Nachdem die Expression und die Handhabbarkeit verschiedener ADAP-Sequenzen untersucht wurde, sollten diese durch Fyn-Kinase phosphoryliert werden. Hierfür wurde eine in *Spodoptera frugiperda* Zellkultur exprimierte und aufgereinigte Enzymfraktion verwendet. Weil sich für die Phosphorylierung notwendige Komponenten (hierunter vor allem ATP und Mg^{2+}) auch in den *in vitro* Translationsystemen befinden, wurde Fyn direkt zu Translationsansätzen von ADAP zugegeben. Analysen zeigen, dass eine selektive *in vitro* Phosphorylierung von ADAP stattfand, während die Hintergrundproteine des *E. coli* Lysates nicht phosphoryliert wurden. Dies unterstreicht den Vorteil der Proteinexpression in einem heterologen System. Die Phosphorylierung von ADAP konnte sowohl per Western-Blot als auch durch Bindung an immobilisierte Fyn-SH2 nachgewiesen werden (Abb. 17).

Mit dem unter Anwesenheit von Fyn-Kinase exprimierten ADAP wurde ein Pulldown mit GST-gekoppelter Fyn-SH2-Domäne (immobilisiert auf GST-Magnetkugeln) durchgeführt. Als Negativkontrolle diente ein Translationsansatz von ADAP ohne Kinase. Hierbei konnte für die Variante ADAP-A die phosphorylierungsabhängige Bindung an Fyn-SH2 belegt werden (Abb. 17A). Die Bindung von phosphoryliertem ADAP and Fyn-SH2 lässt sich sowohl in der Coomassie-Färbung, als auch in der Autoradiographie beobachten. Wie erwartet kann nicht-phosphoryliertes ADAP-A keine Interaktion mit der SH2-Domäne eingehen. Die Analyse der Pulldownproben über per Western Blot mit einem Anti-pTyr Antikörper konnte zeigen, dass in dem Proteingemisch des zellfreien Proteinsynthese-Ansatzes durch die zugegebene Kinase das Zielprotein ADAP-A selektiv phosphoryliert wurde. Die Beladung der Membran wurde durch einen Anti-Strep-Tag Antikörper kontrolliert, der ADAP-A unabhängig vom Phosphorylierungszustand erkennt. Hierbei zeigt sich, dass sowohl mit Fyn als auch ohne Fyn exprimiertes ADAP auf die Membran übertragen wurde (Abb. 17A).

Obwohl die im Ansatz zugesetzte Fyn-Kinase das Vollängenprotein samt SH2-Domäne ist, ist diese im Unterschuss zu ADAP-A und darüber hinaus im deutlichen Unterschuss zur immobilisierten GST-Fyn-SH2 zugegen, wodurch eine Bindungskonkurrenz beider Proteine um ADAP-A ausgeschlossen werden kann. Interessant ist ferner, dass die per Strep-Tag Antikörper detektierte Phospho-ADAP-A Bande im Eluat deutlich schwächer ist als die Bande im Durchlauf, wobei der Phosphotyrosin-Western Blot sowie das Signal der ^{14}C -Autoradiographie für beide Fraktionen gleiche Signalintensitäten liefert. Neben der Erklärung, dass die Entfernung der Phosphotyrosin-Antikörper vor der Inkubation mit dem Anti-Strep-Antikörper ungleichmäßig verlief, könnte der Befund auch auf einen heterogenen Phosphorylierungsgrad hindeuten. Allerdings sind Signalintensitäten im Western-Blot nur in einem engen Bereich linear anhängig von der Konzentration, was sich auch an der

Sättigung des Strep-vermittelten Signals zwischen Translationsansatz und Durchlauf des nicht phosphorylierten Ansatzes nachvollzogen werden kann.

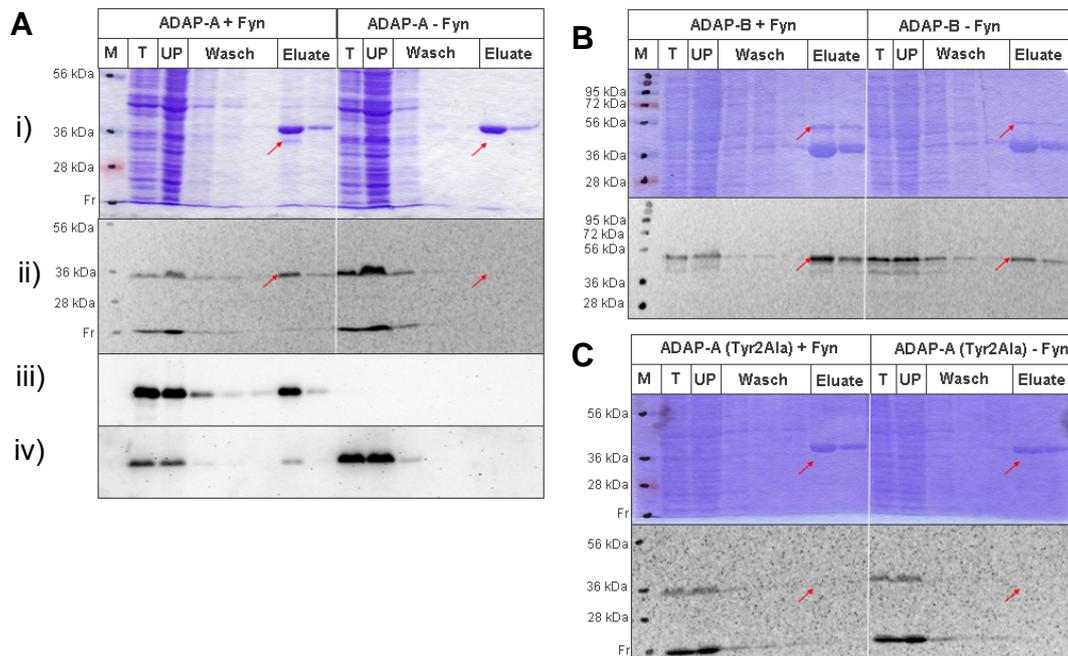


Abb. 17: Ko-translationale Phosphorylierung von ADAP durch Fyn und anschließender Pull-down mit GST-Fyn-SH2. A) Pull-down am Beispiel von ADAP-A. B) Pull-down von ADAP-B. C) Pull-down von ADAP-A^{Tyr595,651Ala}. Jeweils i) Coomassie-Färbung des Gels, ii) Autoradiogramm zur Detektion von ADAP, iii) Western-Blot gegen einen anti-Tyr-Antikörper zur Detektion der Tyr-Phosphorylierung, iv) Western-Blot gegen einen anti-S-II (Strep-Tag) Antikörper zur Detektion von ADAP auf der Membran. Rote Pfeile markieren die Position von ADAP. M: Längenstandard, T: Translationsansatz, UP: Ungebundenes Protein, Wasch: Waschfraktionen, Eluate: Elutionsfraktionen in SDS-Probenpuffer. Fr im Marker: Lauffront des Gels.

Da im kinasefreien Ansatz keine Phosphorylierung beobachtet werden konnte, lässt sich erwartungsgemäß eine mögliche endogene Phosphorylierung von ADAP-A durch etwaig im Lysat vorhandene endogene Kinasen ausschließen. Die deutlich zu beobachtende Interaktion ist allein auf die Phosphorylierung durch Fyn zurückzuführen.

Nachdem die Interaktion für ADAP-A gezeigt war, wurde der Versuch mit der längeren Variante ADAP-B durchgeführt (Abb. 17B). Hierbei konnte beobachtet werden, dass phosphoryliertes ADAP-B in deutlich stärkerem Maße an Fyn-SH2 bindet, als dies der Fall für ADAP-A ist. Allerdings konnte ebenfalls eine leichte Bindung von nicht-phosphorylierten ADAP-B beobachtet werden. Diese ist deutlich schwächer als die des phosphorylierten Ansatzes, allerdings scheint die längere Sequenz eine weniger ausgeprägte Spezifität als der Linkerbereich (ADAP-A) gegenüber Fyn-SH2 zu besitzen. Da eine endogene Phosphorylierung durch die detaillierte Untersuchung von ADAP-A ausgeschlossen werden konnte, wurde im Hinblick auf die Untersuchung der Staudinger-Phosphatase vermittelten

Interaktionsfähigkeit beschlossen, im weiteren ADAP-A als Referenzsequenz zu verwenden. Im Folgenden wird daher für ADAP-A das Synonym ADAP verwendet.

Nachdem ein Detektionsassay für die Phosphotyrosin-vermittelte Bindung an SH2-Domänen mit ADAP als Modellprotein etabliert werden konnte, sollten im ADAP-Leserahmen ausgewählte Tyrosincodons gegen das *amber*-Stopcodon (TAG) durch zielgerichtete Mutagenese ausgetauscht werden. Der Zweck war es, den Einbau von p-Azidophenylalanin und damit die Staudinger-Phosphit vermittelte Bildung von Phosphoramidaten zu ermöglichen. Wie oben erwähnt, tragen die Tyrosinreste 595, 625 und 651 entscheidend zur SH2-abhängigen Bindung von Partnerproteinen in T-Zellen bei. Dabei besitzen die Tyrosinreste 595 und 651 das gleiche C-terminale Erkennungsmotiv (YDDV) für SLP-76 und Nck1/2, während Tyrosin 625 mit YDGI für die Bindung an Fyn verantwortlich ist.

Um einen definierten Ablauf der Staudinger-Phosphit-Reaktion zu ermöglichen, wurde der Entschluss gefasst, zwei der drei Codons zu mutieren. Hierfür fiel - angesichts der gleichen Erkennungssequenzen - die Wahl auf die Tyrosincodons 595 und 651. Nachdem der Erfolg der zielgerichteten Mutagenese per DNA-Sequenzierung nachgewiesen werden konnte, wurde das Protein ADAP^{Tyr2Amb} analog zu ADAP-A und -B in Anwesenheit von Fyn exprimiert und dem Funktionstest unterzogen. Die Suppression der TAG-Codons wurde hier durch eine spezielle Alanyl-tRNA erzielt, welche das *amber*-Anticodon CUA trägt und durch die endogene Alanyl-tRNA-Synthetase beladen wird. Somit wurde im Protein an den Positionen 595 und 651 anstelle der im Wildtyp vorhandenen Tyrosine Alanin eingebaut. Das Ergebnis belegt, dass ADAP^{Tyr2Ala} nicht an Fyn-SH2 bindet. Ein paralleler Kontrollversuch mit der nicht-mutierten Gensequenz zeigte die phosphorylierungsabhängige Bindung von ADAP an Fyn-SH2 in gewohntem Maße (Abb. 17C). Diese Beobachtung ist insofern interessant, da in dem mutierten Protein Tyr625 nach wie vor vorhanden ist, und dieser Position die Vermittlung der Bindung zu Fyn-SH2 zugeschrieben wird. Da der Kontrollversuch die Aktivität der Kinase belegt, lässt sich daraus folgern, dass die Tyrosine 595 und 651 einen größeren Beitrag zur Bindung von Fyn zeigen als bisher gedacht. Die entscheidende Aussage dieses Experiments ist jedoch, dass das durch zielgerichtete Mutagenese generierte ADAP^{Tyr2Amb} als Modellprotein für die Staudinger-Phosphit-Reaktion geeignet ist.

3.1.1.2. Fluoreszenzmarkierung von ADAP über Snap-Fusion und Qualitätskontrolle

Um die Sensitivität des Bindungsassays zu erhöhen, sollten die generierten ADAP-Konstrukte fluoreszenzmarkiert werden. Ein attraktives Werkzeug hierfür ist der sogenannte Snap-Tag. Dieser 189 Aminosäuren (AS) lange Tag ist von der menschlichen O6-Methyl

Guanyltransferase abgeleitet und kann mit geeigneten Substraten am aktiven Zentrum des Enzyms (Cys 145) kovalent modifiziert werden. Als Substrate sind unter anderem mehrere Farbstoffderivate kommerziell erhältlich. Die Snap-Markierung erfolgte durch Klonierung des Leserahmens von ADAP in den Snap-Tag Expressionsvektor pSET7-26b, wobei der offene Leserahmen unter Kontrolle des T7-Promotors steht. ADAP wurde C-terminal an den Snap-tag fusioniert. Dazu wurde zwischen beiden Proteindomänen eine TEV-Protease Schnittstelle mit der Option der Tag-Abspaltung eingeführt. Mit ADAP wurde dessen C-terminaler His-Tag kloniert, um die Aufreinigung des Snap-tag-Fusionsproteins zu ermöglichen.

Um zu prüfen, ob die Snap-tag-Fusion die Phosphorylierbarkeit von ADAP sowie die resultierende Bindungsfähigkeit von ADAP beeinflusst, wurde das Protein parallel zum bisher bestehenden ADAP-Konstrukt mit Fyn co-exprimiert sowie einem Pulldown mit GST-NCK1-SH2 unterzogen (Abb. 18). Die Expression von Snap-ADAP wurde zusätzlich in Anwesenheit des Snap-Farbstoffes durchgeführt; beide Proteine wurden ferner zur Vergleichbarkeit mit ¹⁴C-Leu markiert. Beim Vergleich der Molekülgrößen anhand des Laufverhaltens im SDS-Gel lässt sich die Anwesenheit des Snap-Tags durch ein um etwa 20 kDa erhöhtes Molekulargewicht beobachten, welches der Größe des Tags entspricht.

Sowohl Snap-ADAP als auch ADAP binden eindeutig phosphorylierungsabhängig an das angebotene SH2-Protein. Die gebundenen Proteine lassen sich spezifisch aus dem Komplex eluieren (Abb. 18: Eluate). Nach Autoradiographie und Fluoreszenzdetektion (Abb. 18 i, iii und v) lassen sich einige Abbruchprodukte erkennen, die aber das Bindungsverhalten des phosphorylierten Proteins nicht stören: Bei der Untersuchung des Phosphorylierungsgrads durch Anti-Phosphotyrosin Western-Blot wird nur die Proteinbande des vollständig exprimierten Proteins detektiert (Abb. 18 iv). Auch der Snap-Tag hat offensichtlich keinen störenden Einfluss auf die Bindungsfähigkeit von ADAP an das SH2-Protein.

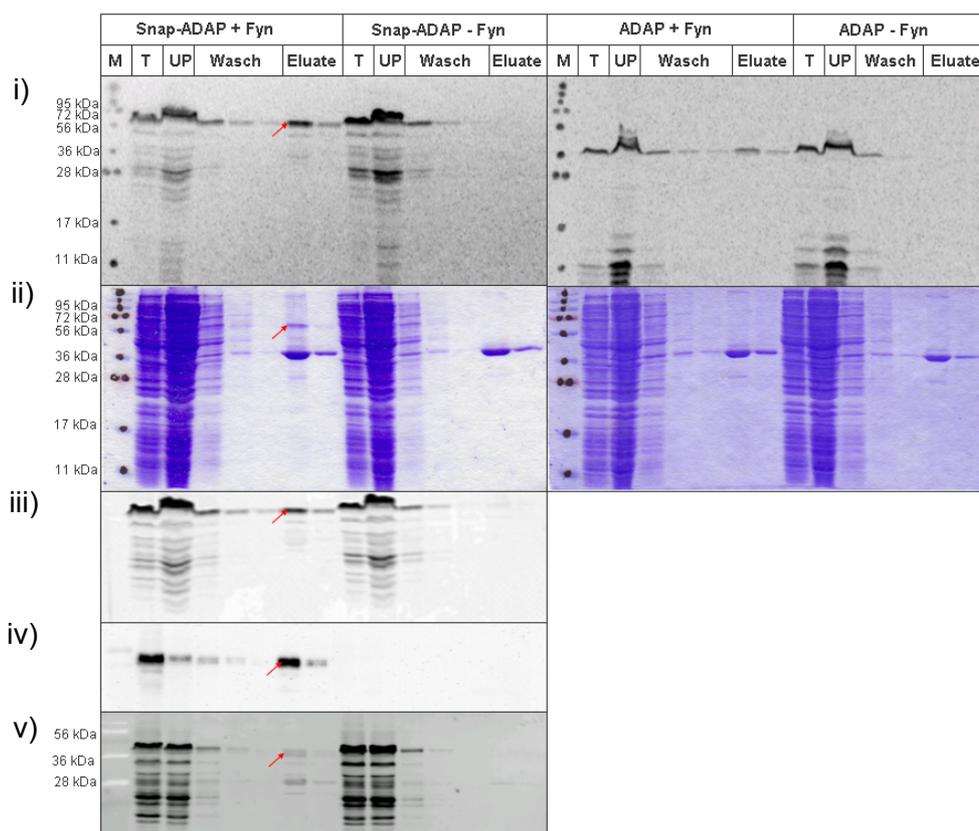


Abb. 18: Ko-translationale Phosphorylierung und Vergleich der SH2-Interaktion zwischen Snap-ADAP und ADAP. i) Autoradiogramm (Detektion von Snap-ADAP und ADAP), ii) Coomassie-Färbung. Nur für Snap-ADAP: iii) Anregung des Gels bei 633 nm (Nachweis des markierten Snap-Tags); iv) Western-Blot gegen einen Anti-pTyr-Antikörper zur Detektion der Tyr-Phosphorylierung, v) Detektion der PVDF-Membran bei 633 nm Anregung nach dem Anti-pTyr Western-Blot. Rote Pfeile markieren die Position von Snap-ADAP.

3.1.2. Synthese einer Bibliothek biotinylierter SH2-Proteine

Nachdem ADAP erfolgreich zellfrei synthetisiert, phosphoryliert und fluoreszenzmarkiert, sowie dessen phosphorylierungsabhängige Bindung in ersten Pulldown-Experimenten verifiziert wurde, bestand der nächste Ansatzpunkt zur Verbesserung der Analyse in der zellfreien Synthese der SH2-Domänenproteine. Das Hauptaugenmerk sollte hierbei auf das Ermöglichen einer flexiblen Auswahl von zu untersuchenden Interaktionspartnern gerichtet werden, wobei es insbesondere von Interesse war, schnell ausreichende Mengen an frischem Protein für sensitive Pulldowns erzeugen zu können. Hierfür stellte die Technologie der Expressions-PCR (E-PCR), die in der Proteinsynthese basierend auf PCR-generierten linearen Matrizen (Linear Templates) besteht, einen optimalen Ausgangspunkt dar. Sie vereinfachte es, auf eine cDNA-abgeleitete Klonkollektion mit SH2-Domänenhaltigen Proteinen zurückzugreifen.

In der cDNA-Bibliothek lagen die kodierenden Sequenzen der SH2-Domänenproteine kloniert in Form eines vollständigen offenen Leserahmens ohne Immobilisierungstags vor. Ferner verfügten die Vektoren über keine Promotoren, wodurch eine direkte Expression

nicht möglich war. Um die Synthese immobilisierbarer Proteine zu bewerkstelligen, wurden expressionsfähige Linear Templates generiert. Bei der Generierung der Linear Templates wurde am 5'-Ende des offenen Leserahmens ein von EF-Tu abgeleiteter Initiator mit amber-Codon TAG an der zweiten Aminosäureposition (*M-amb-KEKFER*) positioniert, der die ortspezifische Einführung von biotinyliertem Lysin (Biocytin) mit Hilfe einer chemisch aminoacylierten *amber*-Suppressor-tRNA ermöglichte.

Mit Hilfe dieses Systems konnten SH2-Proteine mit einer Biotinylierung innerhalb eines konstanten N-terminalen Kontextes in löslicher Form synthetisiert werden (Abb. 19). Insgesamt wurden zwölf SH2-Domänenproteine dargestellt: Grap2, SLP-76, Fyn, NCK2, Src, Lck, Vav1, SH2D1A, BCAR3, PIK3R1, Syk und Rasa1. Die drei letztgenannten Proteine enthalten jeweils zwei SH2-Domänen (Tandem-SH2). Hier wurden zunächst Leserahmen untersucht, welche beide SH2-Domänen enthielten. Zusätzlich wurden Matrizen für die isolierten SH2-Domänen von Rasa1 (RasaN und RasaC) sowie PIK3R1 (PIK3N und PIK3C) generiert. Für die Proteine NCK2, Lck, und Src wurden die Domänengrenzen auf der Basis von Röntgenstrukturdaten (Lange et al., 2003; Tong et al., 1998, Frese et al., 2006) gesetzt.

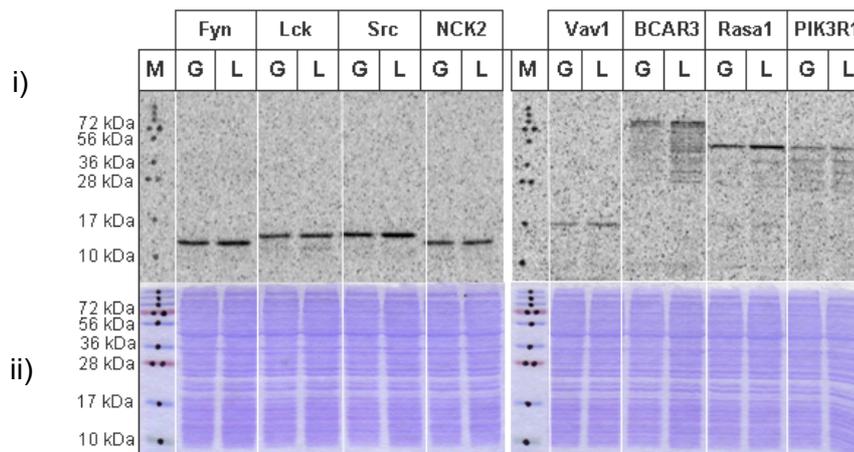


Abb. 19: Kontrollsynthese der ortspezifisch biotinylierten SH2-Domänen von Fyn, Lck, Src, NCK2 und Vav1 sowie der SH2-haltigen Proteine BCAR3, Rasa1 und PIK3R1. Bahnen: G: Gesamtansatz, L: Lösliches Protein. i) Autoradiographie, ii) Coomassie-Färbung des SDS-PAGE.

Wie Src und Lck wurden und SLP-76 auch als isolierte SH2-Domäne dargestellt. In den Fällen von BCAR3 (825 AS), Grap2 (330 AS) und SH2D1A (128 AS) wurde aufgrund fehlender Strukturinformation der gesamte Leserahmen des Proteins dargestellt. Im Falle von Vav1 wurde neben der SH2-Domäne auch der Großteil der N-terminalen SH3 Domäne in die Matrize einbezogen.

Für Bindungsstudien wurden sowohl bereits charakterisierte als auch nur vermutete Bindungspartner von ADAP ausgewählt. Zu der ersten Gruppe gehören die SH2-Domänen

von SLP-76, Fyn und NCK2. Zur zweiten Gruppe gehören u.a. Proteine, die in einer Proteomstudie (Lange et al., 2010; Stephanowitz et al., 2010) in Jurkat T-Zell Lysaten als potenzielle weitere Interaktionspartner von ADAP identifiziert wurden. Hierzu gehören Grap2 und SH2D1A, ebenso wie Rasa1 und PIK3R1.

Rasa 1 war besonders interessant, da sein N-Terminus mit zwei SH2-, einer SH3, einer PH- und einer C2-Domäne vielfältige Verknüpfungsmöglichkeiten zu anderen Proteinen enthält, welche Rasa1 als vielseitigen Modulator in Proteininteraktionsnetzwerken wirken lassen (Pamonsinlapatham et al., 2009). Die bekannteste Eigenschaft von Rasa1 ist, dass es am C-Terminus eine Ras-GTPase aktivierende (RasGAP) Domäne besitzt und die intrinsische Inaktivierung des wichtigen Signalproteins Ras beschleunigt, welches die Aktivierung der MAP-Kinase Kaskade reguliert (Bryant et al., 1996; Avruch et al., 2001). PIK3R1 hingegen ist eine regulatorische Untereinheit der Phosphoinositol-3-Kinase und entsprechend an diesem Regulationsweg beteiligt (Antonetti et al., 2001). Lck und Src, gehören wie Fyn zur Familie der Src-Kinasen, wobei Src im Gegensatz zu Fyn und Lck nicht in T-Zellen vorkommt und als Positivkontrolle aufgenommen wurde (Huang et al., 2000). Weiterhin wurde Syk, eine mit ZAP-70 verwandte Tyrosinkinase, die auch in bestimmten T-Zelllinien präsent ist, ausgewählt, sowie BCAR3, ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF). über dessen Funktion bisher nicht viel bekannt ist, der aber transient exprimiert wird (van Anghoven et al., 1998). Ebenfalls über eine GEF-Funktion verfügt Vav1, das mit ADAP indirekt über SLP-76 in einem Komplex verbunden ist, aber nicht direkt mit ADAP interagiert, das in der Signaltransduktion des aktivierten T-Zell Rezeptors unabdingbar ist (Raab et al., 1997).

Damit enthielt die dargestellte SH2-Bibliothek sowohl charakterisierte als auch nur vermutete Bindungspartner von ADAP, sowie in Vav1 auch eine Negativkontrolle.

3.1.3. Weitere Konstrukte von ADAP und wichtige Kontrollkonstrukte

Um einerseits die Flexibilität des Arbeitsflusses zu demonstrieren, andererseits aber auch die anhand von ADAP generierten Daten validieren zu können, wurden weitere Phosphoproteinkonstrukte dargestellt. Im Besonderen wurde hierbei das Augenmerk auf die Anwesenheit klar definierter Phosphorylierungsstellen gerichtet.

Das Erkennungsmotiv YEEI ist in der Literatur als hochaffiner Ligand von SH2-Domänen der Src-Kinasefamilie beschrieben und intensiv auf der Ebene von phosphorylierten Festphasenpeptiden untersucht worden (Waksman et al., 1992; Ladbury et al, 1995). Diese Sequenz wurde ausgewählt, um einen direkten Vergleich von in dieser Arbeit gewonnenen Bindungsdaten mit Literaturwerten (Ladbury et al, 1995) der entsprechenden SH2-Domänen (im besonderen Src, Fyn, Lck) zu ermöglichen und so die verwendeten Methoden zu validieren. YEEI wurde analog zu ADAP als Snap-Fusionsprotein dargestellt.

Snap-EEI beinhaltet die Phosphorylierungsstelle Tyr324 des Middle T Antigens des Hamster Polyomavirus (MT³¹⁵⁻³³¹); der relevante Bereich entspricht einem Heptadecapeptid. In der Konstruktion von Snap-EEI wird die Sequenzspezifität von Peptiden mit den Moleküleigenschaften von Proteinen verknüpft.

Ein weiteres Konstrukt, Snap-595, umfasst die Umgebung der Phosphorylierungsstelle Tyr595 von ADAP (ADAP⁵⁸⁵⁻⁶⁰²), ebenfalls in Form eines Heptadecapeptid. Von den genannten Konstrukten wurden auch *amber*-Varianten kloniert, um den phosphorylierbaren Tyrosinrest ortsspezifisch gegen andere Aminosäuren austauschen zu können, beispielsweise gegen p-Azidophenylalanin als Anknüpfungspunkt für die Staudinger-Phosphit-Reaktion und gegen Alanin für Negativ-Kontrollen.

Weiterhin wurden zwei SH3-Domänen aus ADAP kloniert. Die N-Terminale SH3-Domäne von ADAP (hSH3n) umfasst den Bereich zwischen den Aminosäuren 486 und 579, überlappend mit dem unstrukturierten Linker-Bereich, der als ADAP-A geführt wird. Beide Bereiche sind ebenso in der Variante ADAP-B (vgl. Abb. 15A, S. 40) enthalten. Durch Fyn wird hSH3n *in vitro* selektiv nur an einer einzigen Position phosphoryliert, Y571 (mündliche Mitteilung Christian Freund, Freie Universität Berlin). Durch das im Rahmen dieser Arbeit generierte Snap-Fusionsprotein (Snap-SH3n) konnte dazu beigetragen werden, die Tandem-SH2-Domänen der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Zap-70 als Interaktionspartner zu identifizieren (Kuropka et al., 2013). Ebenfalls wurde die C-terminale SH3 Domäne (hSH3c, ADAP⁶⁷⁸⁻⁷⁸¹) als isoliert exprimierbare Matrize dargestellt.

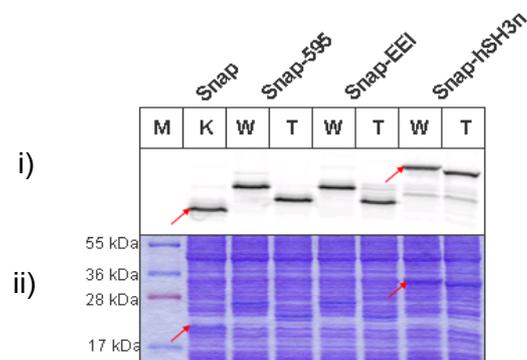


Abb. 20: Analyse der zellfreien Expression und ko-translationalen Markierung der Fusionsproteine Snap-595, Snap-EEI und Snap-hSH3n sowie des Snap-Leervektors zur Kontrolle. i) Anregung des Gels bei 633 nm. ii) Coomassie-Färbung des Gels. W: Expression der Wildtypsequenz, T: Expression der *Amb*-Mutanten unter Termination des *amber*-Stopcodons. Rote Pfeile markieren die Positionen von Snap und Snap-hSH3n.

Nach der erfolgreichen Klonierung und Sequenzierung wurde die Exprimierbarkeit der Konstrukte untersucht. Im RF1-haltigen Expressionssystem lassen sich die eingeführten *amber*-Stopcodons nachweisen (Abb. 20). Sowohl für die Konstrukte Snap-595 und Snap-EEI, als auch für Snap-SH3n lassen sich bei der Expression der *amber*-Varianten Proteine

von etwas geringerer Länge als im Falle der nicht-mutierten Sequenzen beobachten, welche aber ein höheres scheinbares Molekulargewicht aufweisen als der isolierte Snap-Tag.

Gereinigtes Snap-595 und Snap-hSH3n wurden mit Fyn *in vitro* phosphoryliert und die Bindung an ausgewählte SH2-Domänen (Syk-NC und GST-NCK1) untersucht. Snap-595 bindet klar an NCK1-SH2. Eine Bindung an Syk-NC konnte weder in Falle von Snap-595 noch bei Snap-hSH3n beobachtet werden. Syk-NC war aber wie erwartet in der Lage, an ADAP zu binden (Abb. 21).

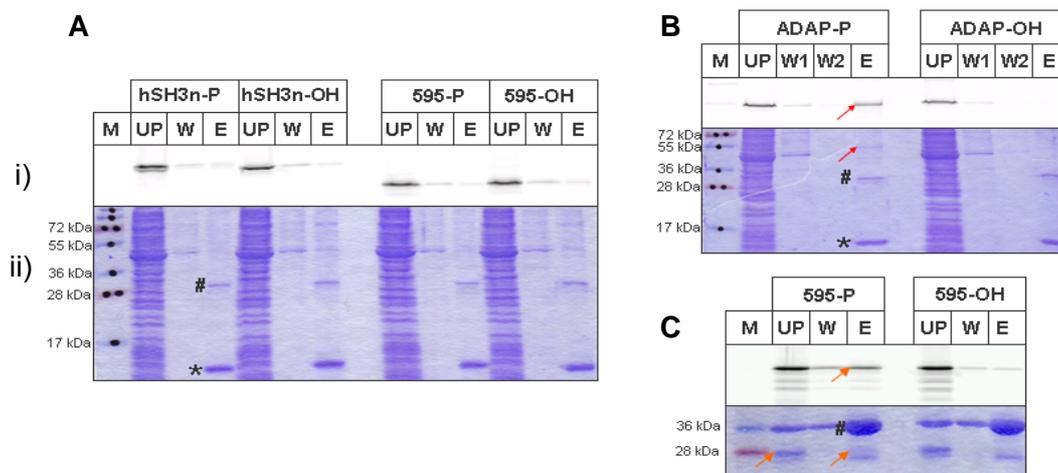


Abb. 21: Tests gegenüber der phosphorylierungsabhängigen Bindung von Snap-SH3n und Snap-595. A) Pull-down von phosphorylierter hSH3n und Y595 gegen Syk (Tandem-SH2-Domänen). B) Positivkontrolle der Interaktion zwischen Syk und Snap-ADAP. C) Phosphorylierungsabhängige Interaktion von Snap-595 mit GST-NCK1-SH2. *: monomeres Streptavidin. #AB: Syk-Tandem-SH2, #C: GST-NCK1-SH2. Rote Pfeife (B) markieren ADAP, orange Pfeile (C) markieren Snap-595. i) Fluoreszenzanregung 633 nm, ii) Coomassie-Färbung. Jeweils UP: ungebundenes Protein (Bindungsüberstand), W: Waschfraktion, E: Elutionsfraktion (Strip).

3.2. Funktionsuntersuchungen an Tyrosin-phosphorylierten Proteinen

3.2.1. Pull-down-Screening zur Bestätigung von ADAP-Bindungspartnern

Nachdem im Vorangegangenen gezeigt wurde, dass sowohl fluoreszenzmarkiertes ADAP als auch SH2-Domänenproteine zellfrei und funktionsfähig dargestellt werden können, wurden diese zur Funktionsuntersuchung eingesetzt. Wie beschrieben, besteht die Funktion Tyrosin-phosphorylierter Proteine in der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen. Bei der Analyse einer möglichen Wechselwirkung zweier Proteine gilt es primär zu klären, ob eine Wechselwirkung stattfindet. Für diese Untersuchung wurde der

hierfür gut geeignete Pulldown eingesetzt. Die erhaltenen Daten können als qualitative Analyse aufgefasst werden.

Als konstante Interaktionskomponente wurde ADAP stets in Lösung zugesetzt, während die unterschiedlichen SH2-Domänenproteine frisch synthetisiert und immobilisiert wurden und somit eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine korrekte Faltung besitzen. Durch die Translation in konstanten Reaktionsansätzen, ließ sich ebenfalls der Nachteil unterschiedlicher zellulärer Expressionsniveaus nivellieren und somit eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse erreichen. Durch die hohe Sensitivität der Fluoreszenzmarkierung konnten sämtliche Interaktionen mit der gleichen Stammlösung von phosphoryliertem ADAP durchgeführt werden.

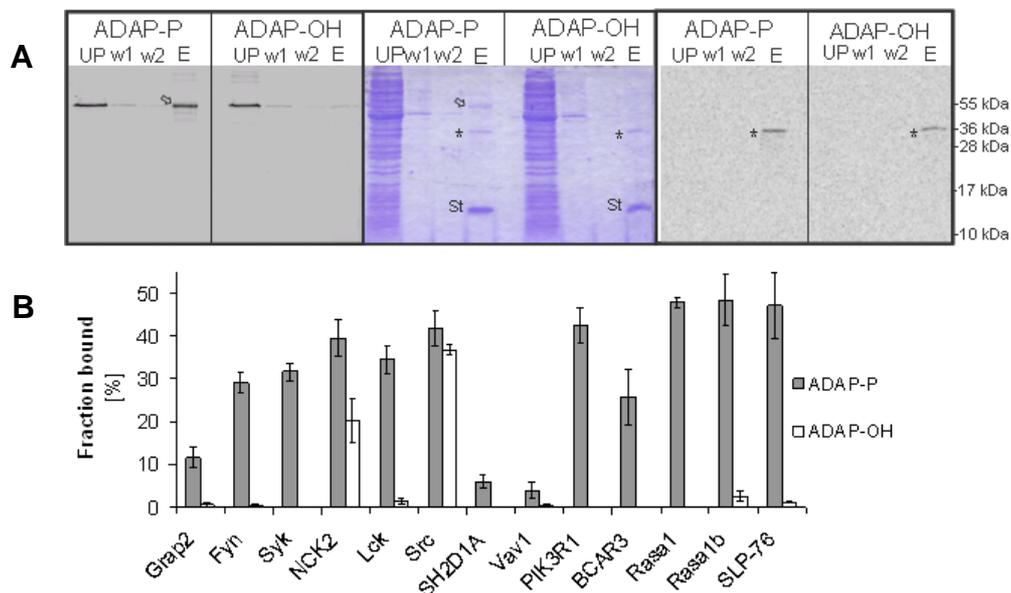


Abb. 22: Ergebnisse der Pulldown-Untersuchung von ADAP⁵⁷⁰⁻⁶⁹⁰ gegen immobilisierte SH2-Proteine. A) Beispiel eines Pulldowns anhand von Rasa1b. Linkes Hauptfeld: Fluoreszenzdetektion von ADAP nach SDS-PAGE, mittleres Hauptfeld: Coomassie-Färbung des gleichen Gels, rechtes Hauptfeld: Autoradiogramm zur Detektion des ¹⁴C-Leu markierten Rasa1b. Bahnen: UP: Bindungsüberstand, w: Waschfraktionen, E: Eluat nach Aufkochen der Festphase in RotiLoad Probenpuffer. Pfeil: ADAP, * Rasa1b, St: durch das Aufkochen von der Festphase gelöstes, monomeres Streptavidin. B) Relative Anteile an gebundenem im Vergleich zum insgesamt angebotenen ADAP bestimmt aus Fluoreszenzintensitäten der ADAP Banden im Gel.

Das Ergebnis des Pulldowns (Abb. 22B) zeigt, dass phosphoryliertes ADAP mit unterschiedlicher Intensität an die angebotenen SH2-Proteine bindet. Außerdem wurde im Rahmen der Messungen keine Sättigung der Bindung eines SH2-Proteins an ADAP beobachtet. Für Rasa1, SLP-76 und PIK3R1 wurde jeweils ein Immobilisierungsgrad von bis zu 50% beobachtet, während die verbliebenen ca. 50% im Durchlauf enthalten waren

und folglich nicht gebunden wurden. Ein etwas geringerer Bindungsgrad wurde bei den SH2-Domänen von Src und Nck2 beobachtet.

Im Vergleich zu Src unterscheiden sich die verwandten SH2-Domänen von Lck und Fyn. Beide Domänen zeigen eine ausgeprägte Sensitivität gegenüber der Phosphorylierung von ADAP, binden jedoch einen geringeren Anteil als Src-SH2. Allerdings trat sowohl bei Src als auch vermindert bei NCK2 eine merkliche Bindung des nicht-phosphorylierten ADAP auf. Da diese Beobachtung der unspezifischen Bindung reproduziert werden konnte, wurden die Fraktionen eines Pulldown-Experiments von Src-SH2 mittels anti-pTyr Western-Blot untersucht, um den Phosphorylierungsgrad von ADAP zu kontrollieren. Als positive Referenzkontrolle für eine spezifische Bindung wurden Fraktionen eines Pulldowns gegen Syk verwendet, als negative Referenz diente ein Pulldown gegen Vav1 (Abb. 23). Hierbei konnte bestätigt werden, dass der unspezifischen ADAP-Interaktion mit Src kein experimenteller Fehler z.B. in Form einer unerwünschten Phosphorylierung von ADAP zugrunde lag. Außerdem bestätigte das Experiment, dass phosphoryliertes ADAP von Vav1 nicht gebunden wird sowie die deutlich erhöhte Menge an gebundenem ADAP durch Src im Vergleich zu Syk.

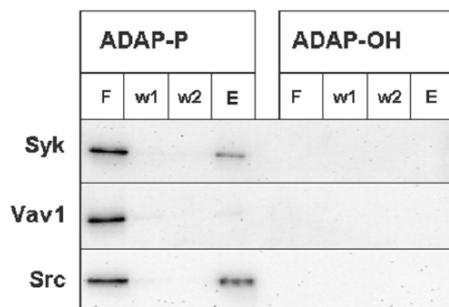


Abb. 23: Anti pTyr Western Blot gegen Pulldown von Src, Syk und Vav1 zur Kontrolle des Phosphorylierungsgrades von ADAP. Bahnen: F: Bindungsüberstand, w: Waschfraktionen, E: Eluat nach Aufkochen der Festphase in RotLoad.

Die Tandem-SH2-Domänen von Syk konnten phosphoryliertes ADAP in ähnlichem Maße wie Fyn-SH2 binden. Obwohl Syk in T-Zellen nicht exprimiert wird, ist dieses Resultat dennoch beachtenswert, da Syk mit der T-Zell Rezeptor assoziierten Kinase ZAP-70 verwandt ist. Ein etwas schwächeres Bindungsvermögen weist das bisher wenig charakterisierte BCAR3 auf, wobei die Bindung vollständig phosphorylierungsabhängig ist. Des Weiteren muss beachtet werden, dass BCAR3 als Vollängenprotein mit einer Kettelänge von 835 Aminosäureresten eingesetzt wurde, wodurch ein Hinweis auf eine hohe Qualität der ortsspezifisch biotinylierten SH2-Proteine gegeben wird. Eine noch schwächere, wenngleich ebenso phosphorylierungsabhängige Bindung von ADAP konnte an Grap2 beobachtet werden. Auch in diesem Fall wurde das Vollängenprotein untersucht

(340 Aminosäurereste). Dies ist bemerkenswert, da Grap2 in Pulldowns von Zellysaten als ubiquitärer Interaktionspartner von ADAP erscheint. Das Protein SH2D1A sowie die SH2-Domäne von Vav1 zeigen *de facto* keine Interaktion zu ADAP auf. Dies war im Falle von Vav1 zu erwarten. Andererseits wurde SH2D1A im Vorfeld als möglicher ADAP-Interaktionspartner von ADAP mit einem zu Rasa1 vergleichbaren Anreicherungsfaktor detektiert. Damit lässt sich festhalten, dass neben den SH2-Domänen der Src-Kinasen vor allem die beiden Tandem-SH2-Domänen von Rasa1 und PIK3R1 ein hohes Bindungsvermögen von phosphoryliertem ADAP aufweisen. Da diese Ergebnisse Teil eines Plans waren, ein starkes Testsystem für pTyr Analoga aufzubauen, sollten der Einfluss der einzelnen SH2-Domänen beider Proteine auf ADAP untersucht werden (Abb. 24).

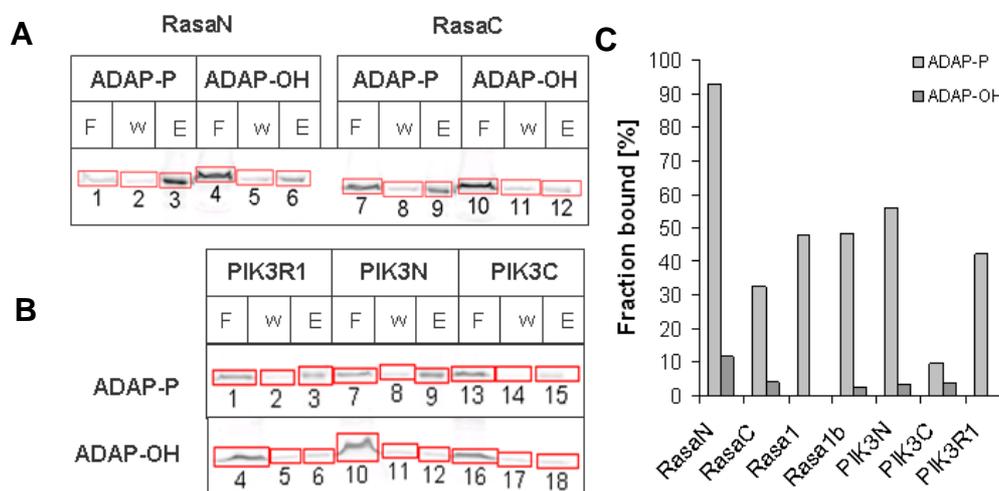


Abb. 24: Pull-down-Untersuchung der isolierten SH2-Domänen von Rasa1 und PIK3R1. A) Fluoreszenzauslesung nach SDS-PAGE der Pull-down-Experimente von ADAP mit A) RasaN und RasaC, B) PIK3N und PIK3C mit paralleler Kontrolle der Tandem-SH2-Domänen (PIK3R1), C) Relative Anteile an gebundenem im Vergleich zum insgesamt angebotenen ADAP bestimmt aus Fluoreszenzintensitäten der ADAP-Banden im Gel..

Im Falle beider Proteine lässt sich beobachten, dass jeweils die N-terminal liegende SH2-Domäne den stärkeren Einfluss auf die Bindung hat. Im Fall von PIK3R1 bindet die Domäne PIK3N etwa 25% mehr ADAP als die Tandem-SH2-Domänen, während die Affinität von PIK3C zu ADAP etwa im gleichen Bereich wie die von SH2D1A liegt. Beide isolierte Domänen zeigen im Vergleich zum Tandemkonstrukt minimale unspezifische Bindung an nicht phosphoryliertes ADAP. Dagegen zeigte RasaC eine ähnliche Affinität zu ADAP wie etwa Fyn oder Syk, welche geringer ist als die des Tandemkonstrukts. Allerdings konnte RasaN unter den als nicht sättigend eingestuftten Pull-down-Bedingungen ADAP fast vollständig binden. Auch bei den isolierten SH2-Domänen von Rasa1 ließ sich eine leichte

Tendenz zur Bindung von nicht phosphoryliertem ADAP erkennen. Im Gegensatz zur in Abbildung 22B dargestellten Zusammenfassung wurden diese Experimente nicht wiederholt, jedoch mit den identischen Proben von ADAP durchgeführt wodurch sie miteinander vergleichbar sind. Ebenfalls zeigt die geringe Fehlerschwankung in Abbildung 22B, dass die Einzelwerte stimmig und zur Beurteilung der Gesamttendenz ausreichend genau sind.

3.2.2. Bestimmung der Dissoziationskonstanten von phosphoryliertem ADAP

Nachdem die qualitative Untersuchung phosphorylierungsabhängiger Wechselwirkungen von ADAP eine Vielzahl von Bindungsergebnissen lieferte, stellte sich die Frage nach der Relevanz der Aussagekraft dieser Daten sowie der experimentellen Bedingungen des Pull-down-Experiments. Wenn eine Interaktion qualitativ nachgewiesen ist, stellt sich die Frage nach ihrer Affinität. Eine gute Antwort hierauf liefert die Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_d) der Interaktion.

Interessant ist diese Frage vor allem hinsichtlich der Tatsache, dass ADAP über mehrere Phosphorylierungsstellen verfügt. K_d -Werte wurden bisher nur mit phosphorylierten Festphasenpeptiden über Oberflächen-Plasmonresonanz (SPR, engl. Surface plasmon resonance) und isothermer Titrationskalorimetrie (ITC, engl. Isothermal titration calorimetry) bestimmt und die Peptide dabei selten mehrfach phosphoryliert. Zudem wurde die Frage bisher nicht beantwortet, welchen Einfluss der größere Sequenzkontext phosphorylierter Proteine auf die Bindung ausübt. Zunächst wurde angedacht, die K_d -Bestimmung mittels SPR durchzuführen, bevor später die Überstandsabreicherung sowie schließlich die Microscale Thermophorese als Mittel der Wahl betrachtet wurden. Die einzelnen Ergebnisse werden im Folgenden aufgeführt.

3.2.2.1. Voruntersuchungen zur K_d -Bestimmung über SPR-BIACORE

Die Methode der Oberflächen-Plasmonresonanz wurde zunächst für die Bestimmung von K_d -Werten der Interaktion von ADAP und ausgewählter SH2-Domänen in Betracht gezogen. Grundlegend für die SPR ist die Immobilisierung einer der Bindungspartner, welche auf Grund der Verfügbarkeit Streptavidin-beladener Sensorchips und der durch die Pull-down-Untersuchung vorhandenen Funktionalität des ortsspezifisch in den SH2-Domänen eingebauten Biotins als gut durchführbar erschien. Hinsichtlich der experimentellen Vorgehensweise wäre es erforderlich gewesen, das Bindungsexperiment mehrfach zu wiederholen, wobei der lösliche Interaktionspartner (Analyt) vor der erneuten Beladung wieder hätte entfernt werden müssen.

Im Rahmen der Pull-down-Untersuchungen erfolgte die Auflösung des Komplexes durch Einwirkung von SDS-PAGE Probenpuffer, und damit durch die denaturierende Wirkung von

SDS. Um die Rückgewinnung einer freien SH2-Oberfläche im BIACORE zu simulieren und somit die Anwendbarkeit der Methode in diesem speziellen Fall abzuschätzen, wurde die Ablösung von ADAPs auf Streptavidin-Kügelchen immobilisierten Lck- und Fyn-SH2-Domänen getestet (Abb. 25). Hierfür musste ADAP zunächst gebunden werden. Als Bindungspuffer wurde anstelle des im Pull-down verwendeten 1× PBS ein mit Tween-20 versetzter HBS Puffer verwendet, ein in BIACORE-Anwendungen gebräuchlicher Bindungspuffer. Nach Abnahme des Bindungsüberstandes, wurden die Kügelchen mit variablen Lösungen versetzt. Eine Waschlösung mit optimalen Bedingungen würde hierbei das gebundene ADAP wieder freilassen. Um eine mögliche Denaturierung der immobilisierten SH2-Proteine zu detektieren, wurde der Vorgang zweimal wiederholt. Im Optimalfall sollte sich das Ergebnis des ersten Zyklus ebenfalls wiederholen lassen. Bei der Zusammenstellung der Waschlösungen wurden bewusst härtere Bedingungen gewählt, um diese bei Bedarf, also erfolgreicher ADAP-Entfernung unter gleichzeitiger SH2-Denaturierung, abmildern zu können. Das Ergebnis findet sich in Abbildung 25.

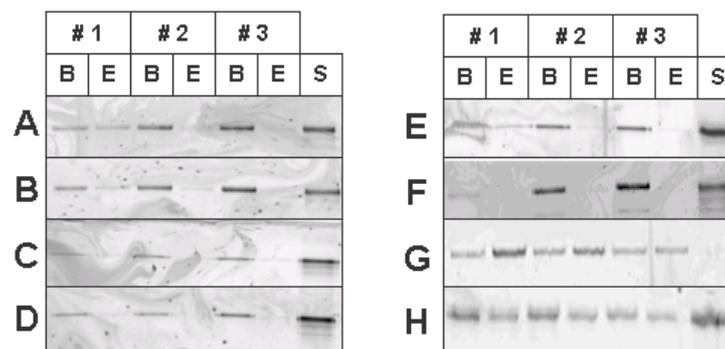


Abb. 25: Voruntersuchungen zur Auflösung des ADAP-P/SH2-Komplexes an der Festphase. B: Bindung von ADAP an immobilisierte Biotinyl-SH2-Domäne in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,0005% Tween-20. E: Waschschrift als Elutionsversuch (Inkubation für 2 min) in folgenden Lösungen: A) und B) 10 mM HCl. C) 50 mM HCl. D) 50 mM HCl + 200 mM GdmCl. E) 50 mM HCl + 0,2% SDS. F) 4 M NaCl. G) 6 M GdmCl. H) 2 M GdmCl. Die Schritte Bindung und Wasch wurden je zweimal wiederholt. S: Abschließende Freisetzung aller Proteine durch Aufkochen in SDS-PAGE-Probenpuffer. Immobilisierte SH2-Domäne: B-D: Biotinyl-Fyn-SH2. A sowie E-H: Biotinyl-Lck-SH2.

Das Ergebnis zeigt unter allen untersuchten Wasch-/Entfernungsbedingungen einen ähnlichen Befund. Das im ersten Schritt aufgetragene ADAP wird zum Teil abgewiesen, was sich mit den Erfahrungen des Pull-down Screenings deckt.

Im ersten Entfernungsschritt wird mit Ausnahme der konzentrierten GdmCl-Lösung kein ADAP wieder freigelassen, es verbleibt im Komplex mit der SH2-Domäne auf den Streptavidin-Kügelchen. In den weiteren Bindungsschritten war ein zum Bindungsschritt 1 ähnliches Abweisungsverhalten zu beobachten, während in den beiden Entfernungsschritten 2 und 3 abermals kein freies ADAP detektiert wurde.

Beim abschließenden Stippen der Kügelchen, unter Freilassung aller drei Proteine (ADAP, SH2 und Streptavidin) ist außer dem Fall mit 6M GdmCl eine deutliche ADAP-Fraktion zu erkennen. Folglich wurden die SH2-Domäne im Laufe des Experiments mit ADAP gesättigt, zumindest verblieb das darauf gebundene ADAP im Komplex mit der SH2-Domäne. Die Auswahl der Waschbedingungen richtete sich nach Bedingungen, in der BIACORE Untersuchung für die Interaktion der Zap-70 Tandem-SH2 mit einem abgeleiteten Peptid der ITAM-Motive von CD3 ζ des TCR im BIACORE erfolgreich abgelöst wurde (Labadia et al., 1997). Für die Durchführung eines BIACORE-Experimentes würde dies bedeuten, dass der gebundene Komplex nicht wieder abgewaschen werden kann. Aufgrund des teuren Preises der BIACORE-Chips sowie aufgrund des erheblich höheren Bedarfs an Biotinylierter SH2-Domäne wurde daher beschlossen, eine andere Methode zur Affinitätsbestimmung vorzuziehen.

3.2.2.2. K_d Bestimmung durch Supernatant Depletion Assay

Nachdem die K_d -Bestimmung durch SPR als zu teuer und riskant eingeschätzt wurde, richtete sich das Augenmerk auf eine einfache Methode, die zu Unrecht einen geringen Bekanntheitsgrad hat, die Überstandsabreicherung (engl. Supernatant depletion). Hierbei handelt es sich um eine Ausdehnung der Pulldown-Methode, welche von Tom Pollard und Mitarbeitern entwickelt wurde (Pollard, 2010; Arasada & Pollard, 2011). Während bei einem Pulldown die Konzentration des immobilisierten Bindungspartners fixiert ist, wird bei der Überstandsabreicherung eine Verdünnungsreihe der Festphase samt des immobilisierten Partners durchgeführt. Im Anschluss wird der Ligand in konstant niedriger Menge zu jedem Glied der Reihe zugegeben und bis zur Einstellung des Gleichgewichts der Interaktion inkubiert. Durch Abnehmen des Bindungsüberstands sowie der Quantifizierung des darin befindlichen freien (und damit nicht-gebundenen) Liganden wird der gebundene Anteil pro Reihenglied bestimmt.

Das Ziel dieser Untersuchung war es, eine schnelle Abschätzung der Dissoziationskonstante auf Basis der Oberflächenimmobilisierung zu erhalten, wie sie für SPR ebenfalls notwendig ist. Zudem lassen sich diese Daten direkt mit den unter 2.2.1. beschriebenen Pulldown-Experimenten vergleichen, da sowohl die gleiche Charge von ADAP als auch die identische Immobilisierungsstrategie mit derselben Affinitätsmatrix verwendet wird.

Insgesamt wurde auf diese Weise die Interaktion von phosphoryliertem ADAP gegen drei SH2-Domänen untersucht (Abb. 26). Gegenüber RasaN zeigte ADAP eine starke Affinität, deren K_d etwa 60 nM beträgt, ein Wert der im bis dato bekannten Affinitätsbereich der SH2-vermittelten Bindung beinahe die maximale Bindungsstärke erreicht. Die hohe Affinität lässt sich gut in Einklang mit der quasi vollständigen Immobilisierung von ADAP im Pulldown

gegen RasaN bringen. Die bekannte Interaktion von ADAP mit der SH2-Domäne von SLP-76 weist eine ähnlich hohe Affinität auf, welche mit etwa 90 nM beziffert werden kann, wohingegen die SH2-Domäne von Fyn merklich schwächer an ADAP mit etwa 300 nM bindet. Die Negativkontrolle der Inkubation von nicht phosphoryliertem ADAP an Fyn-beladenen Streptavidin-Kügelchen zeigte keine nennenswerte unspezifische Bindungstendenz auf.

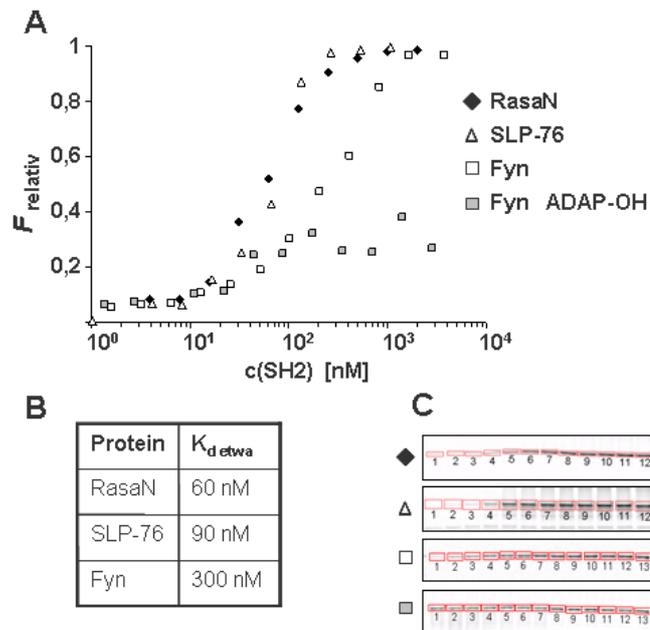


Abb. 26: K_d -Abschätzung durch den Überstandsabreicherungs-Pulldown. (A) Titration von ADAP gegen die SH2-Domänen von Fyn, SLP-76 und RasaN. Auftrag des ermittelten Bindungsgrades F_{rel} gegen die SH2-Konzentration. (B) Aus den Bindungskurven abgeschätzte K_d -Werte der phosphorylierungs-abhängigen Interaktion. (C) Fluoreszenzdetektion der den Bindungskurven zugrunde liegenden Überstände per SDS-PAGE.

Ebenso wurde weder phosphoryliertes noch nicht-phosphoryliertes ADAP von der unbeladenen Matrix adsorbiert. Die aus der Auftragung der Ergebnisse resultierenden Bindungskurven belegen, dass mit steigender Konzentration der immobilisierten SH2 eine Sättigungsphase erreicht wird, über deren Schwellenwert das frei in Lösung befindliche ADAP komplett gebunden wird. Betrachtet man die durchschnittlichen Ausbeuten der für die Pulldown-Studie synthetisierten SH2-Proteine und den daraus resultierenden Konzentrationen an immobilisiertem Protein während der Pulldowns kann man folgende Feststellung treffen. Die Konzentrationen schwankten in einem Bereich zwischen 70 nM und 160 nM und trafen somit den frühen Anstiegsbereich der Bindungskurve. Im Fall von Rasa1 lag die resultierende Konzentration im Bereich der K_d , wodurch eine Immobilisierung von etwa 50% beobachtet werden konnte. Im Beispiel von Fyn lag die Konzentration im Pulldown mit 160 nM noch deutlich unterhalb der K_d , wofür sich 300 nM

mit dem beobachteten Immobilierungsgrad gut vereinbaren lassen. Dadurch lässt sich die Aussage treffen, dass bereits die gewählten Bedingungen des Pulldowns eine semiquantitative Aussage bieten. Hinsichtlich der Validität der generierten Daten lässt sich festhalten, dass diese von hoher Qualität und Relevanz sind, gerade weil ein Sättigungsgrad nicht erreicht wurde, oberhalb dessen die Gefahr der Verfälschung des Ergebnisses aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen immer wahrscheinlicher wird.

Diese Analysemethoden liefern zwei Aussagen. Zum einen stellt sie einen direkten Bezug zu den unter 2.2.1. beschriebenen qualitativen Bindungsdaten dar, da sowohl die gleiche Charge von ADAP als auch die identische Immobilierungsstrategie mit derselben Affinitätsmatrix verwendet wird. Zum anderen erlaubt diese Methode die schnelle Abschätzung der Dissoziationskonstante auf Basis einer Oberflächenimmobilisierung, wie sie für SPR ebenfalls notwendig ist.

3.2.3.3. Bestätigung der Dissoziationskonstanten von phosphoryliertem ADAP durch MST

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten einiger ausgewählter Wechselwirkungen in Lösung wurde durch Microscale Thermophoresis (MST) bestimmt. Wie es sich im Rahmen der Überstandabreicherung andeutete, bindet ADAP mit verschiedenen Affinitäten an die jeweiligen SH2-Domänen. (Abb. 27). Während der für die Integrinaktivierung wichtige Bindungspartner SLP-76 mit einer K_d von etwa 500 nM gebunden wird, liegt die K_d für die Interaktion mit Fyn bei etwa 1000 nM und ist somit um den Faktor 2 schwächer. Die SH2-Domänen von Src und Lck binden ADAP mit einer ähnlichen Affinität wie Fyn, was aufgrund deren Zugehörigkeit zur selben Kinasefamilie (Src-Familie) und der damit zugrundeliegenden hohen Sequenzhomologie nicht verwunderlich ist. Während die Interaktion mit Src von vernachlässigbar physiologischem Interesse ist, da Src in T-Zellen nicht exprimiert wird, ist die Beobachtung, dass sowohl Lck als auch Fyn ADAP mit vergleichbarer Affinität binden können aber durchaus beachtenswert.

Obwohl es als experimentell erwiesen gilt, dass ADAP *in vivo* vornehmlich von Fyn phosphoryliert wird, kann dieser Befund unter Bezugnahme auf die Interaktionsfähigkeit im Pulldown auf die schwache phänotypische Ausprägung eines Fyn-Knockout in CD4 T-Zellen (Mamchak et al., 2008) in Einklang gebracht werden. Obwohl das Protein SH2D1A in Jurkat T-Zelllysat basierten Pulldown als möglicher ADAP-Interaktor identifiziert wurde, belegt die K_d -Bestimmung die Beobachtung des Pulldown-Ergebnisses dass diese Interaktion im Verdacht steht unbedeutend zu sein.

Eine K_d im Bereich von 5 μM ist für eine SH2-vermittelte Wechselwirkung recht schwach, wodurch ein Zustandekommen vor dem T-Zelllysathintergrund möglicherweise auf eine stark erhöhte Expression von SH2D1A zurückzuführen ist.

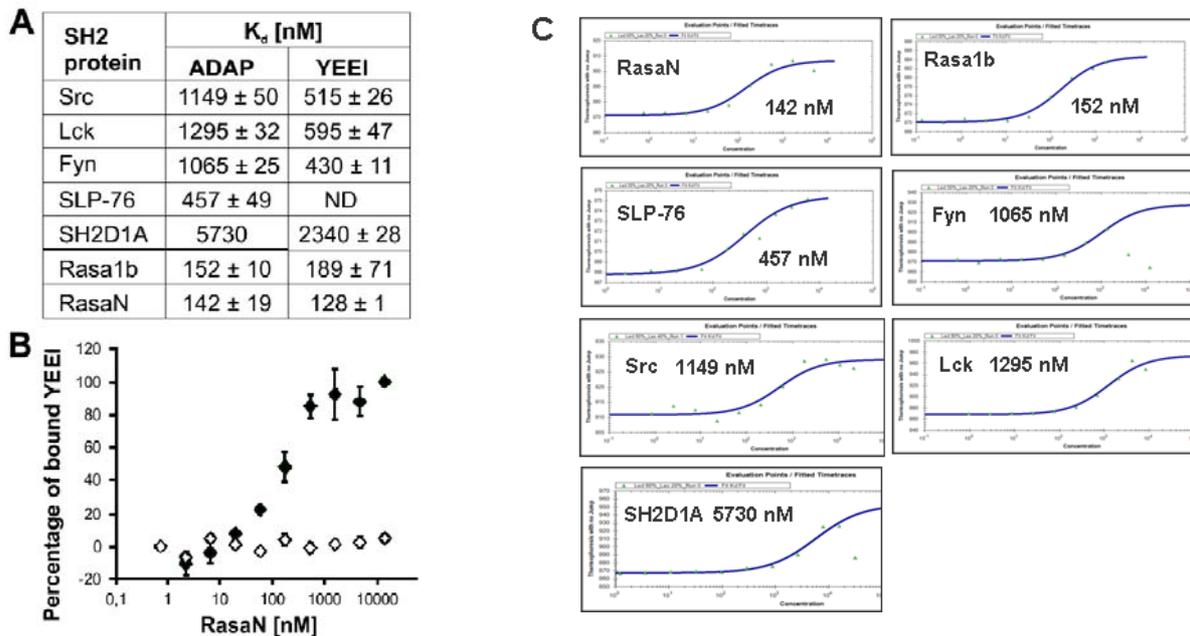


Abb. 27: Bestimmung von K_d -Werten für ADAP mittels Microscale-Thermophorese. A) Durch MST bestimmte K_d -Werte für phosphoryliertes ADAP und YEEI. B) Darstellung der Bindungskurve für phosphoryliertes (\blacklozenge) und nicht-phosphoryliertes (\blacklozenge) YEEI gegen die N-terminale SH2-Domäne von Rasa1. C) Beispiel einer Bindungskurve von phosphorylierten ADAP gegen jede einzelne, mit MST untersuchte SH2-Domäne

Interessanterweise stellt Rasa1 den stärksten Interaktor von ADAP dar, der im Rahmen dieser Studie untersucht wurde. Die Interaktion ist mit einer K_d im Bereich von 100 nM für eine SH2-vermittelte Wechselwirkung beachtlich und erreicht den Bereich der maximalen Bindungsstärke. Durch Vergleich der isolierten N-terminalen SH2-Domäne des Proteins (RasaN) mit dem Tandem-SH2 Konstrukt Rasa1b zeigt sich, dass diese Bindung vornehmlich durch die N-terminale SH2 vermittelt wird. Das als Rasa1b bezeichnete Konstrukt enthält neben der C-terminalen SH2 zusätzlich noch die SH3-Domäne des Proteins, welche die Bindung von ADAP nicht verstärken, allerdings auch nicht behindern. Physiologisch ist diese Interaktion durchaus von Interesse, da Rasa1, ein RasGTP-ase aktivierendes Protein ubiquitär exprimiert wird. Seiner Hauptfunktion, der Inaktivierung des Signalproteins Ras folgend lässt es sich mit der Regulation der Transmembransignaltransduktion in Verbindung setzen. Hingewiesen werden soll ebenfalls noch einmal auf die Tatsache, dass Rasa1 im Jurkat-Zelllysat basierten Pulldown als Interaktionsmotiv der Phosphorylierungsstelle um Tyr595 identifiziert wurde.

Zusammenfassend lässt sich für die untersuchten Interaktionspartner eine phosphorylierungsabhängige Bindungshierarchie des C-terminalen ADAP-Linkers andeuten. Sollten alle untersuchten Proteine in vergleichbaren Konzentrationen in T-Zytosol vorliegen, wird ADAP erst Rasa1, dann SLP-76 und erst danach an die Kinasen Fyn und Lck binden. Es konnte ebenfalls beobachtet werden, dass nicht-phosphoryliertes ADAP keine Interaktion zu den ausgewählten SH2-Domänen zeigt, darunter auch nicht zu Src, welche im Pulldown zu beobachten war. Möglicherweise deutet dies auf die Unverträglichkeit der Src-SH2-Domäne in dieser Pulldowndurchführung hin, welche durch die MST-basierte K_d Bestimmung eine Überprüfung fand. Generell sollte der Wert einer Überprüfung durch unabhängige experimentelle Methoden nicht unterschätzt werden.

Die Validierung der erhaltenen K_d konnte durch die Bestätigung der Werte des YEEI-Motivs gegenüber den SH2-Domänen der Src-Familie erzielt werden (Ladbury et al., 1995). Insbesondere die gerade genannte Referenz verdeutlicht die Angemessenheit der unabhängigen Überprüfung. Im Hinblick der generellen Verlässlichkeit der Methode der Microscale Thermophorese lässt sich darauf hinweisen, dass die Methode in der Literatur mittlerweile als gleichwertig mit den bis dato angewandten Methoden betrachtet wird.

3.3. Überprüfung eines chemoselektiv durch Staudinger-Reaktion generierten Phosphotyrosinanalogs

Durch *in vitro* Phosphorylierung von Proteinen mit Kinasen ist es nicht möglich, Proteine an selektiven Phosphorylierungsstellen sicher und stöchiometrisch zu modifizieren. Darüber hinaus ist es von großem Interesse, den Einfluss einer bestimmten Phosphorylierungsstelle im Kontext des Gesamtproteins untersuchen zu können. Hierfür wäre die Möglichkeit, Phosphorylierungen ortsspezifisch und selektiv einzuführen eine wertvolle Bereicherung. Über die Staudinger Reaktion lässt sich mit Phosphiten, unter Verwendung spaltbarer Schutzgruppen, genau dies an ortsspezifisch eingeführten p-Azidophenylalanin (AzPhe) – Seitenketten chemoselektiv darstellen.

Zur Modifikation von Proteinen und Peptiden wurde in der Arbeitsgruppe ein solches Phosphit (im Folgenden: Caging-Phosphit, Abb. 27B) entwickelt (Serwa et al., 2009). Dieses ist durch photolabile o-Nitrobenzylester geschützt, wobei die Schutzgruppen mit Pentaethylenglykol verethert sind um die Wasserlöslichkeit des Edukts zu gewährleisten. Die Umsetzung dieses Phosphits konnte an einem Hexapeptid (AzPheADEFLL) in wässriger Umgebung (100 mM Tris/HCl, pH 8,2) anhand hochauflösender Massenspektrometrie (ESI-TOF) nachgewiesen werden. Die Reaktion beider Edukte verläuft ferner im leicht basischen Milieu (pH 7,4-8,2) bei einer Peptidkonzentration von 50 μ M sowie 100 Äquivalenten Caging-Phosphit recht schnell. Das entstandene, geschützte Phosphoramidat ist in wässrigen Lösungen stabil und kann durch

kurze Bestrahlung mit UV-Licht (90 sek) komplett entschützt werden. Auf Proteinniveau konnte ein Hinweis auf die Funktionalität durch Umsetzung eines mit AzPhe ortspezifisch modifizierten Modellproteins (Transportprotein SecB aus *E. coli*) gewonnen werden. Nach abgeschlossener Modifikation und Entschätzung ließ sich per Western-Blot eine gewisse Bindungsfähigkeit eines anti-Phosphotyrosin Antikörpers beobachten, während nicht modifiziertes SecB kein Antikörper-vermitteltes Signal lieferte.

3.3.1. Umsetzung von AzPhe₂ADAP mit dem Caging Phosphit

Die Eignung des durch die Staudinger-Reaktion generierbaren ungeschützten Phosphoramidats als Phosptyrosin analog sollte anhand der Interaktion von modifizierten ADAP mit SH2-Domänen untersucht werden. Mit AzPhe bestücktes ADAP wurde direkt mit dem Caging-Phosphit umgesetzt. Zur Synthese des Azidoproteins wurde die Punktmutante ADAP Y₂(595,651)Amb₂ gewählt, da sich im Rahmen der Vorevalierung des Deketionsassay diese Phosphorylierungsstellen als entscheidend für die Bindungsfähigkeit von Fyn- und NCK1-SH2 herausgestellt hatten.

Die Synthese des Azidoproteins wurde im Batch-Maßstab durchgeführt, das Protein wurde von einem Pufferaustausch abgesehen, nicht aufgereinigt. Die anschließende Umsetzung mit dem Caging-Phosphit fand demnach vor dem gesamten Lysatproteom statt. Vor der lichtinduzierten Entschätzung durch einen uv-Laser wurde das Protein zur Entfernung überschüssigen Phosphits aufgereinigt und im Anschluss an die Entschätzung direkt mit immobilisierter GST-Fyn-SH2 bzw. -NCK1-SH2 (Abb. 28) im Pulldown untersucht. In mehrfachen Versuchen konnte keine Interaktion von ADAP mit der SH2-Domäne beobachtet werden. Als Kontrolle wurde das modifizierte Protein vor der Entschätzung, untersucht.

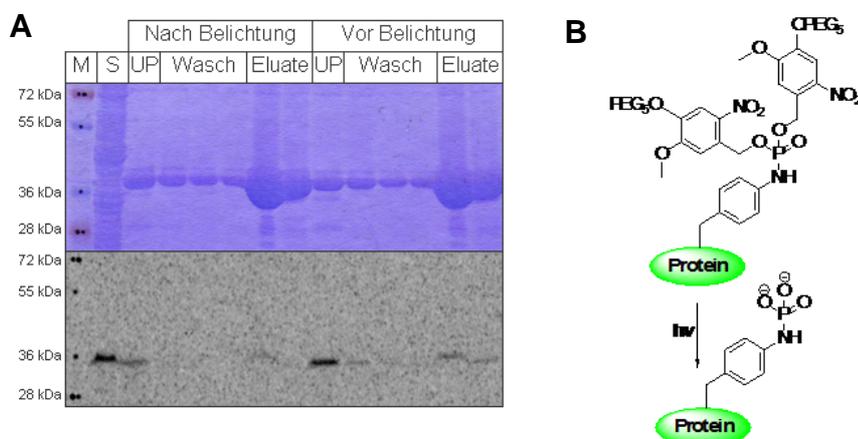


Abb. 28: A) Pulldown des mit dem Caging-Phosphit umgesetzten AzPhe₂ADAP vor und nach Entschätzung durch Belichtung. AzPhe₂ADAP. Oberes Feld: Coomassie-Färbung. Unteres Feld: Autoradiogramm des SDS-PSGE B) Übersicht der Generierung des ungeschützten Phosphoramidats auf Proteinebene.

Interessanterweise zeigt sich in beiden Modifikationszuständen eine minimale Interaktion von ADAP mit der SH2-Domäne. Diese ließe sich durch eine geringfügige spontane Verseifung der photolabilen Esterschutzgruppen erklären, zumal das Signal des belichteten ADAPs im Autoradiogramm (Abb. 28A) ein deutlich schwächeres Signal als ohne Belichtung liefert, trotz gleicher Auftragsmenge. Durch den erheblichen Überschuss an der immobilisierten SH2-Domäne kann diese schwache Interaktion aber auch als Artefakt unspezifischer Proteinadhäsion betrachtet werden. Dennoch wurde der Einfluss einer strukturell stabilen und nicht interaktionsfähigen Modifikation an der entsprechenden Position in ADAP zu untersuchen, wurden Kontrollexperimente durch Umsetzung mit Trimethylphosphit durchgeführt (Abb. 29).

Das entstehende Produkt hat zwar eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zum ungeschützten Phosphoramidat, darf aber den Eigenschaften der pTyr-Bindungstasche einer SH2-Domäne durch seinen ungeladenen Zustand nicht binden. Durch die erhöhte oxidative Empfindlichkeit wurde $P(OMe)_3$ in DMSO gelöst und portionsweise dem Protein zugefügt. Die mit 20 mM hohe Endkonzentration an diesem Phosphit sollte jedoch für das Abfließen der Reaktion ausreichen (Abb. 29A). Da die Methylester des entstehenden Phosphoramidats mit milden Methoden nicht verseift werden können, dürfte AzPhe₂ADAP mit einer SH2-Domäne keine Wechselwirkung eingehen. Hierfür ist, wie bereits erwähnt, die negative Ladung der modifizierten Gruppe unerlässlich. Dies sollte die Anwendbarkeit des Detektionsansatzes bestätigen. Der Maßstab der Proteinsynthese wurde hierfür entsprechend den bisher verlaufenen Reaktionen relativ niedrig gewählt. Daher konnte auch in diesem Fall keine instrumentelle Analytik, in Form der Massenspektrometrie, angewendet werden. In den Pulldowns konnte wie erwartet durch den Umsatz mit Trimethylphosphit keine Bindung zwischen ADAP und NCK1-SH2 beobachtet werden. Um auszuschließen, dass durch Belichtung des Proteins nicht-modifizierte Azidogruppen durch den UV-Laser zu hochreaktiven Nitrenen umgewandelt werden, und somit möglicherweise als Crosslinker wirken, wurde unbehandeltes AzPhe₂ADAP für 20 sek bestrahlt und einem Pulldown gegen NCK1-SH2 unterzogen (Abb. 29B).

Als Negativkontrolle diente schlicht nicht-belichtetes AzPhe₂ADAP. In beiden Fällen konnte keine detektierbare Bindung weder an die SH2-Domäne noch an deren Trägeroberfläche (Glutathion-Magnetkügelchen) beobachtet werden, das gesamte Protein wurde im Bindungsüberstand gefunden. Vor dem Hinblick, dass keine unerwünschten Nebenreaktionen zu erwarten sind, wurde Snap-markiertes AzPhe₂ADAP mit dem Caging-Phosphit umgesetzt. Nach der obligatorischen Aufreinigung wurde die Hälfte des Ansatzes belichtet, während die zweite Hälfte unbelichtet belassen wurde, und somit als

Negativkontrolle dient. Im sofortigen Anschluss wurden beide Proteine mit immobilisierter GST-NCK1-SH2 inkubiert (Abb. 29C).

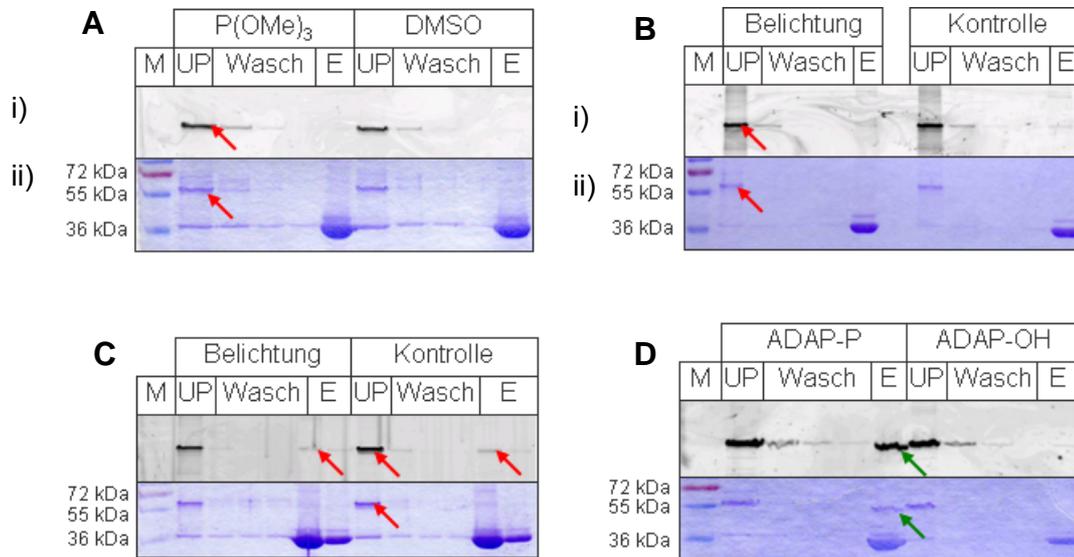


Abb. 29: Kontrolluntersuchungen zur Staudinger-Reaktion mit anschließendem Pull-down gegen GST-NCK1-SH2. A) Umsetzung von AzPhe₂ADAP mit P(OMe)₃ in DMSO sowie Kontrollinkubation unter Zugabe von DMSO. B) Belichtung von unmodifiziertem AzPhe₂ADAP für 10 sek, Kontrolle ohne Belichtung. C) Umsetzung von AzPhe₂ADAP mit dem Caging-Phosphit und anschließender Belichtung für 10 sek, als Kontrolle dient umgesetztes, nicht belichtetes AzPhe₂ADAP. D) Positivkontrolle mit nativen, mit Fyn phosphoryliertem ADAP, als Kontrolle dient nicht-phosphoryliertes ADAP. i) Anregung bei 633 nm, ii) Coomassie Färbung. Rote Pfeile: AzPhe₂ADAP, Grüne Pfeile: Fyn-phosphoryliertes ADAP.

Während die ausbleibende Wechselwirkung der Kontrollprobe als zu erwartend eingestuft wurde, zeigte allerdings auch die belichtete Fraktion keine nennenswerte Interaktion mit der SH2-Domäne. In beiden Fällen lässt sich die Anwesenheit minimaler Mengen an AzPhe₂ADAP in den Elutionsfraktionen vermuten. Das Fehlen dieser leichten Signale in den Waschfraktionen deutet tatsächlich auf eine echte Interaktion hin, allerdings ist deren Belichtungsunabhängigkeit ein Anzeichen eines Artefaktes. Bei der Anwendung vergleichbarer Mengen an Kinase-phosphorylierten wildtypischen Snap-ADAP, sowie als Kontrolle unphosphorylierten ADAP zeigte sich eine deutliche Bindung des phosphorylierten Liganden ADAP (Abb. 29D). Eine Untersuchung der Proben mittels anti-pTyr abhängigen Western Blot konnte dabei belegen, dass die Phosphorylierung unvollständig war und somit das aus dem Phosphorylierungsansatz abgewiesene ADAP nicht phosphoryliert war. Der phosphorylierte Anteil von etwa 50% wurde von der SH2-Domäne gebunden.

Da eine Phosphoramidat-vermittelte Interaktion zwischen dem Zielprotein und einer SH2-Domäne nicht beobachtet werden konnte, und unter den gegebenen Proteinmengen keine

instrumentelle Analytik möglich war, fiel der Entschluss, die bioorthogonale Umsetzung der Azidogruppe biochemisch zu untersuchen.

3.3.2. Überprüfung der Zugänglichkeit der Azidofunktionen in ADAP

Da in den im Vorfeld erwähnten Untersuchungen der Proteinumsatz nicht beobachtet werden konnte und die dargestellten Proteinmengen zu gering für die massenspektrometrische Bestimmung des Umsatzes waren, war es unklar ob die zum Einbau von AzPhe gewählten Positionen in ADAP überhaupt für das Phosphin zugänglich waren. Die Zugänglichkeit wurde im Folgenden mit einem farbstoffmarkierten Phosphin untersucht. Die Wahl fiel auf das kommerziell erhältliche DyLight-650 Phosphin (ThermoFischer). Durch den Reaktionsumsatz wird durch eine Staudinger Ligation das Protein mit dem Farbstoff Alexa-647 chemoselektiv markiert. Zur Vergleich der Mutationsstellen in ADAP wurden andere Modellproteine hinzugeholt, deren Matrizen den ortsspezifischen Einbau von AzPhe an einer einzigen Stelle erlauben: SecB, HLFA und CaM. Die folgende Abbildung zeigt den Umsatz von AzPhe₂ADAP, HLFA und SecB mit DyLight-650 (Abb. 30). Wie sich der Fluoreszenzauslesung in der oberen Tafel entnehmen lässt, konnten alle drei Proteine mit dem Farbstoff umgesetzt werden.

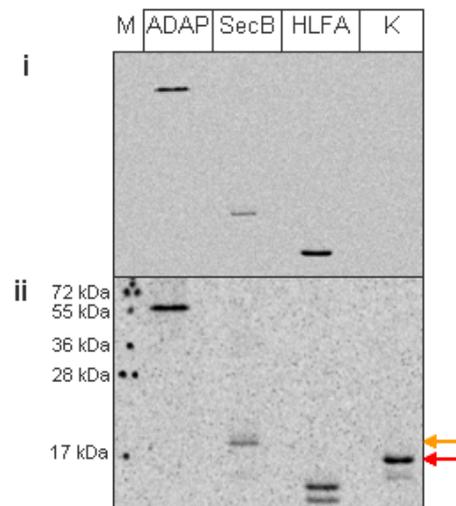


Abb. 30: Kontrollumsetzung AzPhe-haltiger Proteine mit dem Staudinger-Phosphin Dy-Light649 (Pierce). i) Anregung bei 633 nm. ii) Autoradiographie (¹⁴C-Leu). Bahnen: Umsatz von AzPhe₂ADAP, SecB, HLFA_Amb88. K: Kontrolle mit nicht-modifiziertem SecB. Roter Pfeil: zeigt Retention von nicht-modifiziertem SecB, der orange Pfeil zeigt die Retention des DyLight-650 modifizierten SecB.

Die schwache Bande für SecB kann durch den Umsatz einer aufgereinigten Proteinprobe erklärt werden, wohingegen ADAP und FABP nach der Synthese vor dem Hintergrund des Zellysats belassen wurden.

Nach Abschluss der Reaktion erfolgte die Fällung des Ansatzes mit Aceton, wobei häufig

die Beobachtung gemacht wurde, dass mit Alexa-647 modifizierte, kleine Proteine häufig einen sehr flockigen Niederschlag bilden, der bei der Dekantierung verloren geht. Lediglich ein Pufferaustausch wurde zur Entfernung der überschüssigen, freien Aminosäure (AzPhe) durchgeführt. Dies sollte im Falle von ADAP die Spezifität der Reaktion demonstrieren, im Falle von HLFA konnte keine Reinigung erfolgen, da dieses Protein keinen Reinigungstag besitzt. Wie der oberen Tafel zu entnehmen ist, lässt sich der Farbstoff ausschließlich in definierten Proteinbanden detektieren.

Alle Proteine wurden zudem ko-translational mit ^{14}C -Leu markiert. Die Auswertung des SDS-Gels im Radiogramm zeigt im Fall des kleinen Proteins HLFA eine deutliche Doppelbande, wobei die obere Bande das modifizierte Protein darstellt während das protein der unteren Bande nicht modifiziert wurde. Im Vergleich des farbstoffmodifizierten SecB mit dem zur Kontrolle aufgetragenen unmodifizierten SecB lässt sich die Veränderung des Laufverhaltens aufgrund der Farbstoffmodifizierung erkennen.

3.3.3. Optimierung und Detektion der Staudinger-Phosphit-Reaktion auf Proteinebene

Nachdem die Zugänglichkeit der AzPhe-Reste in ADAP gezeigt wurde, bestand der nächste Schritt in der Optimierung der Reaktionsbedingungen des Caging-Phosphits auf Proteinebene. Hierfür wurde zunächst die Wahl des richtigen Lösungsmittels sowie der Temperatur genauer untersucht, zunächst anhand des AzPhe-haltigen Modellproteins FABP (Abb. 31). Die Konzentration des Phosphits wurde konstant gelassen, während verschiedene Volumenanteile an DMSO der Reaktion zugesetzt wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass ein Umsatz von FABP mit dem lichtentschützbaren Phosphit zum Teil stattgefunden hat. Die Umsatzrate betrug im Maximalfall 46%. Mit dem Ergebnis bezweckt wurde auch eine Antwort auf die Frage, ob der Zusatz polarer, aprotischer Lösemittel die Reaktion beeinflusst. Hierfür wurde DMSO gewählt, da dies neben seiner Verwendung in der Peptidchemie als Zusatz durchaus auch bei der PCR Verwendung findet und somit nicht denaturierend wirken sollte. Interessanterweise lässt sich durch Zusatz von 20% DMSO der Umsatz der Reaktion nicht steigern. Bei hohen Anteilen an DMSO läuft die Reaktion sogar deutlich schlechter ab, was sich durch eine zunehmende Entfaltung des Proteins erklären ließe.

Es kann allerdings festgehalten werden, dass durch Zusatz von DMSO die Reaktion keinen höheren Umsatz oder eine signifikante Verbesserung erfährt. Ebenfalls zeigt dieses Ergebnis, dass die Staudinger-Phosphit-Reaktion an Proteinen temperatursensitiv ist, es konnten bei einer Inkubationstemperatur von 32°C leicht höhere Umsätze beobachtet werden als bei 25°C , allerdings ist der Unterschied nicht allzu groß.

Hierfür sollte in Betracht gezogen werden, dass bei der Modifikation von Proteinen mesophiler Organismen (darunter quasi alle Wirbeltiere und Insekten) eine Temperatur von

37°C nicht wesentlich überschritten werden sollte um thermische Denaturierung zu vermeiden. Wenngleich vollständiger Umsatz wünschenswert ist, sollten die bestehenden Reaktionsparameter ausreichen, um die Eignung des ungeschützten Phosphoramidats als pTyr-Analog untersuchen zu können. Nach erfolgter Konversion an FABP, gelang jedoch die Photoentschützung des Proteins nicht. Grund hierfür ist die fehlende Möglichkeit der Aufreinigung, und damit die statisch favorisierte Entschützung des in Lösung vorliegenden freien Phosphits.

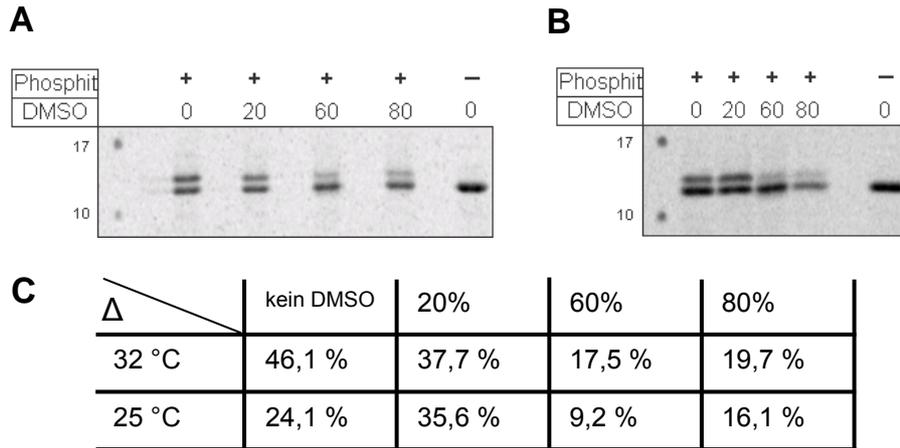


Abb. 31: Modifikation von HLFA(AzPhe88) mit dem Caging-Phosphit in PBS. Autoradiographie durch ¹⁴C-Leu markiertes HLFA. Reaktion (A) bei 32°C über Nacht, (B) bei 25°C über Nacht. Der Zusatz an DMSO ist in Volumenprozent angegeben. Das Phosphit wurde gleichmäßig bei einer Endkonzentration von 6mM. Die Endkonzentration von HLFA betrug 3,4 µM. (C) Auftragung der ermittelten Umsatzraten.

Die Entschützung des Caging-Phosphits wurde daraufhin mit dem bereits publizierten Modellprotein SecB (Serwa et al., 2009) nachgestellt (Abb. 32), wobei durch die Staudinger-Phosphit-Reaktion scheinbar eine Veränderung des Laufverhaltens auftritt. Durch Belichtung konnte aber keine Veränderung des Laufverhaltens erzielt werden, der beobachtete Doppelbande findet sich ebenfalls in der unmodifizierten Kontrollprobe.

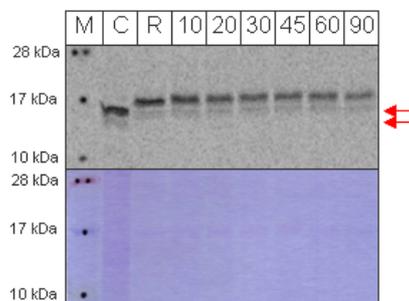


Abb. 32: Entschützung von umgesetzten SecB bei direkter Belichtung. M: Proteinlängenstandard. C: Unmodifiziertes SecB. R: SecB nach der Staudinger-Reaktion. Die Dauer der Belichtung ist jeweils in Sekunden angegeben. Obere Tafel: Autoradiogramm (¹⁴C-Leu-SecB). Untere Tafel: Coomassie-Färbung des SDS-PAGE. Die Pfeile zeigen die beiden beobachteten Subfraktionen von SecB an.

Diese Befunde sorgten dafür, ein anderes Protein für die Detektion der Entschützung zu verwenden. Die Wahl fiel auf eine Variante des menschlichen Signalproteins Calmodulin (CaM). Hierbei ist das *amber*-Stop Codon an Position 2 des ORF in einem Initiatorpeptid außerhalb der eigentlichen CaM-Sequenz eingebaut. Das Protein verfügt ferner über einen C-terminalen His-Tag. Nachdem AzPhe-haltiges Calmodulin synthetisiert wurde, sollten der Umsatz und die Entschützung des Proteins systematisch untersucht werden. Zunächst stellte sich bezüglich der Photoentschützung die Frage, ob die bisher gewählten Belichtungszeiten ausreichend waren und ob die Proteine die Belichtung überstehen.

Hierfür wurde nicht modifiziertes CaM über unterschiedliche Zeiträume ohne einen UV-Filter direkt belichtet (Abb. 33A). Es zeigte sich, dass CaM in PBS-Puffer nach bereits 20 sec Belichtung schwer beschädigt wird, der Effekt verstärkt sich kontinuierlich bei Erhöhung der Belichtungsdauer auf 2 min. In einem (zur Entschützung von tRNAs entwickelten) Photopuffer (Iris Claußnitzer, RiNA GmbH) hingegen blieb die Integrität des Proteins gewahrt. Bei einer Belichtung bis zu 90 s konnte keine Zersetzung des Proteins beobachtet werden, erst nach 2 min lässt sich eine leichte Zersetzungstendenz erkennen. Nachdem feststand, dass CaM im Photopuffer schadlos belichtet werden konnte, wurde das Protein mit dem Caging-Phosphit umgesetzt (Abb. 33B). Es zeigte sich, dass die Modifikation von CaM eine übermäßig große Veränderung des Laufverhaltens in der SDS-PAGE zur Folge hat, wodurch die Detektion des Umsatzes deutlich erleichtert wird. Nach Belichtung des modifizierten Proteins für 2 min konnte im SDS-PAGE eine Bande beobachtet werden, welche denselben Retentionswert wie das nicht-modifizierte Protein aufweist. Die deutet auf die vollständige Entfernung der hin, da die Belichtung des Ansatzes eine Entfernung der höhermolekularen Bande verursachte. Auffällig war zudem, dass sich durch die Belichtung dicht oberhalb der Hauptbande eine zweite schwache Bande befand, welche aber ein deutlich niedrigeres scheinbares Molekulargewicht aufweist als das geschützte Produkt vor der Belichtung. Möglicherweise handelt es sich dabei um das Protein, welches das freie Phosphoramidat trägt. Nachdem eine Belichtung für 2 min die vollständige Entschützung des Proteins bewirkt, wurde modifiziertes CaM im Anschluss unterschiedlichen Belichtungsdauern ausgesetzt (Abb. 33D).

Hierbei konnte beobachtet werden, dass das Protein bereits nach 20 sec vollständig entschützt war, was eine längere Belichtung nicht notwendig macht. Die Proben wurden im Anschluss per Western-Blot mit einem anti-pTyr-Antikörper untersucht, wobei Fyn-Kinase phosphoryliertes ADAP als Positivkontrolle diente. Im Western-Blot ließ sich nur die Kontrolle detektieren, während weder das entschützte CaM, noch Produkt und Edukt der Staudinger-Reaktion eine Interaktion mit dem pTyr-bindenden primären Antikörper eingingen. Um die Chemoselektivität der Staudinger-Reaktion zu überprüfen, wurde im Rahmen eines separaten Projekts in der Arbeitsgruppe ein von Robert Vallée

synthetisiertes PEGyliertes Phosphonit mit Az-Phe haltigen CaM umgesetzt, als Parallelkontrolle diente CaM, dessen *amber*-Stopcodon mit Serin unterdrückt wurde (Abb. 33C). Nur in Anwesenheit des azidhaltigen Aminosäurerests konnte ein Umsatz mit dem Phosphonit beobachtet werden das Resultat konnte als Beleg der Chemoselektivität der Staudinger-Phosphonitreaktion publiziert werden (Vallée et al., 2011).

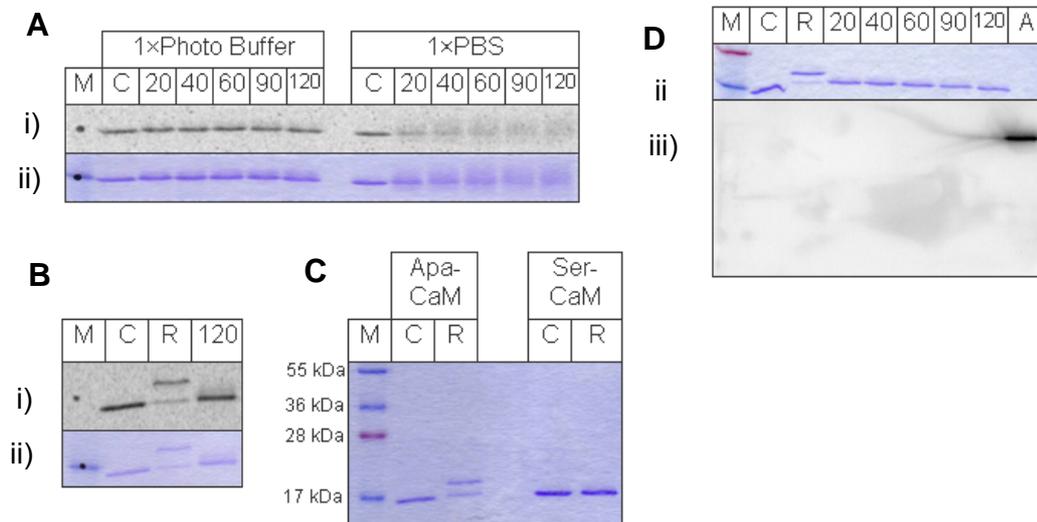


Abb. 33: Belichtungsstabilität von AzPheCaM und Entschützung A) Testbelichtung von AzPheCaM in Photopuffer und PBS. B) Staudinger-Reaktion mit AzPheCaM und dem Caging-Phosphit sowie Spaltung der Schutzgruppen. C) Überprüfung der Bioorthogonalität der Staudinger-Reaktion mit AzPhe-CaM, Ser-CaM und Phosphonit (2). D) Entschützungsserie des umgesetzten AzPheCaM und anschl. pTyr-Western-Blot, Bahn A: Fyn-phosphoryliertes ADAP als Positivkontrolle (nur im Western aufgetragen). Teilbilder i): Autoradiographie (^{14}C -Leu), ii) Coomassie-Färbung, iii) Chemolumineszenz des anti-pTyr Western Blot. Bahnen allgemein: M: Längenstandard, C: aufgereinigtes CaM, R: CaM nach Umsetzung mit Caging-Phosphit bzw. PEG₂-Phosphonit (Abb. 32C), 20 bis 120: Belichtungsdauer der Probe in Sekunden.

Obwohl der Photopuffer zur Entschützung von tRNAs optimiert wurde und folgend als milder Puffer betrachtet wurde, hat dieser einen pH-Wert von etwa 2,8. Neben dem Effekt der Proteindenaturierung im Säuren stellt sich ebenfalls das Problem der Säurelabilität von Phosphoramidaten. Zwar lässt sich durch Bandenverschiebung des CaM-Produkts die temporäre Stabilität des geschützten Phosphoramidats schlussfolgern, welche allerdings durch die sterische Abschirmung des Phosphoratoms durch die Schutzgruppen, und dabei insbesondere durch die PEG₅-Ketten erklärt werden kann. Es ist denkbar, dass das entschützte Phosphoramidat größtenteils zu p-AminoPhe und Phosphat hydrolysiert wurde, was sich mit der Beobachtung der leichten Doppelbande in Abb. 33B in Einklang bringen ließe und andererseits die fehlende Detektion im Western-Blot (Abb. 33D) erklären könnte. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden die Experimente in Photopuffer mit neutralem pH wiederholt.

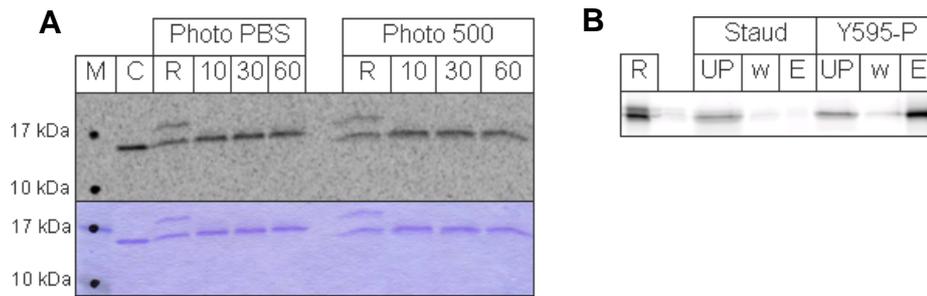


Abb. 34: Optimierung der Photoentschützung A) Entschützung des mit dem Caging-Phosphit umgesetzten Calmodulin in 1×PhotoPuffer in PBS (pH~2,8, PhotoPBS) und 1×PhotoPuffer in 500 mM Na₂HPO₄ (pH ~7,1, Photo 500). B) Pull-down von Az-Y595 umgesetzt mit dem Caging-Phosphit und entschützt in Photo 500 an Streptavidin-Kügelchen immobilisierter Fyn-SH2. Staud: Pull-down mit entschütztem Az-Y595. Y-595: Positivkontrolle mit Kinase-phosphoryliertem Y595.

Zur Neutralisierung des Photopuffers wurde dieser mit 500 mM Na₂HPO₄ eingestellt, wodurch der pH-Wert von 2,8 auf 7,1 erhöht werden konnte. Die Entschützungsfähigkeit des neuen Puffers wurde erneut mit umgesetzten AzPhe-Calmodulin überprüft (Abb. 34A). Wie der Vergleich zum bisher verwendeten Photopuffer zeigt, gelang die Entschützung unter den neu gewählten Bedingungen in gleichem Maße; unter beiden Bedingungen wurde die im SDS-PAGE höher laufende Produktbande der Staudinger-Reaktion durch Belichtung eliminiert. Um die Aktivität des entstehenden Phosphoramidats zu kontrollieren, wurde im Folgenden das Protein AzPhe-SNAP-Y595 (SNAP-konjugiertes ADAP-Peptid der Phosphorylierungsstelle um Tyr595) mit dem Caging-Phosphit umgesetzt und in Photo500-Puffer entschützt. Im Anschluss wurde ein Pull-down gegen auf Streptavidin-Kügelchen immobilisierter Fyn-SH2 durchgeführt. Als Positivkontrolle diente tyrosinhaltiges, mit Fyn-Kinase phosphoryliertes SNAP-Y595 (Abb. 34B). Das Ergebnis zeigt, dass das ungesetzte und lichtentschützte Azidoprotein keine Affinität zu Fyn-SH2 zeigte, während das Kinasephosphorylierte SNAP-Y595 in hohem Maße Bindung an die SH2-Domäne zeigte. Dies legt den Schluss nahe, dass das entstehende, freie Phosphoramidat möglicherweise keine dem Phosphotyrosin vergleichbare Eigenschaften besitzt, oder dass das entstehende ungeschützte Phosphoramidat möglicherweise schnell hydrolysiert.

Um das Vorhandensein des freien Phosphoramidats nachzuweisen, wurde entschütztes CaM per MALDI-TOF untersucht (Abb. 35). Für die Untersuchung wurde erneut AzPhe-CaM gewählt, da bei diesem durch die deutliche Bandenverschiebung sowohl der Umsatz als auch die Entschützung qualitativ klar zu beobachten sind.

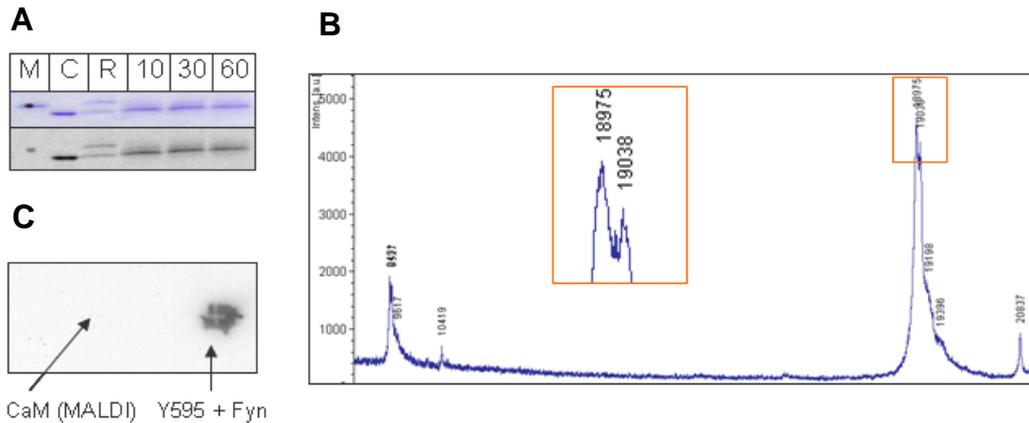


Abb. 35: Staudinger Phosphit Reaktion mit dem Caging-Phosphit an AzPhe-CaM zur massenspektrometrischen Analyse mittels MALDI-TOF A) Umsatz und Entschützung von CaM mit dem Caging-Phosphit. B) Ergebnis der MALDI-TOF Bestimmung der für 60 sek entschützten Probe, der Peakbereich ist als Ausschnitt vergrößert dargestellt. C) anti-pTyr DotBlot des im MALDI-TOF vermessenen Proteinansatzes im Vergleich zu Tyr-haltigen Fyn-phosphoryliertem Snap-595.

Die Staudinger-Reaktion verlief mit einem relativ geringen Umsatz (Abb. 35A) von etwa 25%, dennoch konnte durch die belichtungsabhängige Entschützung beobachtet werden. Im Anschluss wurde das Protein mit MALDI-TOF untersucht. Das spektrometrische Ergebnis zeigt zwei Produkte: eine Spezies mit einem Molekulargewicht von 18976 g/mol. Diese entspricht in etwa dem Edukt AzPhe-CaM ($M=18967$) sowie eine zweite, schwerere Spezies mit einem Molekulargewicht von 19039 g/mol (Abb. 35B). Die schwerere Spezies kommt dem freien Phosphoramidat mit 19036 g/mol sehr nahe. Im Bereich höherer Molekulargewichte konnten keine eindeutigen Produkte beobachtet werden, welche dem geschützten bzw. halbgeschützten Phosphoramidat entsprechen. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass bei der Methode des MALDI-TOF die Probe durch einen Laser in die Gasphase überführt wird, und noch vorhandene Schutzgruppen hier entfernt werden. Ebenso könnte durch die PEG-Gruppen das Flugverhalten des geschützten Proteins entscheidend verändert werden. Da allerdings im SDS-PAGE das Vorhandensein des geschützten Proteins nicht mehr zu beobachten ist, kann man von vollständiger Verseifung der Phosphoester ausgehen. Das entschützte Protein wurde ferner mittels Dot-Blot auf die Erkennung eines anti-Phosphotyrosin-Antikörpers untersucht (Abb. 35C), es konnte kein Antikörper-vermitteltes Signal detektiert werden. Als Positivkontrolle wurde durch Fyn-Kinase phosphoryliertes SNAP-Y595 aufgetragen, welches sich wie erwartet detektieren ließ. Bemerkenswert ist hierbei die Tatsache, dass bei der Durchführung eines Dot-Blot die Proteine direkt auf die PVDF-Membran aufgetragen werden, anstelle der für den Western-Blot notwendigen Auftrennung per SDS-PAGE und anschließenden elektrophoretischen Transfer. Vor diesem Hintergrund der nicht-erfolgten Detektion des modifizierten CaM ein

störender Einfluss der SDS-PAGE, wie beispielsweise durch die hohe Konzentration von 2-Mercaptoethanol im Probenpuffer, ausgeschlossen werden.

3.3.4. Umsatz von ADAP-Varianten an biologisch relevanten Stellen

Die Detektion von Phosphotyrosin und potentieller Mimetika mittels Phosphotyrosin spezifischer Antikörper muss jedoch nicht mit der Erkennung durch Phosphotyrosin-Bindungsdomänen, übereinstimmen. Einen guten Hinweis hierauf liefert die in der Einleitung erwähnte fehlende Bindung von pTyr eines sTyr-spezifischen Antikörpers. Da sich Phosphoramidate und Phosphate beispielsweise hinsichtlich ihrer pK_s -Werte und damit in ihren Protonierungszustand vermutlich unterscheiden, sollte ein möglicher nivellierender Einfluss der pH-Wertes auf die Phosphoprotein/SH2-Interaktion untersucht werden. Der mögliche Einfluss sollte am Beispiel von AzPhe-Snap-595 und der Interaktion mit RasaN-SH2 untersucht werden, wobei als direkt vergleichbare Positivkontrolle Fyn-phosphoryliertes, wildtypisches Snap-595 zur Verfügung stand (Abb. 36B).

Eine mögliche Interaktion wurde durch Inkubation des modifizierten AzPhe-Y595 unter zwei unterschiedlichen pH-Werten von 7,8 und 8,5 untersucht. Die Vorkontrolle mit nativ-phosphoryliertem Y595 und RasaN konnte eine phosphorylierungsabhängige Interaktion bei beiden pH-Werten belegen. Damit kann die Denaturierung beider Proteine bei pH 8,5 ausgeschlossen werden (Abb. 36A).

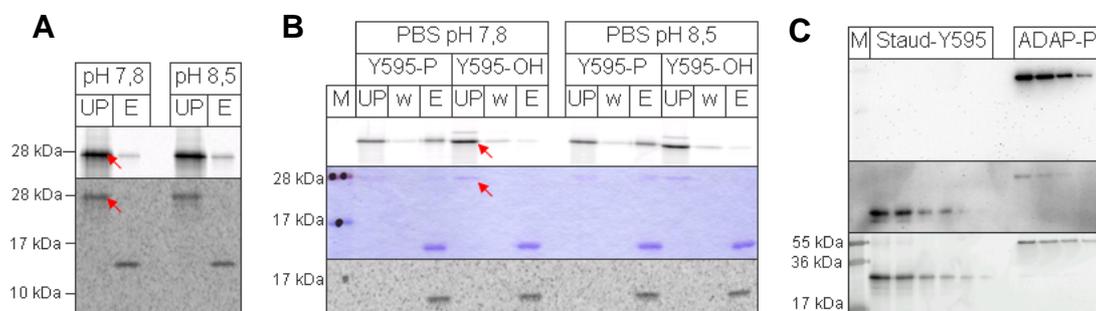


Abb. 36: Test der pH-Abhängigkeit der Staudinger-Reaktion (A) Staudinger-Y595 (B) Kontrollpull-down mit Y595(Fyn) bei pH 7,8 und 8,5 (C) WesternBlot / Pulldowns beide gegen RasaN. UP: Ungebundenes Protein im Bindungsüberstand, w: Waschfraktion, E: Freisetzung aller immobilisierten Proteine durch Aufkochen in SDS-Probenpuffer.

Eine unspezifische Erkennung des unphosphorylierten Y595 wurde nicht beobachtet, womit auch sichergestellt werden kann, dass die SH2-Domäne auch bei pH 8,5 aktiv ist. Im Falle des mit dem Phosphoramidat-modifizierten Y595 hingegen konnte unabhängig vom pH-Wert keine Interaktion beobachtet werden. Bei der Untersuchung des eingesetzten Az-Y595* per Western-Blot (Abb. 36C) konnte abermals kein Phosphotyrosin-abhängiges

Signal beobachtet werden. Das zur Kontrolle in deutlich geringeren Mengen aufgetragene phosphorylierte ADAP zeigte das erwartete Verhalten. Ein anschließender Blot gegen den in beiden Proteinen vorhandenen His-Tag konnte zeigen, dass allein die enzymkatalysierte Phosphorylierung in einer der Sensitivität der Methode angemessenen Auftragsmenge detektiert wird und dass das ortsspezifisch generierbare Phosphoramidat in Bezug der Anti-pTyr Antikörper basierten Erkennung nicht als pTyr Analog fungiert.

Um die erzielten Ergebnisse zu überprüfen, wurden die Modifizierung und Entschützung an Az-595 einer direkten parallelen Kontrolle mit Az-CaM unterzogen. Beide Proteine wurden über Nacht mit dem Caging-Phosphit umgesetzt. Um eine unspezifische Reaktion auszuschließen wurden Proben beider Proteine parallel in reinem Puffer inkubiert. Als Kontrolle der im Vorfeld beobachteten ausgeprägten Veränderung des Laufverhaltens im SDS-PAGE wurde CaM zusätzlich mit dem kommerziellen, farbstoffmarkierten Staudinger-Phosphin DyLight-650 umgesetzt. Um eine Änderung des Laufverhaltens von Az-595 durch die Staudinger-Reaktion besser zu beobachten, sollte der Snap-Tag erst nach der Entschützung markiert werden. Nach Abschluss der Reaktionen wurden diese zunächst durch SDS-PAGE untersucht (Abb. 37A). Aus der Abbildung lässt sich der Umsatz von CaM deutlich erkennen. Mit dem Staudinger-Phosphit (Bahn R2) wurde ein Großteil des Proteins markiert, was sich durch das Auftreten einer Hauptbande mit deutlich höherem Laufverhalten im Vergleich zur Kontrolle (Bahn C2) äußert. Ein ebensolches Verhalten lässt sich durch den Umsatz von CaM mit Dy-Light 649 beobachten, wobei durch Anregung des Gels bei 633 nm der selektiv angefügte Farbstoff nachweisen lässt. Die gleichförmige Verschiebung des Laufverhaltens von CaM durch die Reaktion beider Reagenzien entspricht nicht der Vergrößerung der Molekülmasse, sondern lässt sich eher durch eine Konformationsänderung des Proteins erklären, wodurch die Penetranz durch SDS-Moleküle verringert wird, und damit das Verhältnis zwischen Masse und Ladung. Im Fall des mit dem Caging-Phosphit umgesetzten Az-595 lässt sich eine leichte Erhöhung des scheinbaren Molekulargewichts (Bahn R1) im Vergleich zur Kontrollinkubation (C1) erkennen. Das Fehlen einer Doppelbande sowie in Bahn R1 kann als vollständiger Umsatz des Proteins mit dem Caging-Phosphit gewertet werden. Nach der erfolgten Staudinger-Phosphit-Reaktion, wurde die Verseifung der Schutzgruppen durch UV-Licht untersucht (Abb. 37B). Im Fall von CaM lässt sich nach einer Belichtung des modifizierten Proteins für 90 sec nur noch eine Proteinbande, welche ein dem unmodifizierten Protein ähnliches Laufverhalten aufweist.

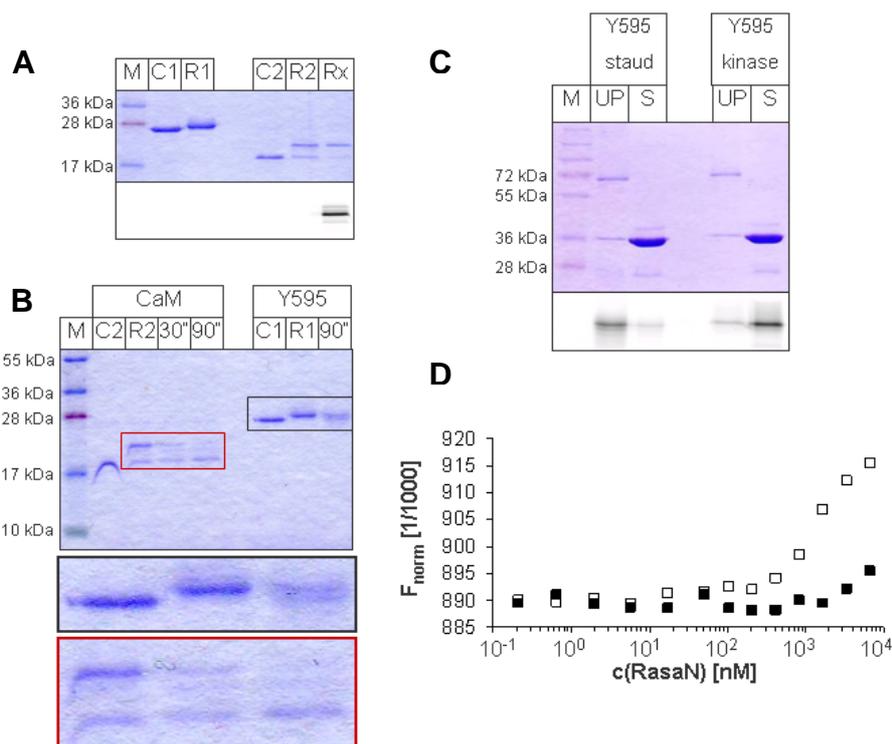


Abb. 37: A) Umsatz von AzPhe-CaM und AzPhe-595 mit dem Caging-Phosphit sowie für CaM auch mit DyLight-650-Phosphin. C=Kontrollinkubation ohne die P(III)-Verbindung, R: Staudinger Reaktion. 1, 2: Caging-Phosphit, x: DyLight-650. B) Entschützung von umgesetzten AzPhe-CaM und AzPhe-595 durch Belichtung für 30 und 90 s. Schwarzer Rahmen: Vergrößerung der AzPhe-595-Proben, Roter Rahmen: Vergrößerung der AzPhe-CaM-Proben. C). Pulldown mit entschütztem AzPhe-595 gegen GST-NCK1-SH2, Positivkontrolle: Fyn-phosphoryliertes Y595. UP: Bindungsüberstand, S: gebundenes Protein. D) MST-Messung mit entschütztem AzPhe-595 (schwarze Quadrate) und Fyn-phosphoryliertem Y595 (weiße Quadrate) gegen RasaN-SH2.

Oder mit anderen Worten, die sterische Beeinflussung der Schutzgruppen ist verschwunden. Interessanterweise lässt sich nach einer Belichtung von 30 sec ein Bandentriplet beobachten, wobei eine zusätzliche Bande zwischen dem Produkt der Staudinger-Phosphit-Reaktion sowie dem scheinbaren Edukt erscheint welche sich als einfach entschütztes Zwischenprodukt deuten lässt. Im Vergleich dazu sieht man beim umgesetzten Az-Y595 nach Belichtung für 90 sec die Bildung eines Bandendupletts. Da beide Banden in der Coomassie-Färbung in etwa gleich intensiv erscheinen, lässt dies einen Entschützungsgrad von 50% vermuten. Die Unvollständigkeit der Esterverseifung kann durch die größere Stoffmenge an Az-Y595 im Vergleich zu CaM erklärt werden. Die lichtinduzierte Entschützung ist eine (induzierte) Zerfallsreaktion, welche mit einer Kinetik nullter (0.) Ordnung abläuft. Demnach besteht lineare Abhängigkeit zwischen der Reaktionsdauer und Umsatz.

Es darf aber nicht vernachlässigt werden, dass der durch Verseifung entschützte Anteil an modifizierten Az-595 ausreichend zu betrachten ist um eine SH2-abhängige Bindung eingehen zu können, falls das freie Phosphoramidat diese Funktion besitzt. In Anbetracht

des Überschusses an NCK1-SH2 (Abb. 37C) muss die biologische Aktivität des durch Staudinger-Phosphit-Reaktion gebildeten Phosphoramidats als funktionelles Phosphotyrosin analog auf Proteinebene bezweifelt werden. Nicht gerade widerlegend wirkt zudem der in Abb. 37D gezeigte Versuch, die K_d des mit per Staudinger-Reaktion modifizierten Snap-595 mittels Microscale Thermophorese gegen RasaN zu bestimmen. Das parallel dazu betrachtete Fyn-phosphorylierte wildtypische Snap-595 zeigte eine eindeutige Bindungstendenz gegenüber RasaN, während diese für das durch Staudinger-Reaktion modifizierte Snap-595 ansatzweise zu beobachten ist. In der Tat lässt sich eine leichte Tendenz der Bindung des Phosphoramidats vermuten, diese dürfte aber mindestens 10-fach schwächer sein als die durch Phosphotyrosin erzielte Wechselwirkung. Das fehlende Vermögen, eine GST-markierte SH2-Domäne zu binden kann möglicherweise auf eine Labilität des Phosphoramidats gegenüber Thiolen zurückgeführt werden. Schließlich sind die zur GST-Immobilisierung nötigen Festphasenkügelchen mit Glutathion bestückt, und enthalten somit große Mengen an Thiolen. Vor dem Hintergrund der durch Glutathion erzeugten reduktiven Umgebung des Cytosols sollte diese Interpretationsmöglichkeit allerdings nicht als Artefakt beiseite geschoben werden.

Abschließend festzuhalten bleibt, dass die Staudinger-Phosphit-Reaktion mit einem lichtentschützbaren Phosphit sowie der lichtinduzierten Verseifung der Schutzgruppen beobachtet werden konnte. Ob dabei das entstehende ungeschützte arylische Phosphoramidat unter Bedingungen der Proteinbiochemie stabil bleibt und als Phosphotyrosin analog wirken kann, bleibt vorerst ungewiss.

4. Diskussion

Für eine bessere Übersicht folgt zunächst eine Kurzzusammenfassung wesentlicher für diese Bewertung relevanter Ergebnisse: In der vorliegenden Arbeit wurde am Beispiel von ADAP gezeigt, dass sich die Analyse der Interaktion zwischen einem tyrosinphosphorylierten Protein und SH2-Domänen durch den Einsatz zellfreier Proteinsynthese optimieren lässt und einen schnellen Zugriff auf qualitative und quantitative Interaktionsdaten liefert. Durch die Expressions-PCR (E-PCR) -basierte Synthese der SH2-Domänen in ortspezifisch biotinylierter Form für die direkte hochaffine Immobilisierung sowie die zellfreie Synthese des phosphorylierten Ligandenproteins ADAP als fluoreszenzmarkiertes Fusionsprotein gelang es, direkte Interaktionen in hochsensitiven Pulldowns schnell und sicher zu verifizieren, wie auch *de novo* zu bestimmen. Die geradlinige Erweiterung des Pulldowns zur Variante der Überstandsabreicherung erlaubte die Abschätzung von K_d -Werten für die beobachteten Interaktionen. Hierdurch konnte auch bestätigt werden, dass die in den sensitiven Pulldown-Experimenten erhaltenen Ergebnisse bereits semiquantitativer Natur waren. Die Fluoreszenzmarkierung des Phosphoproteins erlaubte zudem die Bestimmung von K_d -Werten in Lösung durch Microscale Thermophorese, wodurch sich ein umfassendes Bild der phosphorylierungsabhängigen Interaktionen von ADAP ergab. Durch Kombination der Ergebnisse der genannten Methoden konnte eine Bindungshierarchie aufgestellt werden. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass ADAP eine hochaffine Wechselwirkung mit Rasa1 ausbildet. Zur Erweiterung des Analysespektrums wurde die Substitution der Kinase-vermittelten Phosphorylierung durch eine chemoselektive Staudinger-Phosphit-Reaktion auf funktioneller Ebene untersucht.

Die Bewertung der Bausteine des hier entwickelten Systems, die zellfreie Proteinsynthese der Bindungspartnern für nachfolgende Analysen (Kapitel 3.1) und die Analyse der Phosphotyrosin-abhängigen Interaktionen von ADAP (Kapitel 3.2) werden im Folgenden zunächst für sich betrachtet. Im Anschluss wird deren Zusammenführung im gewählten Modellsystem hinsichtlich der geplanten Vereinfachung und Verbesserung gegenüber bestehenden Methoden und der Validität der Daten diskutiert (Kapitel 3.3).

4.1 Zellfreie Synthese von Bindungspartnern für nachfolgende Analysen

Der erste Schritt für die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen besteht in der Darstellung der zu untersuchenden Proteine in ausreichender Qualität und Quantität. Am Beispiel der Tyrosin-phosphorylierungsabhängigen Wechselwirkung

des menschlichen T-Zell Proteins ADAP wurde in dieser Arbeit veranschaulicht, dass die zellfreie Proteinsynthese diesen Zweck bestens erfüllt. Für die Interaktionsanalyse wurden sowohl ADAP als auch mehrere SH2-Domänen-haltige Interaktionspartner in aktiver Form synthetisiert. Dabei wurden neben den etwa 100 Aminosäurereste umfassenden, isolierten SH2-Domänen auch größere Abschnitte (wie von PIK3R1, Grap2 und Rasa1) bis hin zum Volllängenprotein BCAR3 mit über 800 AS synthetisiert. Ein maßgeblicher Vorteil in der zellfreien SH2-Proteinsynthese bezüglich des Arbeitsaufwands wurde durch die Auswahl und Generierung linearer Matrizen (sog. Linear Templates) auf Basis cDNA-abgeleiteter Plasmide erzielt. Dadurch ließen sich spezifische Proteine den Erfordernissen entsprechend schnell darstellen, ohne den Leserahmen aufwändig in einen Expressionsvektor klonieren und in Flüssigkulturen zu überexprimieren zu müssen.

Ein ebenfalls erheblicher Vorteil wurde durch die Wahl des ortsspezifischen Einbaus einer Biotineinheit über *amber* Suppression zur direkten Festphasenimmobilisierung erzielt. Die hierfür verwendete chemisch aminoacylierte Suppressor tRNA (Gerrits et al., 2007) erlaubte einen nahezu stöchiometrischen Einbau der modifizierten Aminosäure. Durch den hierbei generierten hohen Anteil an gewünschtem Syntheseprodukt und auf Grund der geringen Überschüsse an freiem Biotin im Reaktionsansatz konnte daher, im Gegensatz zu posttranslationalen Biotinylierungsmethoden, auf eine Aufreinigung verzichtet werden. Somit wurde das synthetisierte Protein in frischer Form der Analyse zugeführt, wodurch die Wahrscheinlichkeit seiner korrekten Faltung stark erhöht wurde. Deutlich wurde dies besonders am Beispiel des SH2-Domänenproteins BCAR3, welches trotz seiner beachtlichen Größe von ca. 90 kDa im vollständig löslichen Zustand synthetisiert wurde und dessen SH2-Domäne selektiv phosphoryliertes ADAP mit hoher Effizienz binden konnte. Zur Steigerung der Ausbeute der SH2-haltigen Proteine war es nachfolgend zwar notwendig, die Leserahmen – wie auch im Falle anderer Methoden – in einen Expressionsvektor zu klonieren. Der große Vorteil der hier gewählten Herangehensweise zeigte sich allerdings darin, dass die hierfür erforderliche Klonierungsarbeit auf Grund der Ermöglichung der vorangegangenen Untersuchungen, bei denen die Auswahl an Genen für weitere Analysen eingegrenzt werden konnte, erheblich minimiert wurde. Darüberhinaus konnten schon mit den nicht klonierten, Expressions-PCR-generierten SH2-Domänen neben qualitativen Bindungsanalysen auch erste quantitative Daten mittels der Pulldown-basierten Methode der Überstandsabreicherung gewonnen werden. Aus dieser quantitativen Analytik konnte bereits eine Bindungshierarchie von verschiedenen SH2-

Domänenproteinen zu ADAP abgeleitet werden, die später durch die die eigentliche Kd-Wertbestimmung mittels MST bestätigt wurde.

Neben den SH2-Domänenproteinen konnten auch die dazugehörigen Liganden zellfrei synthetisiert und selektiv *in vitro* durch zugesetzte Kinase phosphoryliert werden. Die Generierung von expressionsfähigen Linear Templates (Merk et al., 2003) erlaubte abermals einen schnellen Zugang zu funktionsfähigen Proteinen. Durch Expressions-PCR konnten verschiedene Leserahmen von ADAP, welche alle den C-terminalen Linkerbereich (570-690) zwischen den beiden SH3-Domänen umfassten, schnell und in löslicher Form exprimiert werden. Im Rahmen der Matrizengenerierung wurden Sequenzen kodierend für N- und C-terminale Reinigungstags eingeführt. Die erfolgreiche affinitätschromatographische Aufreinigung der einzelnen Varianten zeigte, dass beide Tags zugänglich waren und die jeweiligen Proteine keine Aggregate bildeten, wodurch eine Zugänglichkeit der Tags verhindert worden wäre. Diese Annahme wird durch die hohe Löslichkeit der Proteine während eines Ultrazentrifugationsschrittes unterstützt. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die synthetisierten Proteine die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Interaktion mit SH2-Domänen aufwiesen.

Eine Phosphorylierung durch rekombinant aufgereinigte Fynkinase war sowohl ko-translational als auch post-translational möglich, wobei das für die Proteinsynthese eingesetzte heterologe (*E. coli*-) System keine störenden endogenen Kinaseaktivitäten aufwies, was auch für die Synthese nicht-phosphorylierter Kontrollproteine wichtig war. Eine posttranslational unter CECF Bedingungen durchgeführte Inkubation mit der Kinase führte zu nahezu vollständig phosphoryliertem ADAP, belegt durch massenspektroskopische Analyse und dadurch, dass dieses quantitativ an NCK1-SH2 gebunden werden konnte. Während im Rahmen der zellulären Synthese und Phosphorylierung der Phosphorylierungsschritt auf Grund der stringenten Regulation der Kinasen (Schlessinger 2010) sowie der hohen Phosphataseaktivität (Tonks 2012) in der Regel unvollständig verläuft, ist die nachgewiesene nahezu vollständige Phosphorylierung von ADAP mit der hier gewählten Methode ein großer Vorteil, da die Aussagekraft der Messungen und deren Reproduzierbarkeit erhöht wird.

Des Weiteren konnten sämtliche generierten ADAP-Varianten durch Fusionierung an den Snap-Tag (Keppler et al., 2003, 2004) ortsspezifisch, quantitativ und sequenzunabhängig fluoreszenzmarkiert werden. Dabei wurde entgegen seiner ursprünglichen Entwicklung als Werkzeug zur *in vivo*-Visualisierung von Proteinen

der Snap-Tag hier zum ersten Mal als Analysewerkzeug erfolgreich zellfrei synthetisiert. Durch die einfach handhabbare Fluoreszenzmarkierung nach Zugabe des Farbstoffs zum Synthesansatz konnte die gewünschte Markierung nicht nur beschleunigt werden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Fluoreszenzmarkierung und Phosphorylierung parallel durchgeführt werden können und diese sich nicht gegenseitig beeinflussen.

Neben ADAP konnte zudem ein Peptidfragment des MT-Antigens als Snap-Fusionsprotein synthetisiert werden, welches als literaturbekannte Sequenz (Waksman, et al. 1992, Ladbury et al., 1995) der Validierung von Dissoziationskonstanten diene. Durch an die Synthese anschließende *in vitro* Phosphorylierung mit Fyn-Kinase konnte gezeigt werden, dass dieses im Rahmen der hier gewählten Methodik ebenfalls mit hoher Effizienz phosphoryliert werden kann. Insofern bietet diese Methode auch eine Alternative zur Darstellung von fluoreszenzmarkierten, kürzeren phosphorylierten Peptidmotiven, die sonst häufig durch chemische Festphasensynthese dargestellt werden.

4.2. Messung Phosphotyrosin-abhängiger Interaktionen von ADAP

Nachdem die Synthese funktionalisierter und funktionsfähiger Bindungspartner demonstriert wurde, wurde ein Analysesystem für Phosphoproteininteraktionen aufgebaut. Das Ergebnis stellt zunächst einen Arbeitsfluss dar, der auf der Beobachtung einer potenziellen Wechselwirkung auf Basis eines Pulldowns beruht. Durch Titration der im Pulldown verwendeten Festphase konnte der Arbeitsfluss später auf eine Überstandabreicherung (Pollard 2010) erweitert werden. Dieses Vorgehen erlaubte es, bereits in diesem Stadium der Untersuchungen die Dissoziationskonstanten (K_d) der untersuchten Interaktionen relativ zueinander abzuschätzen. Eine fundierte Bestimmung der K_d in Lösung erfolgte später durch MST. Demnach umfasst der hier gewählte Arbeitsfluss neben der als qualitativ zu betrachtenden Beobachtung des Bindungsereignisses über Pulldown auch die Generierung einer quantitativen Aussage über die Affinität der Interaktion. Hierbei konnten erste quantitative Aussagen bereits auf der Ebene Expressions-PCR-generierter Proteine gemacht werden, was eine beträchtliche Beschleunigung des Arbeitsflusses bedeutet.

Im Fall der Untersuchung möglicher Interaktionen von ADAP zeigten die Ergebnisse des Pulldowns auf, dass ADAP an die meisten der ausgewählten Proteine in einer phosphorylierungsabhängigen Weise band. Durch die Wahl der hohen, vom Snap-Tag vermittelten Sensitivität für den Nachweis von ADAP wurde es ermöglicht, unter minimiertem Materialverbrauch mit kleinen Proteinmengen und -konzentrationen

arbeiten zu können. Die Bindungsereignisse mit einem Immobilisierungsgrad zwischen 10 und 50% des hierfür eingesetzten ADAPs sind als hochspezifisch einzustufen. Darüber hinaus erlaubten die Pulldown-Experimente durch die Einstellung des nicht-sättigenden Konzentrationsbereichs sogar, quantitative Aussagen über die Stärke der Bindung zwischen ADAP und seinen Bindungspartnern zu treffen. Anhand der durchgeführten Dreifachbestimmungen konnte ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beobachtet werden. Darüber hinaus wurde für jede Einzelmessung ein frischer Ansatz des biotinylierten SH2-Interaktionspartners synthetisiert. Die hierbei immer noch beobachtete geringe Fehlerschwankung innerhalb der Pulldown-Untersuchungen deutet zusätzlich auf eine hohe Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse auch im Hinblick auf diesen Parameter hin.

Insgesamt konnten durch die Erweiterung des Pulldowns auf eine Überstandsabreicherung die Pulldown-Daten aus einem erweiterten Blickfeld bewertet werden. Dabei bewährte sich erneut die Fluoreszenzmarkierung des Phosphoproteins in den Experimenten zur Überstandsabreicherung, die analog zum Pulldown mit immobilisierten SH2-Domänen und in Lösung befindlichem ADAP durchgeführt wurden. Die Abschätzung der zugrundeliegenden K_d -Werte zeigte, dass alle drei untersuchten Interaktionen hohe Affinitäten aufweisen, welche im Bereich zwischen 60 nM (RasaN) und 300 nM (Fyn) lagen. Basierend auf den im Rahmen der Pulldown-Untersuchungen eingesetzten Konzentrationen der SH2-Domänenproteine wurde beobachtet, dass der Pulldown die Bindungskurve im Bereich unterhalb der K_d (Fyn) oder im Bereich der K_d (RasaN) traf. Dies bedeutet, dass der Pulldown unter den gewählten Bedingungen geeignet war, um semiquantitative Aussagen treffen zu können.

Nach der erfolgreichen Abschätzung über die Methode der Überstandsabreicherung wurden die K_d -Werte in Lösung mittels Microscale Thermophoresis (MST) bestimmt. Für die Durchführung der Messung war die Fluoreszenzmarkierung einer der beiden Interaktionspartner erforderlich. Hierfür wurde das bereits mit dem Snap-Tag markierte ADAP eingesetzt. Die experimentelle Durchführung lehnte sich dabei eng an die der Pulldown-Titration zur Überstandsabreicherung an, wodurch eine direkte Vergleichbarkeit der verschiedenen Methoden ermöglicht wurde. Die ermittelten K_d -Werte waren im Vergleich zur Pulldown-Titration (Überstandsabreicherung) etwa um den Faktor 3 größer (und damit die Bindung weniger affin), zeigten aber dieselbe Bindungshierarchie.

Die Unterschiede zwischen den über die verschiedenen Methoden (Pull-down-Titration und MST) ermittelten K_d -Werte sind sehr wahrscheinlich in der Systematik der Messmethode begründet und nicht in der Natur der Interaktion. Im Falle der Pull-down-Titration befanden sich die SH2-Domänen immobilisiert auf der Festphase, während sie im Rahmen der MST frei in Lösung vorlagen. Durch die Immobilisierung werden lokal höhere Konzentrationen erzeugt, welche die Bindung beeinflussen können, da Phosphotyrosin/SH2-Interaktionen dynamische Ergebnisse einer Summe schneller Bindungs- und Dissoziationseignisse sind (Liu et al., 2012). Darüber hinaus kann die Anwesenheit mehrerer Phosphorylierungsstellen in ADAP die festphasenbasierte Interaktion beeinflussen, besonders da die Phosphorylierungsstellen um Tyr595 und Tyr651 dasselbe Konsensusmotiv aufweisen. Im Falle zweier identischer Konsensusmotive (Tyr114, Tyr128) am N-Terminus von SLP-76 ist bekannt, dass deren Bindung an die Vav1-SH2-Domäne im doppelt phosphorylierten Zustand mit doppelter Affinität ($K_d \sim 500$ nM) und in einer 1:2 (SLP:Vav) Stöchiometrie im Vergleich zu den isolierten Motiven erfolgt ($K_d \sim 1$ μ M, Ksionda et al., 2012). Demnach kann bei der Bindung an eine Festphase nicht zwischen einer einfachen und einer mehrfachen Interaktion unterschieden werden. Hierdurch können wahrscheinlich die beobachteten Unterschiede zwischen den Messmethoden bezüglich der absolut gemessenen K_d -Werte gut erklärt werden. Es bleibt aber festzuhalten, dass beide Methoden dieselbe Bindungshierarchie ergaben.

Ladbury et al. konnten 1995 die K_d der Bindung des YEEI-Konsensusmotivs (MT-Antigen) an Src-SH2 im Bereich von 500 nM ermitteln. In diesem Bereich liegen auch die im Rahmen dieser Arbeit mittels MST ermittelten K_d -Werte dieser Interaktion, was die Validität der in dieser Arbeit gewonnenen MST-Werte unterstützt.

4.3. Eignung des gewählten Arbeitsflusses und des Modellsystems

Für eine Bewertung des Arbeitsflusses und der Eignung des gewählten Modellsystems für die Charakterisierung von Wechselwirkungen Tyrosinphosphorylierter Proteine mit ihren SH2-Bindungspartnern wird hier das Zusammenspiel der Teilschritte a) Synthese und enzymatische Phosphorylierung der Phosphotyrosin-Proteine sowie die Ermöglichung einer sensitiven Detektion dieser Proteine b) Synthese, Biotinylierung und Immobilisierung der SH2-Bindungspartner, c) Vorselektion relevanter Interaktionen durch Pull-down von Phosphoprotein und SH2-Bindungspartner und d) Interaktionsmessungen für die Bestimmung von Dissoziationskonstanten, die im Rahmen dieser Arbeit in dieser

Kombination erstmalig Anwendung finden, anhand des gewählten Modellsystems betrachtet.

Das erste Teilziel, eine Vereinfachung der Synthese der beteiligten Proteine herbeizuführen, wurde klar erreicht. Durch Anwendung einer PCR-basierten Matrizenherstellung konnte der Arbeitsfluss unter Umgehung aufwändiger Klonierungsarbeiten erheblich, auf etwa ein Zehntel der üblichen Arbeitszeit beim Einsatz neu generierter Expressionsvektoren, verkürzt werden. Gleichzeitig wurde mit dieser Methodik durch Einführung einer konstanten, kurzen Sequenz - kodierend für den N-Terminus der SH2-Domänenproteine -, eine Umgebung geschaffen, die einen späteren effektiven und vorhersagbar konstanten Einbau des Immobilisierungsankers Biotin in den SH2-Bindungspartner erlaubt. Des Weiteren wurde hierdurch eine Normalisierung der Syntheseleistung für diese SH2-Bindungspartner erzielt, welche sehr hilfreich und zum Teil sogar Voraussetzung für eine sinnvolle Vergleichbarkeit der erzielten Ergebnisse bei Bindungsstudien von Phosphoproteinen mit ihren SH2-Bindungspartnern ist. Dabei wurde gezeigt, dass die auf diese Weise limitierte Syntheseleistung absolut ausreichend für die Bindungsstudien auf der Ebene von Pulldown-Experimenten ist. Das hierfür verwendete zellfreie Proteinsynthesystem lieferte alle Voraussetzungen für die genannten Parameter und stellte selbst die Voraussetzung, um mit linearen, PCR-basierten Matrizen arbeiten zu können. Als offenes System erlaubte dieses darüber hinaus, die Phosphorylierung der Proteine ADAP und YEE1 durch simple Zugabe einer gereinigten Kinase zu realisieren. Als nicht lebendes System war es zu keiner Zeit von einer möglichen toxischen Wirkung ausgehend von der Überexpression der zu untersuchenden Proteine beeinflusst. Außerdem konnte durch die kontrolliert limitierte Synthese der Proteine für diese eine hohe Löslichkeit erzielt werden.

Hiermit waren die Voraussetzungen für das zweite Teilziel gegeben, auf sehr einfachem und schnellem Weg über *amber* Suppression den Immobilisierungsanker Biotin in stöchiometrischem Verhältnis in die SH2-Bindungspartner einzubauen. Dieser wurde erfolgreich realisiert und erlaubte, wie gewünscht, die SH2-Bindungspartner durch einen simplen Bindungsschritt an eine Matrix zu reinigen und gleichzeitig für spätere Pulldown-Untersuchungen zu immobilisieren.

Das Ziel, eine sensitive Detektion des Phosphoproteins zu ermöglichen, wurde durch die Bereitstellung dieser in Form von Fusionsprotein mit dem Snap-Tag realisiert. Es wurde auch gezeigt, dass sich dieser neutral in Bezug auf die Phosphorylierungsreaktion verhält. Die mit dem Snap-Tag verbundene hohe Nachweissensitivität, welche sogar die Sensitivität gängiger Markierungsansätze mit radioaktiv markierten Aminosäuren übersteigt, erlaubte eine ideale Einbindung in

den gesamten Arbeitsfluss. So wurde es ermöglicht, ökonomisch mit sehr geringen Materialverbrauch zu arbeiten und - viel wichtiger - kleine Proteinkonzentrationen detektieren zu können. Dadurch konnte verhindert werden, dass die Interaktionsmessungen in einem gesättigten Bereich der Bindung durchgeführt werden mussten. So konnte das weitere Teilziel, eine Vorselektion von relevanten Bindungsereignissen mit Hilfe von Pulldown-Studien vorzunehmen, vergleichsweise einfach und erfolgreich umgesetzt, werden, da auf weiterführende Analytik für den Nachweis der Bindung wie beispielsweise die Durchführung von Western Blot Analysen verzichtet werden konnte. Bedeutsamer in diesem Zusammenhang ist aber, dass hiermit die Möglichkeit geschaffen wurde, über die Methode der Überstandsabreicherung bereits in diesem Stadium der Untersuchungen, quantitative Daten der Wechselwirkung zwischen Phosphoprotein und SH2-Domänenprotein in Form von Dissoziationskonstanten gewonnen werden konnten. Das letzte Ziel, Dissoziationskonstanten unter optimalen Bedingungen, das heißt in Lösung, ohne Immobilisierung des SH2-Domänenproteins, mit Hilfe der Microscale Thermophorese (MST) bestimmen zu können, wurde ebenfalls sehr erfolgreich erreicht. Insgesamt wurde also das Hauptziel klar erreicht, durch eine neuartige Kombination bekannter Methoden einerseits eine erhebliche Beschleunigung und Vereinfachung der Gewinnung von Interaktionsdaten von Phosphotyrosin-Proteinen und ihren SH2-Bindungspartnern zu erzielen und andererseits die Möglichkeit für die Detektion neuer, bisher auf Grund bestehender Limitierungen der bislang verwendeten Methoden, nicht näher betrachteter Interaktionen zu eröffnen.

4.3.1. Bewertung der Bindungskonstanten

Die in dieser Arbeit mittels MST gemessenen Werte für Bindungskonstanten von YEEI zu SH2-Bindungsproteinen stimmen relativ gut mit Literaturwerten (Waksman et al. 1992; Jones et al., 2006) überein, wobei letztere anhand der Bindung von kurzen Festphasenpeptiden erstellt wurden. Damit ist gezeigt, dass die hier verwendete Methodik neben seiner deutlichen Vereinfachung auch eine gute Vergleichbarkeit zu anderen, bekannten Methoden liefert.

Im Folgenden werden die Messwerte diskutiert, die zur Interaktion von phosphoryliertem ADAP mit verschiedenen SH2-Bindungspartnern gewonnen wurden. Hierbei ist zu beachten, dass Vergleichswerte für Dissoziationskonstanten dieser Proteine mit ADAP aus der Literatur nicht zur Verfügung stehen, da diese Werte im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal aufgenommen wurden. Darüberhinaus ist zu berücksichtigen, dass die hier untersuchten Interaktionen *in vivo* nicht nur durch die in dieser Arbeit untersuchten Parameter beeinflusst werden,

sondern auch durch lokale Konzentrationen, Phosphorylierungsstatus und zeitliche Expressionsregulation. Dennoch können die in dieser Arbeit zum ersten Mal bestimmten Dissoziationskonstanten durchaus dazu beitragen, die physiologische Funktion der beteiligten Bindungspartner besser zu verstehen, zumal viele der hier analysierten Proteine zur gleichen Zeit in Zellen vorkommen (Jones et al., 2006, Lange et al., 2010). Für ein besseres Verständnis der Bindungsstudien von ADAP zu seinen SH2-Bindungspartnern wird hier zunächst noch einmal auf Vorarbeiten verwiesen, die dieser Arbeit zu Grunde lagen. Es war bekannt, dass phosphoryliertes ADAP *in vivo* mit SLP-76 (Musci et al., 1997), Fyn und Nck interagieren kann. Bei einem früheren Versuch, weitere Bindungspartner in T-Zellen durch SILAC-Markierung mit immobilisierten, phosphorylierten Festphasenpeptiden zu identifizieren, wurde zudem etwa ein Dutzend weiterer Proteine als mögliche Bindungspartner gefunden (Lange et al., 2010). Diese Studie bildete die Grundlage für die Auswahl der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proteine Rasa1, PIK3R1, Grap2 und SH2D1A. Ebenfalls in die Untersuchung aufgenommen wurden die oben erwähnten, bereits auf funktioneller Ebene genauer charakterisierten Interaktionspartner SLP-76, Fyn und Nck2. Weiterhin wurden die mit Fyn eng verwandten Proteine Lck und Src in die vorliegende Studie aufgenommen. Vervollständigt wurde der Satz durch Syk und Vav1 sowie das bisher wenig charakterisierte Protein BCAR3.

Anhand der Pulldown-Experimente in Kombination mit der Methode der Überstandsabreicherung einerseits und der Messungen über Microscale Thermophorese andererseits konnten erstmalig Dissoziationskonstanten (K_d -Werte) von ADAP mit seinen SH2-Bindungspartnern gemessen werden. Für beide Methoden konnte jeweils eine klare Bindungshierarchie ermittelt werden. Diese stimmt bei beiden Methoden überein, was als gegenseitige Bestätigung gewertet werden kann, mit Rasa1 als stärkstem Binder, gefolgt von SLP-76 und Fyn.

Es zeigte sich zudem, dass neben Rasa1 auch PIK3R1 und BCAR3 sehr starke und spezifische Affinitäten gegenüber phosphoryliertem ADAP aufweisen, während diese im Fall von Grap2, SH2D1A und Vav1 sehr gering bis vernachlässigbar waren. In Ermangelung an Vergleichsdaten aus der Literatur wird die Plausibilität der gewonnenen Daten diskutiert. Für Vav1 ist bekannt, dass dieses, vermittelt über die Bindung an SLP-76 (Raab et al., 1997), indirekt in einem Komplex mit ADAP interagiert. Da diese Vermittlung hier nicht vorliegt, ist die gemessene, äußerst schwache Bindung von Vav1 an ADAP folgerichtig. Dagegen war für SH2D1A auf Grund von vorangegangenen Untersuchungen (Lange et al., 2010) durchaus eine signifikante Bindung an ADAP erwartet worden, auch wenn damals keine

quantitative Analytik der Affinitäten durchgeführt wurden. Auf Grund des im Vergleich zu Vav1 ähnlichen Musters der Bindungsstärke von SH2D1A an phosphoryliertes sowie nicht phosphoryliertes ADAP könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass für SH2D1A ein ähnlicher indirekter, hier nicht greifender Bindungsmechanismus vorliegen könnte.

Die hohe Affinität von BCAR3 war nicht erwartet, da es als ubiquitär exprimierter GTP-Austauschfaktor eine zu Vav1 vergleichbare Funktion aufweist und daher in erster Näherung eine ähnlich schwache Bindung an ADAP wie im Fall von Vav1 vermutet werden konnte. Die Beobachtung der starken Bindung könnte darauf hindeuten, dass BCAR3 im Gegensatz zu Vav1 direkt an ADAP binden kann.

Die unerwartet starke und spezifische Bindung von Rasa1 an ADAP wird im Folgenden näher betrachtet. Sowohl die Abschätzung der K_d -Werte durch Überstandsabreicherung, als auch die K_d -Bestimmung durch MST konnten belegen, dass Rasa1 durch seine N-terminale SH2-Domäne ADAP mit sehr hoher Affinität bindet. Diese ist sowohl höher als alle weiteren in dieser Studie gemessenen Interaktionen als auch allgemein sehr hoch im Vergleich zu bislang bekannten K_d -Werten für SH2-vermittelte Interaktionen. Da diese Interaktion von ADAP verglichen zu SLP-76 (Wang et al., 2009) oder Fyn eine merklich höhere Affinität aufweist, ist es nicht unwahrscheinlich, dass diese von bedeutender physiologischer Relevanz ist.

Über die Rolle dieser Interaktion lässt sich mutmaßen. Rasa1 ist ein großes 1047 Aminosäurereste umfassendes Protein, dessen C-Terminus eine RasGTPase Domäne aufweist. Damit erfüllt Rasa1 die Funktion, das bedeutsame Regulations-G-Protein Ras zu inaktivieren. Neben der RasGAP-Domäne enthält Rasa1 eine Reihe regulatorischer Bindungsdomänen in der Anordnung: SH2-N, SH3, SH2-C, PH, C2. Generell gilt die Auffassung, dass die Domänen von der RasGTPase-Aktivität unabhängige Interaktionen ausüben (Pamonsinlapatham et al., 2009). Allerdings konnten Bryant et al. 1996 zeigen, dass in Anwesenheit des SH2/SH3 Domänenblocks in Rasa1 die Aktivität der RasGTPase Domäne deutlich stärker ist als in ihrer isolierten Form. Interessanterweise konnte auch die Aktivität anderer RasGTPase Domänen in Form von Fusionsproteinen durch den SH2/SH3-Block in Rasa1 verstärkt werden, was sich auch auf unterstützende Wirkung der Domänen zurückführen lässt.

Für die beiden SH2-Domänen wurden Interaktionen mit Rezeptortyrosinkinasen wie EGFR und IGFR belegt. Dasselbe gilt für die Adapterproteine Dok-1 und Dok-2, den Transkriptionsfaktor Socs3 sowie die RhoGTPase RhoGAP (Pamonsinlapatham et al., 2009). Implizit deuten nicht nur die Interaktionen mit Ras und Rho, sondern auch

die mit EGFR auf eine wichtige regulierende Funktion von Rasa1 im Rahmen des Zellwachstums hin. Wenn man sich vor Augen hält, dass die Interaktionen von Rasa1 zu Phosphorylierungsmotiven des EGFR in einem Affinitätsbereich zwischen 400 und 1400 nM liegen (Jones et al., 2006), deutet sich an, dass die hier nachgewiesene deutlich stärkere Interaktion zwischen Rasa1 und ADAP von Bedeutung sein kann.

Anhand dieser Erkenntnisse zeigt sich, dass die im Rahmen dieser Arbeit angestrebte Optimierung der Analyse phosphorylierungsabhängiger Protein-Protein Wechselwirkungen sehr erfolgreich umgesetzt werden konnte. Es stellte sich außerdem heraus, dass die Markierung des phosphorylierten Liganden im Vergleich zu der des SH2-Bindungspartners die bessere Wahl ist. Dies gründet sich aus der Tatsache, dass die Affinität des Liganden relativ zur Bindungsdomäne (Analyt) ermittelt wurde. Die absolute Quantifizierung ist abhängig von der Fähigkeit, die Proteinkonzentration des Analyten zu bestimmen. Die Affinität der SH2-Domäne in der Funktion des Analyten ist vom Modifikationsgrad des Liganden abhängig, die Affinität des Liganden zur SH2-Domäne hingegen nicht. Wäre die SH2-Domäne fluoreszenzmarkiert worden, wäre die Quantifizierung sowohl von der Konzentration des Liganden als auch von dessen Phosphorylierungsgrad abhängig gewesen.

4.4. Eignung der Staudinger-Phosphit-Reaktion für die chemoselektive Tyrosin-Phosphorylierung

Anhand der oben angestellten Überlegungen wird auch die Bedeutung einer ortspezifischen Phosphorylierung deutlich, da hierdurch die Affinitätsmessungen einerseits unabhängig vom Phosphorylierungsgrad des zu untersuchenden Proteins werden und andererseits eine gezielte Untersuchung der Bedeutung einer isolierten Phosphorylierungsstelle innerhalb mehrfach phosphorylierter Proteine ermöglicht wird. Für eine solche ortspezifische Phosphorylierung kommen prinzipiell zwei Herangehensweisen in Betracht. Zum einen ist der Einbau von Phosphotyrosin über *amber* Suppression mit Hilfe einer Aminoacyl-tRNA-Synthetase, welche eine entsprechende Spezifität aufweist, wünschenswert, jedoch bisher von niemandem in der Praxis erfolgreich umgesetzt worden. Zum anderen ist die chemische Umsetzung von modifizierten Aminosäuren, welche bereits über *amber* Suppression eingebaut werden können, zu Phosphat- bzw. Phosphat-ähnlichen Gruppen Gegenstand der Forschung. Zu letzterem folgt anschließend die Diskussion der hier gewählten chemischen Umsetzung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die biologische Wirksamkeit eines auf rein chemischem Weg eingeführten Phosphoramidats als Phosphotyrosin-Analogon auf Proteinniveau untersucht. Ein über *amber*-Suppression in das Protein eingeführtes p-Azidophenylalanin konnte erfolgreich zunächst über eine chemoselektive Staudinger Reaktion in eine Vorstufe - ein Schutzgruppen-enthaltendes Phosphit - und anschließend durch dessen lichtinduzierte Entschützung in das gewünschte Phosphoramidat umgewandelt werden. Dieses Vorgehen wurde somit zum ersten Mal erfolgreich von einem Modellprotein (Serwa et al., 2009) auf ein anderes Protein übertragen. Die korrekte Umsetzung zum Endprodukt konnte auf zwei Ebenen eindeutig bestätigt werden. Zum einen wurde der Einbau der unnatürlichen Aminosäure und ihre chemische Umsetzung über ein verändertes gelelektrophoretisches Laufverhalten und zusätzlich die lichtinduzierte Entschützung durch eine weitere Veränderung des Laufverhaltens nachgewiesen. Zum anderen konnte der klare Beweis für die korrekte Bildung des modifizierten Proteins über MALDI-Massenspektrometrie erbracht werden.

Eine Prüfung, ob ein früher gezeigter schwacher Nachweis eines Phosphoramidat-Proteins im Western Blot mit Hilfe eines gängigen Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers (Serwa et al., 2009) auch mit dem hier verwendeten Protein möglich ist, zeigte, dass die Sensitivität des Detektionssystems, vermutlich auf Grund einer nur schwachen Bindung des Antikörpers an das Phosphat-Analogon, hierfür nicht ausreicht. Daher wird es als sehr wahrscheinlich eingestuft, dass diese Nachweismethode für Phosphoramidat-Proteine in der Breite nicht geeignet ist.

Obwohl schon einmal Hinweise für eine Bindung eines Phosphoramidat-modifizierten Festphasenpeptids an ein SH2-Domänenprotein gefunden wurden (unveröffentlichte Daten, Krause & Hackenberger, FMP Berlin), konnte eine Bindungsfähigkeit des Phosphoramidats trotz der sehr erfolgreichen Darstellung des Proteins, mehrfacher Untersuchung von Bindungsereignissen sowohl in Form von Phosphoramidat-modifiziertem ADAP als auch von Snap-595 und auch unter Einsatz unterschiedlicher SH2-Domänenproteine sowie in Kombination mit verschiedenen Immobilisierungsstrategien nicht beobachtet werden.

Es lagen Hinweise auf eine mögliche pH-Abhängigkeit der Bindereaktion anhand der Untersuchung ähnlicher Modifikationen, in Form von unterschiedlich substituierten Phosponaten als Phosphotyrosinersatz vor (Burke et al., 1994). Das dort eingesetzte difluorosubstituierte Phosponat (F_2Pmp) wies eine mit Phosphotyrosin vergleichbare Bindungsfähigkeit an SH2-Proteine auf, welche im Fall des unsubstituierten Phosponats (Pmp) deutlich geringer ausfiel. Versuche, durch Deprotonierung von Pmp eine dem F_2Pmp ähnliche Wirkung zu erzeugen, zeigten

für diesen Fall, dass dessen Funktionalität pH-unabhängig war und eher auf der Imitation polarer Wechselwirkungen der freien Elektronenpaare des veresterten Sauerstoffs durch die Fluorsubstituenten beruht (Chen et al., 1995). Jedoch war mit dieser Information nicht geklärt, ob sich in der hierzu unterschiedlichen chemischen Umgebung des Phosphoramidats eine Deprotonierung positiv auf eine Bindung von SH2-Protein auswirken könnte. Um auszuschließen, dass in den hier gewählten Bindungsexperimenten eine pH-Abhängigkeit vorliegt, wurde diese zusätzlich untersucht, jedoch keinerlei Hinweis auf eine solche Abhängigkeit gefunden. Dieses Ergebnis unterstützt somit eher die oben genannte Hypothese der polaren Wechselwirkung der Fluorsubstituenten.

Die Eigenschaften des chemoselektiv generierbaren Phosphoramidats lassen sich mit denen der als Phosphotyrosinersatz geltenden Aminosäuren p-Carboxymethylphenylalanin (Tong et al., 1998) und p-Sulfotyrosin (Ju et al., 2013) vergleichen. Beide vermitteln eine, wenn auch schwache Bindungsfähigkeit zu SH2-Domänen. Es überrascht nicht, dass p-Carboxymethylphenylalanin in der Röntgenkristallstruktur ein vergleichbares Koordinationsverhalten wie Phosphotyrosin aufweist, da die Ausbildung einer Interaktion bei den für die Kristallisation notwendigen hohen Konzentrationen begünstigt ist. Andererseits lagen in diesen Untersuchungen die mit den Analoga bestückten Peptide und Proteine in Lösung vor. Wie bei der Betrachtung der K_d -Bestimmung durch Pulldown-Titration im Vergleich zu MST festgestellt wurde, erzeugt die Immobilisierung an feste Phasen lokal hohe Konzentrationen (Ladbury et al., 1995), welche einen kooperativen Effekt auf die Protein-Protein Wechselwirkung haben können. Somit könnte das über die Staudinger-Phosphit-Reaktion gebildete Phosphoramidat in Kombination mit alternativen Immobilisierungsstrategien möglicherweise als Phosphotyrosinersatz nutzbar gemacht werden. Als generelles Analogon für Phosphotyrosin, beispielsweise für die Betrachtung von Interaktionen in Lösung, eignet es sich jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit ohne chemische Veränderung der Phosphoramidat-Struktur im Sinne der oben genannten polaren Wechselwirkung trotz der erfolgreichen Darstellung der Phosphoramidat-Proteine im Rahmen dieser Arbeit nicht.

5. Ausblick

Das etablierte Detektionssystem hat sich sowohl zur Validierung, als auch zur *de novo* Detektion direkter Protein-Protein-Interaktionen als gut geeignet erwiesen.

In Bezug auf die Wirksamkeit der chemoselektiven Phosphorylierung durch die Staudinger-Phosphit-Reaktion lassen sich ebenfalls noch weitere Testmöglichkeiten formulieren. Ein lohnendes Ziel ist es, die Bindung des auf Festphasenpeptidebene eingeführten Phosphoramidat im Komplex mit einer SH2-Domäne durch Röntgenkristallographie zu untersuchen. Dies könnte im analogen Vergleich zu Carboxyphenylmethylalanin (cmF) geschehen, wodurch die Koordination in der Phosphotyrosyl-Bindungstasche wertvolle Hinweise liefern könnte. Ebenfalls könnte es im Hinblick einer besseren und verträglicheren Entschützung förderlich sein, beispielsweise Estergruppen, welche durch Esterase gespalten werden könnten sowie der Vergleich der Festphasenimmobilisierung der Phosphoramidate und deren Verhalten in Lösung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass sich die Tyrosin-Phosphorylierungs-abhängige Interaktion mit SH2-Domänen durch Kombination von zellfreier Proteinsynthese, ortsspezifischer Fluoreszenzmarkierung als auch Biotinylierung und Microscale Thermophorese maßgeblich erweitert werden konnte. Hierzu zählen hochsensitive Pulldowns, die passenden Konzentrationsbereich bereits semiquantitative Aussagen liefern. Durch Erweiterung der Pulldown-Methodik um den Ansatz der Überstandsabreicherung lassen sich bereits auf Festphasenimmobilisierung basierende K_d -Werte ermitteln. Diese können durch den Einsatz desselben fluoreszenzmarkierten Phosphoproteins durch Microscale Thermophorese in Lösung überprüft werden. Die bezüglich ADAP gewonnenen Ergebnisse lassen sich problemlos durch Verwendung größerer Sequenzabschnitte erweitern. Hierzu zählt nicht nur der in dieser Arbeit bei Glu486 beginnende C-Terminale Bereich, eine lohnende Erweiterung des Sequenzabschnittes umfasst neben Tyr 462, das durch sein YEDI-Konsensus-Motiv als potentielle Ligand für die SH2-Domänen von Fyn und Lck dienen könnte., besonders in Hinblick auf dessen schnelle Phosphorylierung, die bei der Ko-Expression von ADAP und Fyn in Jurkat T-Zellen beobachtet wurde (Kuropka et al., 2013).

Ebenso stellt die als hochaffin ermittelte Bindung zwischen ADAP und Rasa1 im zellulären Kontext einen interessanten Anhaltspunkt auf die Funktion von ADAP in T-Zellen dar, welcher eine weitere Überprüfung im physiologischen Kontext etwa durch Ko-Immunopräzipitation rechtfertigt. Ebenso können verschiedene ADAP-Populationen exprimiert oder mikroinjiziert werden, welche sich durch Snap-Fusion mit unterschiedlichen Farbstoffen Fluoreszenzmarkieren lassen, da diese kommerziell erhältlich sind. Hierfür

könnte beispielsweise der von Medieros et al. 2007 beobachtete Sachverhalt überprüft werden, wodurch die Interaktion von ADAP mit SKAP55 zwei unterschiedliche ADAP-Populationen entstehen, wobei freies ADAP vornehmlich zur Interaktion mit Carma1 bereitgestellt wird. Man könnte die SKAP55-Bindungsstelle entfernen, das entsprechende Protein mit einem roten Snap-Farbstoff markieren, während das SKAP55-Bindungsstellenhaltige Protein blau markiert wird und beide per Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden können. Dies wären experimentelle Vorschläge, die sich umgehend umsetzen lassen könnten. Man kann es angehen.

6. Kurzzusammenfassung

Die Regulation zellulärer Vorgänge wird maßgeblich durch die Ausbildung von Proteininteraktionsnetzwerken gesteuert. Während deren Ausbildung von vielen Faktoren beeinflusst wird, besteht deren Grundeinheit in der bimolekularen Interaktion zweier Proteine. In eukaryotischen Zellen ist dabei besonders die Bindung tyrosinphosphorylierter Proteine durch SH2-Domänen von fundamentaler Bedeutung (für die Signaltransduktion). Die direkte Untersuchung solcher Wechselwirkungen bildet die Grundlage für das detaillierte Verständnis zellulärer Vorgänge. Von besonderem Interesse ist dabei die Bestimmung der Bindungsaffinität, welche die Vorhersage von Bindungshierarchien erleichtert. Bisher war es aber sehr schwer, die Bindungsaffinität Phosphotyrosin-abhängiger Wechselwirkungen in Form der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (K_d) auf Proteinebene zu bestimmen.

In der vorliegenden Arbeit wurde am Beispiel des menschlichen T-Zell Proteins ADAP gezeigt, dass sich die Untersuchung Phosphotyrosin-abhängiger Protein-Protein-Wechselwirkungen durch die Kombination zellfreier Proteinsynthese mit ortsspezifischer Markierung verbessern und beschleunigen lässt. Dabei wurde demonstriert, dass sich eine den Erfordernissen gerechte Auswahl an biotinylierten SH2-Domänen durch zellfreie Proteinsynthese schnell und funktional darstellen lässt. Nach zellfreier Synthese, ortsspezifischer Fluoreszenzmarkierung und *in vitro* Phosphorylierung von ADAP gelang es, durch Kombination sensitiver Pulldowns, Überstandsabreicherung und Microscale Thermophorese (MST) unbekannte Bindungen zu identifizieren, bekannte Bindungen zu bestätigen und in Form von K_d -Werten zu quantifizieren.

Für die im Vorfeld vorhergesagte Interaktion zu Rasa1 konnte dabei eine bemerkenswert hohe Affinität mit einer K_d von etwa 100 nM bestimmt werden, während die Interaktion des ebenfalls als Bindungspartner vorhergesagten SH2D1A mit einer K_d von etwa 5 μ M als vernachlässigbar einzustufen ist. Die Quantifizierung der Interaktionen ergab das Rahmenwerk einer Bindungshierarchie, derzufolge ADAP an Rasa1 am stärksten bindet, gefolgt von den bekannten Interaktionspartnern SLP-76 und Fyn, während SH2D1A den Grenzbereich zu unspezifischen Bindungen markiert. Zusammenfassend wird gezeigt, dass sich durch den im Rahmen dieser Arbeit etablierten Arbeitsfluss direkte Wechselwirkungen bestätigen und zu Bindungshierarchien bezüglich des zu untersuchenden Proteins erweitern lassen.

Des Weiteren wurde die Eignung der Staudinger-Phosphit-Reaktion, welche die ortsspezifische Generierung von Phosphoramidaten an in Proteinen eingebautes p-Azido-L-Phenylalanin ermöglicht, als Ersatz für die Phosphorylierung durch Kinasen untersucht. Die Bildung des ungeschützten Phosphoramidats wurde auf Proteinebene nachgewiesen. Eine Wechselwirkung der modifizierten Proteine mit SH2-Domänen wurde aber anhand der im Arbeitsfluss optimierten Methoden nicht beobachtet.

7. Summary

The regulation of cellular processes is controlled by the formation of protein interaction networks. While their assembly depends on many factors, the essential event of network formation is the bimolecular interaction between two proteins. In Eukaryotic cells, the interaction between tyrosine phosphorylated proteins and SH2 domains is of major importance for signal transduction. The direct analysis of such interactions constitutes a corner stone for the detailed interpretation of cellular processes. Thereby, the determination of binding affinities is especially beneficial, as it allows the prediction of binding hierarchies. To this point, however, it was practically impossible to determine the affinity of phosphotyrosine dependent interactions on a protein level in the form of equilibrium rate dissociation constants (K_d).

Using the example of the human T-cell protein ADAP, this work demonstrates that the analysis of phosphotyrosine dependent protein-protein interactions can be improved and accelerated on the basis of cell-free protein synthesis. Cell-free protein synthesis allowed the rapid synthesis of site-specifically biotinylated SH2 domains that meet the requirement of the selection. After cell-free synthesis, site-specific fluorescence labelling and *in vitro* phosphorylation of ADAP, the combination of sensitive pull-downs, supernatant depletion and microscale thermophoresis (MST) enabled an identification of interactions *de novo*, a confirmation of known interactions and their quantification in the form of K_d values.

Thereby, the previously predicted interaction between ADAP and Rasa1 shows a remarkably high affinity with a K_d in the range of 100 nM, while the equally predicted interaction to SH2D1A can be rated as negligible, since a K_d in the range of only $\sim 5 \mu\text{M}$ was measured. The affinity quantification yielded the framework of a binding hierarchy with Rasa1 as the strongest binder, followed by ADAPs known interaction partners SLP-76 and Fyn, while SH2D1A marks a threshold range towards non-specificity. In summary, the workflow established in this study allows the identification and verification of direct protein-protein interactions and the establishment of binding hierarchies.

Furthermore, the Staudinger-Phosphite Reaction, which enables the site-directed formation of phosphoramidates within proteins containing p-Azido-L-phenylalanine, was tested on its applicability to replace a kinase-mediated natural tyrosine phosphorylation. The formation of the deprotected phosphoramidate could be detected. However, no interaction of the modified proteins towards SH2 domains could be observed by means of the methods optimized in the established workflow.

8. Material und Methoden

8.1. Materialien

8.1.1. Chemikalien

Sämtliche gängigen Chemikalien wurden von in der Regel von Carl Roth, Fluka, Merck oder Bachem bezogen.

8.1.1.1. Radiochemikalien

¹⁴ C-Leucin	GE Healthcare
------------------------	---------------

8.1.1.2. Farbstoffe

SNAP-Surface® 647	NEB
DyLight 650 (Phosphin)	ThermoFisher

8.1.1.3. Marker, Proteine und Enzyme

DNA Mengenstandard 1kb Plus DNA ladder	Invitrogen
DNA Längenstandard 2-log (0,1-10 kb)	NEB
Hotstar HiFidelity Polymerase	Qiagen
PageRuler Protein-MWstandard (10-230 kD)	Fermentas
Restriktionsendonukleasen	NEB

8.1.2. Verwendete Kits

DyeEx™ 2.0 Spin Kit	Qiagen
EasyXpress™ Linear Template Kit	Qiagen
EasyXpress™ Protein Synthesis Kit	Qiagen
EasyXpress™ Site-Specific Biotin Labeling Lit	Qiagen
RTS 500 E. coli HY Kit	5PRIME
DNA Gel Extraction Kit	Qiagen
Hi-Pure PCR purification kit	Roche
JET-Star Plasmid Prep Kit (Mini, Midi)	Genomed

8.1.3. Zusammensetzung allgemein gängiger Puffer

10×PBS:	100 mM	KHPO ₄
	20 mM	Na ₂ HPO ₄
	1380 mM	NaCl
	pH 7,4	

(bezogen von Carl Roth)

10× TLM-150:	500 mM	HEPES
	1000 mM	KOAc
	500 mM	NaOAc
	100 mM	MgCl ₂
	1 mM	EDTA
	0,01% (w/v)	NaN ₃
	pH 7,6	
10× HBS:	500 mM	HEPES
	1500 mM	NaCl
	pH 7,6	
10× TBS:	500 mM	Tris/HCl pH 7,5
	1,5 M	NaCl
1× TBST:	1× TBS mit 0,05% (v/v) Tween-20	

8.1.4. Spezielle Geräte

Typhoon 8600 (Molecular Dynamics, GE Healthcare): Phosphoimager zur Fluoreszenzdetektion und filmlosen Autoradiographie.

TriCarb 2900 TR (Packard): Szintillationszähler zur Konzentrationsbestimmung radionuklidmarkierter Proteine.

Ultrazentrifuge: Optima LE-80K (Beckman Coulter).

Monolith NT.115 (Nanotemper): Messgerät zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten durch Microscale Thermophorese.

uv-Pulslaser (Spectron): Eigenschaft der Laserpulse: Wellenlänge 355 nm, Pulsfrequenz: 10 Hz, Pulsdauer: 10ns, Pulsenergie: 50 nJ.

8.1.5. Verwendete Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden in Auftrags synthese durch die Firmen iba (Göttigen, Deutschland) und Purimex (Gebenstein, Deutschland)

dargestellt. Es wurden standardmäßig Ansätze im 50 nmol Maßstab mit zweifacher HPLC-Reinigung im lyophilisierten Zustand bezogen. Die erhaltenen Oligonukleotide wurden in H₂O bidest gelöst bei einer Konzentration von 100 µM bei -20°C gelagert.

8.1.5.1. Oligonukleotide zur Generierung von Linear Templates für ADAP

Zur Generierung der Linear Templates von ADAP wurden die folgend aufgeführten Oligonukleotide verwendet (Tabelle 3). Hierbei dienten die Oligonukleotide PM_001 bis PM_005 der Vervielfältigung von ADAP unter Erhalt der PCR-Produkte der ersten Stufe. Die Amplifikation der zweiten PCR-Stufe erfolgte durch die Oligonukleotide N-S(II) und C-His des Linear Template Generation Kit (Qiagen) unter Erhalt der expressionsfähigen Linear Templates. Die Hybridisierungsbereiche bei der Oligonukleotidstufen sind fett unterlegt.

Tabelle 3: Oligonukleotide zur Generierung linearer Matrizen von ADAP

Oligonukleotid	Sequenz
PM_001	5'-aaaagcgcctgaaaacctgatcgaaggccgtgactatgattcttgaaactg-3'
PM_002	5'-tggtgatggtggtgaccccaattttctgcttttttagcttc-3'
PM_003	5'-aaaagcgcctgaaaacctgatcgaaggccgtgagaaaaaggaacagaaagag-3'
PM_004	5'-tggtgatggtggtgaccccaagtcattgtcatagatgcagc-3'
PM_005	5'-tggtgatggtggtgaccccaatagatctctccatcattgc-3'
N-S(II)	5'-atgatatctcgagcggccgctagctaatacgcactcactataggagaccacaacggttccc tctagaaataattttgtaacttaagaaggagataaacaATGtggtctcatccgaattcgaaaaa agcgcgtaaaaacctgatcgaaggccgt-3'
c-His	5'-atgatatcaccggtgaattcggatccaaaaaacccctcaagaccgtttagagccccaagggg tacagatcttggttagttagttattAATGATggtgatggtggtgacccca-3'

Die Generierung der PCR-Produkte der ersten Stufe der ADAP-Varianten A-F erfolgte durch die in Tabelle 4 aufgelistete Kombination der Oligonukleotide zur PCR.

Tabelle 4: Kombination der Oligonukleotide erster Stufe zur Amplifikation der ADAP-Varianten A-F

ADAP-Variante	Sequenzbereich	5'-Oligo	3'-Oligo
ADAP-A	570-690	PM_001	PM_002
ADAP-B	486-783	PM_003	PM_004
ADAP-C	486-771	PM_003	PM_005
ADAP-D	486-690	PM_003	PM_002
ADAP-E	570-783	PM_001	PM_004
ADAP-F	570-771	PM_001	PM_005

Zur Subklonierung der ADAP-Linear Templates wurden diese mit den Restriktionsendonukleasen XhoI (5'-Ende) und BamHI (3'-Ende) verdaut und in den gleichermaßen

verdauten Leervektor pIX3.0 kloniert. Die Schnittstellen (XhoI: 5'-ctcgag-3') und BamHI (5'-ggatcc-3') sind in obiger Tabelle unterstrichen und kursiv hervorgehoben.

8.1.5.2. Oligonukleotide zur Zielgerichteten Mutagenese von ADAP

Tabelle 5: Oligonukleotide zur zielgerichteten Mutagenese von ADAP

Name	Ziel	Sequenz
Y595_F	Tyr595A	5'- gaagatgaccaagaagtat <u>agg</u> gatgatgtgcagagcag -3'
Y595_R	mb	5'- ctgctctgcaacatcatc <u>ctata</u> cttcttggtcatcttc -3'
Y651_F	Tyr651A	5'- gacatgggagatgaagtt <u>agg</u> gatgatgtggatacctctg -3'
Y651_R	mb	5'- cagaggtatccacatcatc <u>ctaa</u> acttcatctcccatgtc -3'
Y571_F	Tyr571A	5'-caactgctgtagagattgact <u>agg</u> attcttgaaactgaaaaag-3'
Y571_R	mb	5'-ctttttcagttcaaagaatc <u>ctag</u> tcaatctctacagcagttg -3'

8.1.5.3. Oligonukleotide zur C-Terminalen Fusion von ADAP an den Snap-Tag

Zur C-terminalen Fusion der ADAP-Konstrukte an den Snap-Tag wurde ADAP aus den subklonierten pIX3.0 Vektoren per PCR amplifiziert. Das 3'-Oligonukleotid hybridisiert hierbei ADAP-unabhängig an den C-terminalen His-Tag, zwei 5'-Oligonukleotide erlauben die Amplifikation aller subklonierten Leserahmen. Die amplifizierten Leserahmen wurden durch Restriktionsverdau mit BamHI und XhoI in den Snap-Tag Vektor pSET7-26b subkloniert, die Schnittstellen der Restriktions-enzyme sind hervorgehoben (Tabelle 6).

Tabelle 6: Oligonukleotide zur Generierung von Snap-Fusionsproteinen der ADAP-Varianten

Oligonukleotid	Ziel	Sequenz
PM_010	570	5'-ctg <u>agg</u> atccgaaaacctgtacttccagtcgactatgattctttgaaactg-3'
PM_011	486	5'-ctg <u>agg</u> atccgaaaacctgtacttccagtcgagaaaaaggaacagaaagag-3'
PM_012	C-His	5'-gtcact <u>cgag</u> cagatcttggttagttat-3'

8.1.5.3. Oligonukleotide zur Amplifizierung der SH2-Domänenbibliothek

Zur Generierung der Linear Templates der SH2-Domänenproteine wurde folgende Oligonukleotide für die Amplifikation der ersten Stufe verwendet (Tabelle 7).

Tabelle 7: Oligonukleotide zur Generierung linearer Matrizen zur Synthese ortsspezifisch biotinylierter SH2-Proteine

Oligo-nukleotid	Sequenz
Grap2_F	5'-ACAATgTAgAAAgAAAAATTTgAACgTgAggCTgTTgCCAAgTTTgA -3'
Grap2_R	5'-CTTggTTAgTTAgTTATTAtcaTCgggTCATgggTgCCACg -3'
Fyn_F	5'-ACAATgTAgAAAgAAAAATTTgAACgTTCTATCCAGGCAGAAGAGTG -3'
Fyn_R	5'-CTTggTTAgTTAgTTATTAtcaggtagctgagtaattgttac -3'
Syk_F	5'-ACAATgTAgAAAgAAAAATTTgAACgTggCAgCAgCggCATggCTgAC -3'
Syk_R	5'-CTTggTTAgTTAgTTATTAtcactgtgtgccgatttttgac-3'
Nck2_F	5'-ACAATgTAgAAAgAAAAATTTgAACgTGAGTGGTACTACGGGAACGTG -3'
Nck2_R	5'-CTTggTTAgTTAgTTATTAtcactgcaggccctgacgag -3'
Src_F	5'-ACAATgTAgAAAgAAAAATTTgAACgTTCCATCCAGGCTGAGGAGTG-3'
Src_R	5'-CTTggTTAgTTAgTTATTAtcaggacgtggggcacacggtg -3'
Lck_F	5'-ACAATgTAgAAAgAAAAATTTgAACgTGCGAACAGCCTGGAGCCCGA -3'
Lck_R	5'-CTTggTTAgTTAgTTATTAtcagcagggggcgctcaaccgtg-3'
D1A_F	5'-ACAATgTAgAAAgAAAAATTTgAACgTgACgCAgTggCTgTgTATCATg -3'
D1A_R	5'-CTTggTTAgTTAgTTATTAtcaTggggCTTTCAGgCAgACATC -3'
Vav1_F	5'-ACAATgTAgAAAgAAAAATTTgAACgTAAGGCTGAGGCTGAACAGAAC-3'
Vav1_R	5'-CTTggTTAgTTAgTTATTAtcacctgctgatggttctcttttc-3'
PIK_F	5'-ACAATgTAgAAAgAAAAATTTgAACgTCCAgCACTgCCTCCTAAACCA -3'
PIK_R	5'-CTTggTTAgTTAgTTATTAtcaTgCATATACTgggTAggCTA -3'
PIK_5	5'-CTTggTTAgTTAgTTATTAtcaatcctgttgatttga-3'
PIK_6	5' --ACAATgTAgAAAgAAAAATTTgAACgTggcaatgaaaactgaagac-3'
BCAR_F	5'-ACAATgTAgAAAgAAAAATTTgAACgTgCTgCAggAAAATTTgCAAgCC-3'
BCAR_R	5'-CTTggTTAgTTAgTTATTAtcaAAgCTCTgCCTgCTTTACAg-3'
RASA_F	5'-ACAATgTAgAAAgAAAAATTTgAACgTgCggCCgAggCCggCAgTg -3'
RASA_R	5'-CTTggTTAgTTAgTTATTAtcattgatcctgcattgttacaggttc -3'
RASA_3	5'- ACAATgTAgAAAgAAAAATTTgAACgTaccgctcctccaactaacc -3'
RASA_4	5'-CTTggTTAgTTAgTTATTAtcaatcttctactggctctggtg-3'
RASA_5	5' -ACAATgTAgAAAgAAAAATTTgAACgTggccgggaagaagatcca -3'
SLP_F	5'- ACAATgTAgAAAgAAAAATTTgAACgTtcattaatgaagagtgttacg -3'
SLP_R	5'- CTTGGTTAGTTAGTTATTAtgggtaccctgcagcatgc -3'

Zur Proteinsynthese für MST-Messungen wurden Fyn, Lck, Src, SH2D1A, Rasa1b und RasaN mit einem C-Terminale His-Tag versehen. Hierfür wurden eigene Linear Templates unter Verwendung folgender 3'-Oligonukleotide generiert (Tabelle 8), die anschließend in pIX3.0 über BamHI und XhoI subkloniert wurden.

Tabelle 8: Oligonukleotide zur Einführung eines C-terminalen His-Tags an ausgewählte SH2-Proteine

Oligonukleotid	Sequenz
Fyn_CHis	5'-TggTgATggTggTgACCCCAggTACCTgAgTAATgTTgTAC -3'
Lck_CHis	5'-TggTgATggTggTgACCCCAgCAggggCggCTCAACCgTg-3'
Src_CHis	5'-TggTgATggTggTgACCCCAggACgTggggCACACggTg -3'
D1A_CHis	5'-TggTgATggTggTgACCCCATggggCTTTCaggCAgACATC -3'
Ras4_CHis	5'-TggTgATggTggTgACCCCAATCTTCTACTggCTCTggTg-3'
RasR_CHis	5'-TggTgATggTggTgACCCCAATTgATCCTgCATTggTACAggTTC -3'

In der folgenden Tabelle sind alle untersuchten Sequenzen aufgeführt, ebenso wie die Länge der Vollängenproteine, die Position der jeweiligen SH2-Domäne(n) sowie die zur Amplifizierung des jeweiligen Leserahmens notwendigen Oligonukleotide.

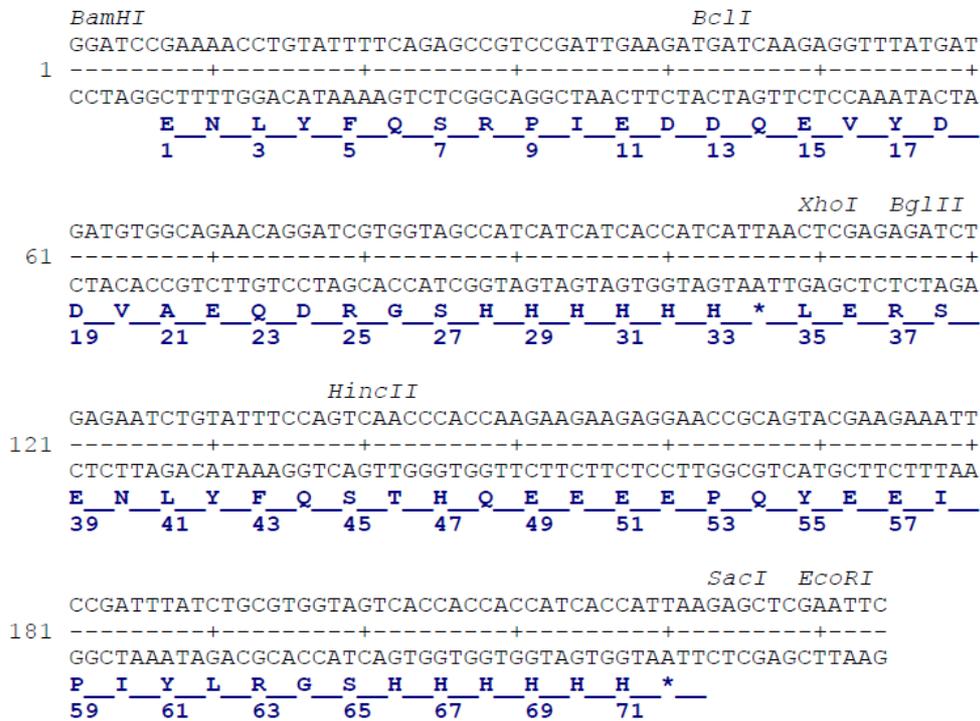
Tabelle 9: Übersicht der Sequenzabdeckung der generierten SH2-Proteine

Protein	Gesamtlänge (AS) und [Uniprot-Kennung]	Position der SH2-Domäne(n) laut Uniprot	Untersuchter Sequenzbereich	Oligos für die PCR 1. Stufe
Grp2	330 [O75791]	58-149	2-330	Grp_F / Grp_R
Fyn	537 [P06241]	150-232	143-234	Fyn_F / _Fyn_R
Syk	635 [P43405]	2-113 (N); 163-265 (C)	2-265	Syk_F / Syk_R
NCK2	380 [O43639]	285-380	284-380	Nck2_F / Nck2_R
Src	536 [P12931]	151-248	145-251	Src_F / Src_R
Lck	509 [P06239]	127-224	119-225	Lck_F / Lck_R
SH2D1A	128 [O60880]	6-104	2-128	D1A_F / D1A_R
Vav1	845 [P15498]	671-765	628-775	Vav1_F / Vav1_R
PIK3R1	PIK3R1 724 [P27986]	333-428(N) 624-718(C)	305-721	PIK_F / PIKR
PIK3N			305-434	PIK_F / PIK_5
PIK3C			599-721	PIK_6 / PIK_R
BCAR3	825 [O75815]	154-253	2-825	BCAR_F / BCAR_R
RASA1	Rasa1 1047 [P20936]	181-272 (N) 351-441 (C)	3-445	RASA_F / RASA_R
RASA1B			174-445	RASA_3 / RASA_R
RasaN			174-280	RASA_3 / RASA_4
RasaC			329-445	RASA_5 / RASA_R
SLP-76	553 [Q13094]	422-530	417-553	SLP_F / SLP_R

8.1.5.4. Klonierung der Fusionspeptide Snap-EEI und Snap-595

Die kodierenden Sequenzen zur Synthese der Snap-Fusionspeptide Snap-EEI und Snap-595 wurden durch GegeArt durchgeführt, wobei die Peptide in einem gemeinsamen Vektor geliefert wurden. Die erhaltene Sequenz ist im Folgenden dargestellt. Neben den Peptiden

wurde ebenfalls die Schnittstelle für die TEV-Protease (ENLYFQ/S) sowie ein C-terminaler His-Tag eingeführt (RGSHHHHHH).



Neben der wildtypischen Sequenz wurden im Rahmen der Bestellung auch die *amber*-Stopcodon haltigen Sequenzen bestellt. Die Sequenz dieser Matrize ist mit Ausnahme der Punktmutationen der Tyrosincodons Codons 17 und 61 zu TAG. Identisch. Zur Klonierung in den Snap-Vektor pSET7-26b wurde das EEI-Peptid (Codons 1-33) wie auch der Vektor mit *Bam*HI und *Xho*I hydrolysiert. Zur Klonierung des 595-Peptids wurde die Matrize in einem separaten Ansatz mit *Bgl*II und *Eco*RI verdaut, während der Vektor pSET7-26b mit *Bam*HI und *Eco*RI hydrolysiert wurde. Die Klonierung erfolgte selektiv unter Auflösung der Schnittstellen von *Bam*HI und *Bgl*II, da *Bgl*II und *Bam*HI nach der Hydrolyse den gleichen Überhang (GATC) aufweisen.

8.2. Methoden

8.2.1. Mikrobiologische Methoden

Sämtliche Proteine im Rahmen dieser Arbeit wurden mit zellfreien Expressionssystemen synthetisiert. Bakterienstämme wurden lediglich zur Klonierung, gerichteten Mutagenese und zur Anzucht von Plasmid-DNA verwendet. Hierbei fand der Stamm *E. coli* JM109 Verwendung, welcher eine hohe Replikationsrate von Plasmid-DNA aufweist und somit höhere Ausbeuten an Plasmid-DNA liefert.

E. coli JM109 *endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *relA1*, *supE44*, $\Delta(lac-proAB)$, [F' *traD36*, *proAB*, *laqI*^qZ Δ M15]

8.2.1.1. Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Zur Anzucht von *E. coli* Zellen wurden Flüssigkulturen in LB-Medium (0,5% Hefeextrakt, 1% Trypton, 0,5% NaCl in H₂O) bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Einzelkolonien wurden auf LB-Agarplatten (1,5% Agar in LB-Medium) bei 37°C inkubiert. Zur Selektion transformierter Bakterien wurden dem Medium Antibiotikum in einer Konzentration von 100 µg/ml (Ampicillin), 50µg/ml Chloramphenicol, 25 µg/ml Spectinomycin zugesetzt. Zur langfristigen Lagerung wurden sogenannte Glycerinkulturen angelegt. Hierfür werden 830 µl LB-Flüssigkultur mit 170 µl sterilfiltrierter Glycerinlösung (85%) versetzt, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

8.2.1.2. Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

Kurz vor der Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Für eine Elektroporation wurden ca. 10 pg Plasmid-DNA bzw. 1 µl eines 4-fach in H₂O bidest. verdünnten gegen Ligationsansatzes mit 20 µl der elektrokompetenten Zellen gemischt. Diese Suspension wurde in einer Elektroporationsküvette (0.1 cm Spaltbreite) mit einem Puls von 1.8 kV und 25 µF bei einem Widerstand von 200 Ω elektroporiert. Nach dem elektrischen Puls wurden die Zellen sofort in 1 ml SOC-Medium aufgenommen, in ein 12 ml Eppendorf-Röhrchen transferiert und 30 min bei 37°C geschüttelt. Von den transformierten Zellen wurden anschließend 300 µl auf LB-Agar Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert, wobei darauf geachtet wurde, dass die Inkubation möglichst nicht länger als 16 h dauerte.

SOC-Medium:

20 g/l	Pepton
5 g/l	Hefeextrakt
10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂ *
10 mM	MgSO ₄ *
20 mM	Glucose *

* nach dem Autoklavieren zuzusetzen

8.2.2. Molekularbiologische Methoden

8.2.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden *E. coli* Zellen in 10ml Übernachtskulturen unter Zusatz des notwendigen Antibiotikums angezogen. Die Bakterien wurden durch alkalische Lyse aufgeschlossen, die Plasmid-DNA über Anionenaustauscher-Säulen aufgereinigt. Das standardisierte Präparationsverfahren erfolgte anhand eines JET-Star Mini-Kits der Firma Genomed nach Angaben des Herstellers.

8.2.2.2. Restriktionsverdau von DNA

Die sequenzspezifische Hydrolyse von DNA wurde durch Restriktionsendo-nukleasen (bezogen von NEB) durchgeführt, gemäß den Angaben des Herstellers sowie den vom Hersteller empfohlenen pH-Werten und Salzkonzentrationen. Typischerweise wurden 5-10 U Enzym pro µg DNA eingesetzt. Die Hydrolyse wurde bei der für die Enzyme empfohlenen Temperatur, in aller Regel 37°C, für 1 h durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung bei 70°C für 5 min oder durch Zugabe von 6×DNA-Probenpuffer beendet.

8.2.2.3. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde in wässrigen Lösungen photometrisch durch Adsorption bei 260 nm gemessen. Hierbei entspricht die Adsorption von 1 cm⁻¹ einer Konzentration von 50µg/ml doppelsträngiger DNA.

8.2.2.4. Dephosphorylierung von DNA

Um die Rezirkularisierung des Vektors in Ligationsreaktionen zu verhindern, wurden im Rahmen der Präparation geschnittener Vektor-DNA die 5'-Enden dephosphoryliert. Dies erfolgte direkt nach dem Restriktionsverdau durch Zugabe von 5 U Calf Intestine

Phosphatase (NEB) pro μg DNA zum Restriktionsansatz und Inkubation bei 37°C für 1 h. Es wurde darauf geachtet, dass die Pufferbedingungen im Ansatz für die Phosphatase geeignet waren.

8.2.2.5. Ligation sequenzspezifisch hydrolysierter DNA

Die Ligation sequenzspezifisch hydrolysierter DNA erfolgt durch Zusatz von T4 DNA-Ligase (NEB). Die Ligationsansätze enthielten standardmäßig 20 fmol hydrolysierten Vektor sowie 50 fmol der einzufügenden Nukleinsäure sowie 1 U T ϕ -Ligase. Die Ligation wurde für 30 min bei 16°C durchgeführt, anschließend wurde das Enzym durch Inkubation bei 70°C für 5 min inaktiviert.

8.2.2.6. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese. Die Agarose (10-15 g/l) wurde in 1x TBE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlung auf etwa 55°C mit Ethidiumbromid (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) versetzt und in Flachkammern mit Kämmen für die Geltaschen gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und bei einer Spannung von 90 bis 120 V mit 1x TBE als Laufpuffer aufgetrennt. Aufgrund der Interkalation von Ethidiumbromid zwischen die Nukleobasen und der damit verbundenen Verschiebung des Emissionsspektrums kann DNA auf einem UV-Illuminator sichtbar gemacht und photographiert werden. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte anhand eines parallel aufgetragenen Größenstandards (2-log DNA-ladder, New England Biolabs), zur Abschätzung der Probenmenge wurde jeweils 100ng einer 1kb-großen dsDNA aufgetragen (1kb-Standard, Invitrogen).

1xTBE:	6x DNA-Probenpuffer:
90 mM Tris	30% (v/v) Glycerin
95 mM H_3BO_3	0,1% Bromphenolblau
2,5 mM EDTA	0,1% Xylencyanolblau

8.2.2.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Vervielfältigung von DNA-Sequenzen wird durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) *in vitro* bewerkstelligt. Standard-PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 25 μl einem PTC 200 Thermocycler der Firma Biorad durchgeführt. Das Profil der Reaktion richtete sich nach der Länge und dem G/C-Gehalt der verwendeten Oligonukleotide und nach der Länge des zu erwartenden PCR-Fragments. In der Regel wurden, falls notwendig, lediglich die Temperaturen für die Primerbindung oder die Anzahl der Amplifikationszyklen optimiert.

Standard PCR-Reaktionen wurden gemäß folgendem Programm durchgeführt:

Initiale Denaturierung	5 min	94°C
Elongation 30 Zyklen	1 min	94°C
	1 min	52°C
	1 min/1 kb	72°C
Endverlängerung	7 min	72°C
Lagerung	∞	4°C

PCR-Reaktionen wurden für die nachfolgende Verwendung mit dem High Pure PCR Purification Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Reaktionsansatz:

10 mM	Tris/HCl pH 8,85 (20°C)
25 mM	KCl
50 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
2 mM	MgSO ₄
200 µM	dATP, dGTP, dCTP, dTTP
0,5 µM	5'- und 3'-Oligonukleotide
0,4 ng/µl	DNA-Matrize (ca. 0,14 nM für ein 4kb-Plasmid)
0,03 U/µl	HotStar Hi-Fidelity DNA-Polymerase

8.2.2.8. Zielgerichtete Mutagenese durch Vektor-PCR

Durch zielgerichtete Mutagenese eines Gens lassen sich Proteine mit veränderter Aminosäuresequenz generieren. Solche Mutationen lassen sich durch die Amplifikation des ganzen Plasmids mit Hilfe der PCR bewerkstelligen. Hierzu wurden zwei komplementäre Oligonukleotide verwendet, die eine Punktmutation gegenüber der Zielsequenz trugen und in die 5'- und 3'-Richtungen noch jeweils mindestens 15 bp der Zielsequenz aufwiesen.

Anschließend werden die Matrize und Hybride aus Matrizen- und neu synthetisiertem Strang durch einen Restriktionsverdau mit *DpnI* in nicht transformierbare kleinere DNA-Fragmente zerlegt. *DpnI* verdaut selektiv methylierte Ursprungsplasmide, wohingegen das nicht methylierte PCR-Produkt intakt bleibt. Die neu synthetisierten, linearen Plasmide werden transformiert, in zellulären Kontext werden die Plasmide zirkularisiert.

Im Vergleich zur Standard-PCR weicht das Protokoll der Vektor-PCR wie folgt ab: die Endkonzentration an Template misst 1,5 ng/µl. Die Elongationsphase ist sehr lang und

beträgt etwa 12 min. Auch wurden Primer-, Hybridisierungs- und Elongationstemperatur bezüglich des verwendeten Kits an die HotStar HiFidelity-Polymerase angepasst (HotStar HiFidelity PCR, Qiagen).

Die Mutagenese-PCR wurden gemäß folgendem Programm durchgeführt:

Initiale Denaturierung	5 min	95°C
Elongation 18 Zyklen	1 min	95°C
	1 min	48°C
	12 min	68°C
Lagerung	∞	4°C

Dabei wurden der Reaktionsansatz folgend zusammengesetzt:

1×	HotStar HiFidelity PCR-Buffer (Stammlösung 5×)
500 µM	Oligonukleotide
1,5 ng/µL	DNA-Matrize
0,03 U/µL	HotStar HiFidelity DNA-Polymerase (2,5 U/µL)

Anschließend wird der Reaktionsansatz mit 10U *DpnI* auf 50 µL versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. 1 µL des PCR-Ansatzes wird auf einem 1,2%igen Agarosegel analysiert. Weitere 20 µL werden entsalzt. Hierfür eignet sich das DyeEx™ 2.0 Spin Kit der Firma Qiagen. 1-2 µL des DyeEx-gereinigten PCR-Produktes werden für die Transformation von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen eingesetzt.

8.2.3. Zellfreie Synthese von Proteinen

8.2.3.1. Zellfreie Standardsynthese von Proteinen

Die zellfreie Standardsynthese von Proteinen erfolgte durch Verwendung des EasyXpress Protein Synthesis Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Zur Synthese basierend auf Linear Templates wurden 14% (v/v) PCR-Produkt 2. Stufe der Reaktion zugeführt. Im Falle der plasmidbasierten Synthese wurde das Plasmid in einer Endkonzentration von 6 nM zugegeben. Zur Quantifizierung und Detektion von frisch synthetisiertem Protein kann dem Reaktionsansatz ¹⁴C-markiertes Leu zugegeben werden (50 µM, Endaktivität: 5 dpm/pmol). Die Proteinsynthese erfolgt für 60 min bei Inkubation unter 37°C und 500 rpm.

Die Synthese im präparativen Maßstab erfolgt

8.2.3.2. Zellfreie Synthese ortsspezifisch biotinylierter Proteine

Die Synthese ortsspezifisch biotinylierter Proteine erfolgte unter Nutzung des Site specific biotin kits (Qiagen). Dieses Kit basiert auf einer RF-1 defizienten Lysatfraktion. Zusätzlich zu den Matrizen, welche in gleichen Konzentrationen wie zur Standardsynthese eingesetzt wurden, erfolgte die Zugabe von chemisch aminoacylierter tRNA^{BioLys}_{CUA} zu einer Endkonzentration von 12 µM. Eine Radiomarkierung mit ¹⁴C-Leu erfolgte analog zur Vorgehensweise bei der Standardsynthese über das EasyXpress Kit. Die Reaktionen wurden für 45min bei 30°C und 500 rpm inkubiert.

8.2.3.3. Zellfreie Synthese AzPhe-haltiger Proteine

Zum ortsspezifischen Einbau von p-Azidophenylalanin in Proteine wird die Proteinsynthese unter Zusatz von 1,2 mM p-Azidophenylalanin (Vorratslösung: 25 mM in H₂O), 0,70 µg/ml der aufgereinigten Aminoacyl-tRNA-Synthetase AzPheRS1 sowie 0,20 µg/ml der orthogonalen tRNA tTyr_{CUA} (*M. jannaschii*) durchgeführt. Hierfür kann entweder eine RF-1 defiziente Lysatfraktion oder die Lysatfraktion des EasyXpress kits verwendet werden, wobei die Ausbeuten in Abwesenheit RF-1 höher ausfallen. Die Reaktion wird unter Inkubation des Ansatzes für 60 min bei 37°C und 500 rpm durchgeführt. Für eine anschließende chemoselektive Reaktion muss für den Reaktionsansatz zumindest ein Pufferaustausch durchgeführt werden, um freies und überschüssiges pAzPhe zu entfernen. Alternativ kann das Protein (falls ein Aufreinigungstag vorhanden ist) auch direkt aufgereinigt werden.

8.2.4. Proteinbiochemische Methoden

8.2.4.1. TCA-Fällung von Proteinen

Zur Konzentrationsbestimmung von ¹⁴C-Leu markierten Proteinen müssen im Überschuss vorhandene freie isotope-markierten Aminosäuren vom Protein getrennt werden. Dies geschieht durch Fällung einer Probe in TCA, bevor diese der Szintillationszählung unterzogen werden kann. In Doppelbestimmung werden 5–10 µL eines Translationsansatzes mit 3 ml 10% TCA, 2% Pepton in einem Reagenzglas versetzt. Die Proben werden für 15 min bei 85°C inkubiert. Anschließend folgt die Fällung für 30 min auf Eis. Die durchmischte Suspension wird quantitativ auf einen mit 5%iger TCA befeuchteten Glasfilter überführt und abgesaugt. Das zur Präzipitation verwendete Glasröhrchen wird zweimal, die Innenwand der Absaugkammer dreimal mit jeweils 2 ml 5%iger TCA nachgespült. Durch zweimaliges Spülen mit jeweils 3 ml Aceton wird der Filter getrocknet. Der Filter wird nun in ein Szintillationsgefäß überführt, wo er mit 3,5 ml

Szintillationscocktail versetzt wird. Die Gefäße werden für mindestens 15 min geschüttelt. Anschließend folgt die Messung der Radioaktivität im Szintillations-zähler.

8.2.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen werden diese der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese unterzogen (SDS-PAGE). Für die Durchführung der SDS-PAGE wurde eine Mini-Protean-Gelkammer der Firma BioRad sowie Glasplatten mit 0,75mm Spacerbreite verwendet. Zum Gießen der Gele werden die Glasplatten zunächst in einem Gießstand (BIORAD) eingespannt, dann werden die Komponenten für das Trenngel in einem 15ml Falcon-Röhrchen vereinigt. Unmittelbar nach der Zugabe von APS wird die Mischung durch mehrfaches Invertieren gemischt und es werden 3,3ml Trenngellösung pro Gel mit einer 5ml-Kolbenhubpipette in die vorbereitete Form gegossen. Es wird umgehend mit einem Spritzer reinem EtOH überschichtet und eine gerade Trenngelgrenze auszubilden sowie den Kontakt zu Luftsauerstoff abzuschwächen.

Nach erfolgter Polymerisation (mind. 30 min) wird die überstehende Phase dekantiert und mit Filterpapier restlos abgezogen. Im Anschluss wird mit Sammelgellösung überschichtet und ein Taschenkamm eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammelgels können die erhaltenen Gele zur SDS-PAGE verwendet werden oder auf Vorrat in nassem Papier eingewickelt in einer Plastiktüte abgedichtet bei 4°C für bis zu zwei Wochen aufbewahrt werden.

Um das Laufverhalten der zu trennenden Proben zu verbessern, werden die enthaltenen Proteine vor dem Gellauf mit Aceton gefällt. Hierzu werden von der zu trennenden Fraktion 5-15 µl in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, mit H₂O dest. auf 40 µL aufgefüllt und schließlich mit 120 µl gekühltem Aceton vermischt und mindestens 15 min auf Eis gefällt. Nach 5 min Zentrifugation bei 15000 ×g und 4°C wird das vom Überstand befreite gefällte Protein (Pellet) 5 min bei 37°C in einem Heizblock bei geöffnetem Gefäßdeckel getrocknet. Das Pellet wird im Probenpuffer (1×RotiLoad) gelöst, optional für 1–3 min bei 90°C denaturiert und auf die mit Laufpuffer bedeckten Taschen aufgetragen. Die Elektrophorese findet üblicherweise bei 130 V statt.

Trenngellösung:

10-15%	(v/v) Acrylamid/Bisacrylamid 70:2
375 mM	Tris/HCl pH 8,8
0,1%(w/v)	SDS
0,04% (v/v)	TEMED
0,1% (w/v)	APS

Sammelgellösung:

5% (v/v)	Acrylamid/Bisacrylamid 70:2
125 mM	Tris/HCl pH 6,8
0,1% (w/v)	SDS
0,2% (v/v)	TEMED
0,1% (w/v)	APS

1×Laufpuffer:

50 mM	Tris
384 mM	Glycin
0,5% (w/v)	SDS

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteinbanden werden durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blue sichtbar gemacht. Hierfür werden die Gele nach dem Lauf für mind 10 min bei RT in Coomassie-Lösung unter leichtem Schwenken gefärbt. Die unspezifische Färbung der Gelmatrix wird durch anschließendes Entfärben in Entfärbelösung für etwa 2 h entfernt. Die Nachweisgrenze der Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R250 liegt bei 100 ng/Bande.

Coomassie-Lösung:

50% (v/v)	MeOH
10% (v/v)	AcOH
0,1% (w/v)	Coomassie Brillinat Blue R-250

Entfärbelösung:

20% (v/v)	MeOH
7,5% (v/v)	AcOH

Das gefärbte Gel wird auf festes Filterpapier übertragen und für 50 min bei 70°C auf einem Geltrockner (Uniequip, Martinsried) getrocknet.

8.2.4.3. Proteinaufreinigung

8.2.4.3.1. His-Tag Aufreinigung von Proteinen

Das zu reinigende Protein wird auf 10 mM Imidazol eingestellt und mit Ni-NTA Magnetic Agarose Beads bzw. Ni-NTA Agarose der Firma Qiagen für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Durch zweimaliges Waschen mit Waschpuffer werden nicht an die Affinitätsmatrix bindende Proteine entfernt. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgt mit dem Elutionspuffer. Proben vom Bindungsüberstand (ÜS), den Waschfraktionen und Elutionsfraktionen (jeweils 10% der erhaltenen Fraktion) werden mit Aceton gefällt und in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. Für radioaktiv-markierte Proteine kann durch Exposition über Nacht vom SDS-Gel ein Autoradiogramm erhalten werden.

Grundzusammensetzung von Lyse-, Wasch- und Elutionspuffer:

50 mM	NaH ₂ PO ₄ .
300 mM	NaCl
0,05% (v/v)	Tween-20 (nur für Ni-NTA magnetic beads)

Zusatz von Imidazol:

Lysepuffer	10 mM Imidazol
Waschpuffer	20 mM Imidazol
Elutionspuffer	250 mM Imidazol

Alle Puffer müssen vor Gebrauch zwingend auf pH 8,0 eingestellt werden.

8.2.4.3.2. Strep-(II)-Tag Aufreinigung von Proteinen

Der sogenannte Strep-(II)-Tag ist ein weiterer kurzer Aufreinigungstag. Er besteht aus der Oktapeptidsequenz WSHPQFEK und bindet mit einer Affinität (K_d) von etwa 1 μ M an Strep-Tactin, eine optimierte Mutante des bakteriellen Streptavidin und ist damit ein künstliches Analog zu Biotin. Zur Aufreinigung wird das Protein mit Inkubationspuffer NP-T verdünnt und mit Strep-Tactin beschichteten Magnetic Beads (Qiagen) für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nichtmarkierte, ungebundene Proteine werden durch zwei- bis dreifaches Waschen der beladenen Beads mit NP-T entfernt. Zur Elution wird mit Desthiobiotin frisch versetzter Puffer (NPB-T) verwendet. Durch die Verwendung von Desthiobiotin anstelle von Biotin lässt sich die Affinitätsmatrix mit HABA (2-(4-Hydroxy-phenylazo)-benzoesäure) wieder regenerieren.

Puffer:

NP-T:

50 mM NaHPO₄

300 mM NaCl

0,05% Tween-20, pH 8,0

NPB-T:

NP-T mit frischem Zusatz von 2,5 mM Desthiobiotin vor Gebrauch

8.2.4.4. Pull down Experimente mit Glutathion-S-Transferase (GST) markierten Proteinen

Proteine mit einem GST-tag binden an feste Phasen, welche mit dem Tripeptid Glutathion (gammaGlu-Cys-Gly) bestückt sind. Hierfür wurden Glutathion Magnetic Agarose Beads von ThermoFischer verwendet. Zunächst wurden 50µL der Beadsuspension in 20% EtOH am Magnetabscheider gesammelt, der Überstand verworfen und zwei Mal in 150µL GST-Puffer aufgeschwämmt. Anschließend wurden etwa 320 pmol (entspr. 8µL) GST-getaggetes Protein (GST-Fyn-SH2 oder GST-NCK1-SH2) auf 300µL mit GST-Puffer verdünnt und auf die im Magnetabscheider gesammelten Beads überführt. Zur Immobilisierung des Proteins wurde der Ansatz 60min bei 4 °C unter sanfter Invertierung inkubiert. Anschließend werden die Beads gesammelt, der Überstand verworfen, in 300µL GST-Puffer resuspendiert und schließlich in zwei Aliquote à 150µL geteilt und in neue Reaktionsgefäße überführt. Zu jedem neuen Teilansatz wurden 10pmol (ca. 5µL) Tyrosinphosphoryliertes Protein bzw. nicht phosphoryliertes Protein in jew. 150µL GST-Puffer zugegeben und 60 min bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurde der Bindungsüberstand abgenommen, die Beads zwei- bis dreimal mit 100µL GST-Puffer gewaschen und schließlich in 40µL eluiert. Zur Elution soll laut Hersteller eine frische Lösung von 50 mM reduzierten Glutathion in GST-Puffer verwendet werden, im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Elution jedoch unspezifisch mit reduzierendem 1x SDS-PAGE Probenpuffer. Die Mobilisierung des GST-getaggeten Proteins erfolgt durch das vorhandene 2-Mercaptoethanol, welches in der hohen Konzentration eine ähnliche Wirkung wie das reduzierte Glutathion aufweist. Ferner wurden die pull downs mit dem Ziel der nachfolgenden Analyse per SDS-PAGE durchgeführt, wofür auf diese Weise die Proben der Elutionsfraktion zeitsparender Weise direkt eingesetzt werden konnten.

GST-Puffer: 125 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0

8.2.4.5. Pull down Experimente mit ortsspezifisch biotinylierten Proteinen

Hierbei werden 80µL Beadsuspension am Magnetabschieder gesammelt, der Überstand verworfen und in zwei Mal in 160µL 1×PBS gewaschen, um von den Beads abgelöstes Streptavidin zu entfernen. Anschließend werden die Beads gesammelt und 20µL Syntheseansatz des biotinylierten Proteins mit 1×PBS auf 300µL verdünnt und auf die im Magnetabschieder gesammelten Beads überführt. Zur Immobilisierung des Proteins wird der Ansatz 30min bei RT unter sanfter Invertierung inkubiert. Hierbei wird neben dem Protein auch die biotinylierte Suppressor-tRNA gebunden, weswegen ein Überschuss an Beads im Vergleich zum biotinylierten Protein nötig ist. Nach der Inkubation wird die Beadsuspension in zwei Fraktionen zu je 150µL geteilt und in neue Reaktionsgefäße überführt. Im Anschluss werden 6pmol (ca. 3µL) Tyrosinphosphoryliertes Protein bzw. nicht phosphoryliertes Protein auf jew. 100µL mit 1×PBS verdünnt zugegeben und für 90min bei RT unter sanfter Invertierung inkubiert. Nach Abnahme des Bindungsüberstandes und zweimaligen Waschen mit je 100µL 1×PBS werden die Beads in 40µL SDS-PAGE Probenpuffer für 5min bei 90°C aufgekocht. Dabei werden sowohl die Interaktionspartner als auch monomeres Streptavidin freigesetzt, welches in der sich anschließenden SDS-PAGE deutlich zu erkennen ist.

Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass neben dem ortsspezifisch biotinylierten Protein auch endogen biotinylierte Proteine an die Affinitätsmatrix binden können. In *E. coli* Zellen und somit auch in *E. coli* basierten Zellysaten wird das Protein accB (Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase) aus der Lipidbiosynthese in hohen Raten exprimiert und kann als unbedarft als systematischer Fehler misinterpretiert werden. Im Fall des hier verwendeten site-specific biotinylation kit wurden endogen biotinylierte Proteine im Lauf der Komponentenaufarbeitung bereits entfernt, wodurch keine Hintergrundproteine zu erkennen sind.

8.2.4.6. Pull down Experimente zur Überstands-Abreicherung

Die Methode der Überstands-Abreicherung (engl. Supernatant depletion assay) stellt eine Erweiterung der Pull down Methode dar. Hierbei erfolgt im Anschluss an die Immobilisierung des markierten Proteins an die feste Phase eine Verdünnungsreihe. Durch Zugabe der gleichen, konstant niedrigen Menge an Interaktionspartner kann die Affinität der Bindung durch die Analyse des im Überstand befindlichen Interaktionspartner ermittelt werden.

Die Bindung des biotinylierten Proteins erfolgt analog zu der unter vorigem Punkt beschriebenen Prozedur, wobei größere Mengen (60µL Reaktionsansatz auf 120µL Beads) verwendet werden. Statt der direkten Zugabe des Interaktionspartners wird der Überstand

des biotinylierten Proteins abgenommen und die Beads werden in 40µL 1xPBS resuspendiert (um möglichst hohe lokale Konzentrationen zu erzielen) und in ein 200µL PCR-Gefäß überführt. Im Anschluss werden 20µL der Suspension abgenommen und in 20µL 1xPBS (Vorlage) verdünnt. Die Prozedur wird zehnmal wiederholt sodass eine Verdünnungsreihe mit 12 Messpunkten entsteht. Zu jeden Messpunkt werden 10µL der verdünnten Lösung des Interaktionspartners zugegeben. Es folgt eine Inkubation von 10min bei RT, zur Ausbildung des Komplexes. Anschließend werden die Beads am Magnetabscheider gesammelt und die Überstände abgenommen, einer Acetonfällung unterzogen und durch SDS-PAGE analysiert.

8.2.4.7. K_d Bestimmung mittels Microscale Thermophorese

Zur K_d Bestimmung über Microscale Thermophorese wurde eine Verdünnungsreihe der im RTS500 synthetisieren und ultrazentrifugierten SH2 Proteine in Thermophoresepuffer über vier bis fünf Größenordnungen in 200 µl PCR-Gefäßen dargestellt. ADAP wurde in einer Tischzentrifuge für 2 min bei 16100 $\times g$ anzentrifugiert um unlösliche Partikel aus der Lösung zu sedimentieren. Aus dem Überstand wurde ADAP entnommen und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß in Thermophoresepuffer auf eine Konzentration von 24 nM verdünnt.

Anschließend wurde jedem Glied der Reihe das gleiche Volumen von verdünntem ADAP zugegeben und durch mehrmaliges Pipettieren vermischt. Die Endkonzentration von ADAP betrug durchgängig 12 nM. Die Proben wurden zur Einstellung des Interaktionsgleichgewichts 5 min bei RT ruhengelassen, anschließend in Thermophoresekapillaren aufgezogen (Standard Treated Capillaries, Nanotemper) und in das Messgerät (Nanotemper Monolith NT.115) überführt. Nach der Überprüfung des Beladungsgrades der Kapillaren durch einen Kapillarscan wurde die MST-Messung unter Standardeinstellungen automatisiert durchgeführt (IR-Laser Intensität 20% und 40%). Der typische Thermophoreselauf pro Probe gliederte sich in eine Grundlinienmessung im Ruhezustand für 5 sek, gefolgt von einer Erhitzungspause für 30 sek und einer abschließenden Relaxationsphase von 5 sek. Typischerweise wurden vier Messungen des gleichen Probensatzes hintereinander durchgeführt (2 \times 20%, 40%). Die erhaltenen Messkurven wurden unter der Standardeinstellung „Thermopresis“ in Messpunkte umgewandelt (Hot: 34,2 + 1 sec, Cold: 5,6 + 0,5 sec). Für die daraus resultierenden Messkurven wurden mit dem von Hersteller bereitgestellten Analyseprogramm der K_d ermittelt. Die erhaltenen K_d -Werte wurden arithmetisch gemittelt und sind mit der Standardabweichung angegeben.

Zur K_d Bestimmung für die Snap-Fusionspeptide Snap-EEI und Snap-595 wurde dem Messpuffer Tween-20 in einer Endkonzentration of 0,05% Vol zugegeben.

Thermophoresepuffer: 5%- S-Mix
 1× PBS 40% (v/v) S-Mix aus EasyXpress Kit
 5% (v/v) verdünnter S-Mix 35% (v/v) 1× TLM-150
 25% H₂O

Von Nantemper empfohlener Puffer:

10×MST-optimized Buffer: 500 mM Tris/HCl
 1500 mM NaCl
 100 mM MgCl₂
 0,5% (v/v) Tween-20
 pH 7,5

8.2.4.8. Untersuchung durch Western-Blotting

Das Verfahren des Western-Blotting wurde in Analogie zum Southern Blot (Nachweis von DNA-DNA-Wechselwirkungen) entwickelt. Wie alle Blotting-Techniken besteht der Kernschritt im Übertrag einer Probe auf eine Trägermembran. Anschließend lassen sich die immobilisierten Proben durch spezifische Reaktionen nachweisen. Im Falle des Western-Blots werden Proteinproben (Antigene) übertragen und anschließend detektiert. In der Regel geschieht dies durch Antikörper, welche das gewünschte Protein spezifisch erkennen. Diese werden als primäre Antikörper bezeichnet. Der gebildete Antigen-Antikörper-Komplex wird durch Bindung eines sekundären Antikörpers visualisiert. Dieser erkennt die konstanten Bereiche des primären Antikörpers und ist selbst markiert. Dies kann durch den Einbau radioaktiver Isotope geschehen, wird heutzutage aber in der Regel durch die Fusion eines Reporterenzym wie Meerettich-Peroxidase bewerkstelligt. Die Detektion erfolgt dann durch Inkubation eines Enzymsubstrats, welches nach Metabolisierung fluoresziert. Primäre Antikörper sind meist spezifisch gegen eine Peptidsequenz im Zielprotein gerichtet. Ebenfalls weit verbreitet sind Antikörper, welche posttranslationale Modifikationen wie PhosphoSer, PhosphoTyr oder Glykosylierungen detektieren um deren Vorhandensein auf einem Protein zu belegen. Des Weiteren werden sie gegen Affinitätstags wie PolyHis, FLAG, GST oder den Strep-Tag gerichtet um alle getaggen Proteine nachzuweisen.

8.2.4.8.1. Western-Blot zur Detektion von Phosphotyrosin

Der Phosphorylierungsgrad der in-vitro phosphorylierten Proteine sowie der per Staudinger-Phosphit-Reaktion umgesetzten Azidoproteine wurde mit einem Phosphotyrosinspezifischen Antikörper untersucht.

Die zu untersuchenden Proben werden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Beendigung des Gellaufs wird das Gel entnommen, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel für 10 min in 1× Transferpuffer inkubiert. Parallel dazu wird ein Stück PVDF-Membran in der Größe des Trenngels zurechtgeschnitten, ebenso wie sechs gleichgroße Stücke Whatman-Filterpapier. Die Membran wird zur Äquilibration kurz in MeOH abs. äquilibriert, anschließend kurz in dd-H₂O gewaschen und schließlich für 5 min in 1× Transferpuffer inkubiert. Die Filterpapiere werden ebenfalls in 1× Transferpuffer getränkt.

Anschließend wird der Transfer in einer Transferkammer (BIORAD semi-dry) vorbereitet. Dafür werden drei Filterpapiere auf die Anodenplatte gelegt, darauf die Membran, darauf passgenau das Gel sowie auf das Gel drei weitere Filterpapiere. Der Stapel wird mit der Kathodenplatte abgedeckt. Anschließend erfolgt der elektrophoretische Transfer der Proben bei einer konstanten Stromstärke von $I = 0,8 \text{ mA} / \text{cm}^2$ Membran für 90 min. Die Membran wird anschließend mit 1× TBS überschichtet und unter leichtem Schwenken für 5 min gewaschen. Der Schritt wird zwei Mal wiederholt. Anschließend wird die Membran mit 15 ml Blockinglösung bei leichtem Schwenken für 1h inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Nach dem Blockieren wird die Membran dreimal in 1× TBST für je 5 min unter leichtem Schwenken gewaschen. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem primären Antikörper unter leichtem Schwenken über Nacht bei 4°C.

Nach der Inkubation wird die Membran dreimal für 5min in 1× TBST gewaschen, es folgt die Inkubation mit dem sekundären, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Antikörper für 1h bei RT. Abschließend wird die Membran erneut dreimal für 5min in 1× TBST gewaschen, es folgt die Inkubation mit dem Peroxidase-Substrat für 2 min. Anschließend wird das enzymatische Signal in einer Dunkelkammer fotografiert. Nach erfolgter Dokumentation wird die Membran dreimal für 5min in 1× TBST gewaschen, um das Detektionsreagenz zu entfernen. Die Membran kann nun an der Luft getrocknet und aufgehoben werden. Im trockenen Zustand ist die Membran praktisch unbegrenzt für weitere Detektionen haltbar. Zur erneuten Untersuchung muss die Membran wie oben beschrieben äquilibriert werden sowie die noch neuerlichen Immunoreaktion gebundenen Antikörper von der Membran entfernt werden (Strippen).

Strippen der Membran:

Die hydratisierte Membran wird dreimal für je 3 min in Stripping-Puffer (erhitzt auf 85°C) inkubiert. Hierbei werden durch das zugesetzte Mercaptoethanol die Disulfidbrücken der Antikörper gebrochen. Diese werden durch das ebenfalls enthaltene Detergenz entfernt.

Dieser Schritt darf keinesfalls zu lange durchgeführt werden, ansonsten werden die immobilisierten Proteine (Antigene) ebenfalls herausgewaschen.

Die gestrippte Membran wird dann 3-4-mal kurz in dd-H₂O geschwenkt, anschließend 3-mal für 5min in 1× TBS gewaschen um den Stripping-Puffer restlos zu entfernen. Anschließend erfolgt wie oben beschrieben die Blockierung, die Membran kann nun erneut mit dem gewünschten Antikörper inkubiert werden.

8.2.4.8.2. Nachweis der Biotinylierung von Proteinen mittels Western-Blot

Eine Biotinylierung kann ebenfalls per Western-Blot nachgewiesen werden. Hierfür macht man sich die sehr starke Affinität von Biotin zu Streptavidin zunutze, den Blot wird anstelle eines primären Antikörpers direkt mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Streptavidin für 1h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 1× TBST kann der Blot direkt mit dem Peroxidase-Substrat inkubiert und analysiert werden.

Lösungen und Puffer für Western-Blots:

10× Transferpuffer: 480 mM Tris
 390 mM Glycin
 in dd-H₂O

1× Transferpuffer: 10% (v/v) 10x Transferpuffer
 20 % (v/v) MeOH abs.
 mit dd-H₂O auffüllen

Blockierungslösung: 1× RotiBlock® in 1× TBS

Primärer Antikörperpuffer: 1× TBST + 2,5% (w/v) BSA

Strippuffer: 100 mM 2-Mercaptoethanol
 50 mM Tris/HCl pH 6.8
 2% (w/v) SDS

8.2.4.8.3. Nachweis der Reinigungstags

Der Nachweis der Reinigungstags auf der Western-Membran erfolgt durch Inkubation primärer Antikörper gegen die gewünschten Tags. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ein Anti-S(II)- sowie ein Anti-(His)₅-Antikörper (Qiagen) gemäß der Angaben der Hersteller verwendet. Die Detektion erfolgte durch Chemolumineszenz, anhand Peroxidase-gekoppelter sekundärer Antikörper.

8.2.4.9. Bestimmung des Phosphorylierungsgrades

Die Bestimmung des Phosphorylierungsgrades von Snap-ADAP und Snap-YEEI wurde vollständig in der Arbeitsgruppe von Eberhard Krause durchgeführt. Hierzu gehörte die Probenvorbereitung durch In-Gel Verdau der Proteine mit Proteasen, die Messung einer HPLC-gekoppelten ESI-MS Messung sowie der Auswertung der Daten.

Die ermittelten Phosphorylierungsgrade sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Protein	Proteaseverdau mit	Phosphorylierungsstelle (Position in wt ADAP)	Detektiertes Peptid	Phosphorylierungsgrad
ADAP	Elastase	Y224 (Y595)	209-236	89 %
			211-236	93 %
			215-236	87 %
		Y254 (Y625)	235-273	88 %
		Y280 (Y651)	276-286	78 %
	Proteinase K	Y224 (Y595)	207-230	97 %
			207-236	96 %
		Y254 (Y625)	Nicht identifiziert	Nicht ident.
		Y280 (Y651)	274-286	78 %
YEEI	Elastase	Y208	198-213	87 %
		Y208	200-213	86 %
	Chymotrypsin	Y208	Nicht identifiziert	Nicht ident.

8.2.5. Modifikation von Proteinen

8.2.5.1. *In vitro* Phosphorylierung von ADAP und ADAP-Varianten

Zur *in vitro* Phosphorylierung von ADAP und der Peptidvarianten wurde Fyn-Kinase verwendet, welche in transfektierten *Spodoptera frugiperda*-Zellen überexprimiert wurde. Die Herstellung der Kinase wurde von der Arbeitsgruppe von Christian Freund übernommen. Die Fyn-Kinase wurde in 1x PBS und 50% Glycerin (v/v) bei -80°C gelagert (0,1 µM).

Zur ko-translationalen *in vitro* Phosphorylierung von ADAP wurden 50 µl eines EasyXpress Reaktionsansatzes von ADAP vor der Inkubation mit 4µL aufgereinigter Fyn-Kinase versetzt und durch Pipettieren vorsichtig vermischt. Nach der folgenden ADAP-Synthese bei 37°C kann das überexprimierte Protein entweder aufgereinigt oder direkt in einen Pulldown eingesetzt werden.

Zur posttranslationalen Phosphorylierung werden 50 µl aufgereinigtes, in 1x Phosphorylierungspuffer vorliegendes ADAP mit 4 µl Fyn-Kinase versetzt, durch Pipettieren vermischt und in die Reaktionskammer eine RTS100-CECF Dialysekammer überführt. Die

Reservoirkammer wird mit 1 ml 1x Phosphorylierungspuffer bestückt. Die beladene Dialysekammer wird in einem Eppendorf-Thermoblock platziert und bei 32°C und 800 rpm übernacht inkubiert. Nach der Inkubation wird wie ADAP-Kinase Reaktion der Reaktionskammer entnommen und über Ni-NTA Magnetkügelchen (Qiagen) aufgereinigt und anschließend über ein Proteinentsalzungssäulchen (Pierce) in 1x HBS zur Lagerung (-20°C oder 4°C) überführt.

Zur *in vitro* Phosphorylierung wird das Substratprotein in 1x Phosphorylierungspuffer umgepuffert und im Anschluss mit Fyn-Kinase in einem molaren Verhältnis von 1:20 (Enzym:Substrat) versetzt. Der Ansatz wird bei Raumtemperatur inkubiert. Im Fall von ADAP genügt eine Inkubationsdauer von 16h, in den Fällen der Konstrukte Snap-595, Snap-EEI und Snap-SH3n werden über 3d bei Raumtemperatur inkubiert, wobei nach 24h frisches ATP (Endkonzentration des Zusatzes 2 mM) zugegeben wird.

1× Phosphorylierungspuffer:

50 mM	Tris/HCl pH 7,5
150 mM	NaCl
9,5 mM	MgCl ₂
0,5 mM	MnCl ₂
2 mM	EGTA

Jeweils frisch zugesetzt werden:

0,4 mM	Na ₃ VO ₄
2 mM	DTT
4 mM	ATP

8.2.5.2. Synthese Phosphoramidat-haltiger Proteine

Zur Synthese Phosphoramidat-haltiger Proteine wird ein AzPhe-haltiges Protein in 50 mM Phosphat, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0 umgepuffert. Das Caging-Phosphit wird im selben Puffer zu einer Konzentration von 8 mM angelöst. Zu 20 µl umgepufferten Azidoprotein werden 20 µl der Caging-Phosphit Stocklösung zugegeben und durch Pipettieren vermischt. Die Reaktion wird durch Lagerung über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Beedingung der Reaktion wird der Reaktionsansatz mit 760 µl 50 mM Phosphat, 300 mM NaCl, 0,05% Tween-20, pH 8,0 verdünnt und auf Ni-NTA Magnetkügelchen (Qiagen) gebunden, um überschüssiges Phosphit zu entfernen. Die Kügelchen werden zweimal mit Ni-NTA Waschpuffer gewaschen und anschließend in 40 µl 20 mM Tris/HCl, 250 mM Imidazol pH 8,0 eluiert. Im Anschluss werden die photolabilen Schutzgruppen durch Belichtung mit einem uv-Laser für 90 sec entschützt (Spectron-Laser.

Pulsfrequenz: 10 Hz, Pulsdauer: 10ns, Pulsenergie: 50 nJ). Im Anschluss wurde das entschützte Protein sofort weiter untersucht. Alternativ konnte die entschützung auf erfolgreich in den folgenden sogenannten Photopuffer beobachtet werden:

Photopuffer :		Photo 500:	
1×	PBS	500 mM	Na ₂ HPO ₄ pH 8,0
100 mM	Semicarbazid	150 mM	NaCl
40 mM	Acscorbinsäure	mit den gleichen Zusätzen an Semi-	
2% (v/v)	DMSO	carbazid, Ascorbinsäure und DMSO	

8.2.5.2.1. Synthese des Caging-Phosphits

Das lichtentschützbare Caging-Phosphit Tris (4-(2,5,8,11,14-Pentaoxahexadecan-16-yloxy)-5-Methoxy-2-Nitrobenzyl)-Phosphit sowie dessen Synthesevorschrift wurden von Serwa et al., 2009 publiziert und kann dort entnommen werden. Das verwendete Probenmaterial wurde von Mitgliedern der AG Hackenberger der Vorschrift gemäß dargestellt und von selbigen bezogen.

8.2.5.3. Staudinger Ligation mit DyLight-650

AzPhe-haltige Proteine werden zur Markierung in 1× PBS umgepuffert. Eine Arbeitslösung des kommerziell erhältlichen DyLight-650 Phosphin (ThermoFisher) einer Konzentration von 100 nM wird durch Verdünnung der Hauptlösung (1 mM in DMSO) in 1× PBS angesetzt und im vierfachen Überschuss dem Protein zugesetzt. Die Reaktion kann entweder durch Inkubation für 3h bei 37 °C oder übernacht bei 4 °C durchgeführt werden. Nach Abschluss der Inkubation wird der überschüssige Farbstoff durch Gelfiltration in einem Proteinentsalzungssäulchen (Pierce) entfernt.

Die Hauptlösung des Farbstoffs wird bei -20 °C gelagert.

9. Literaturverzeichnis

- Agard NJ, Prescher JA, Bertozzi CR. (2004). A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 15046–15047.
- Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T (2004). Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*, 117, 699–711.
- Andersen JN, Jansen PG, Echwald SM, Mortensen OH, Fukada T, Del Vecchio R, Tonks NK, Moller NP (2004) A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. *FASEB J*, 18, 8–30.
- Andersen JN, Mortensen OH, Peters GH, Drake PG, Iversen LF, Olsen OH, Jansen PG, Andersen HS, Tonks NK, Moller NP (2001). Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol Cell Biol*, 21, 7117–7136.
- Anderson JC, Wu N, Santoro SW, Lakshman V, King DS, Schultz PG. (2004). An expanded genetic code with a functional quadruplet codon. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 7566-75671.
- Antonetti DA, Algenstaedt P, Kahn CR (1996). Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain. *Mol Cell Biol.*, 16, 2195-2203.
- Arasada R, Pollard TD (2011) Distinct roles for F-BAR proteins Cdc15p and Bzz1p in actin polymerization at sites of endocytosis in fission yeast. *Curr Biol*, 21, 1450-1459.
- Athavankar S, Peterson BR. (2003). Control of gene expression with small molecules: biotin-mediated acylation of targeted lysine residues in recombinant yeast. *Chem Biol.*, 10, 1245-1253.
- Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, Zhang XF (2001). Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res.*, 56, 127-155.
- Bae JH, Lew ED, Yuzawa S, Tomé F, Lax I, Schlessinger J (2009). The selectivity of receptor tyrosine kinase signaling is controlled by a secondary SH2 domain binding site. *Cell*, 138, 514–524.
- Baker BM, Murphy KP (1997). Dissecting the energetics of a protein-protein interaction: the binding of ovomucoid third domain to elastase. *J Mol Biol*, 268, 557-569.
- Baranov VI, Spirin AS (1993). Gene expression in cell-free systems on preparative scale. *Methods Enzymol*, 217, 123-142.
- Barton WA, Tzvetkova-Robev D, Miranda EP, Kolev MV, Rajashankar KR, Himanen JP, Nikolov DB (2006). Crystal structures of the Tie2 receptor ectodomain and the angiopoietin-2-Tie2 complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13, 524–532.
- Baskin JM, Prescher JA, Laughlin ST, Agard NJ, Chang PV, Miller IA, Lo A, Codelli JA, Bertozzi CR. (2007). Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104, 16793-16797.
- Benovic JL, Mayor F Jr, Somers RL, Caron MG, Lefkowitz RJ (1986). Light-dependent phosphorylation of rhodopsin by β -adrenergic receptor kinase. *Nature*, 321, 869-872.
- Benes CH, Wu N, Elia AE, Dharia T, Cantley LC, Soltoff SP (2005). The C2 domain of PKCdelta is a phosphotyrosine binding domain. *Cell.*, 121, 271-80.
- Bibbins, K.B., Boeuf, H. and Varmus, H.E. (1993) Binding of the Src SH2 domain to phosphopeptides is determined by residues in both the SH2 domain and the phosphopeptides. *Mol. Cell. Biol.*, 13, 7278–7287.
- Böhrsch V, Mathew T, Zieringer M, Vallee MRJ, Artner LM, Dervedde J, Haag R, Hackenberger CPR (2012). Chemoselective Staudinger-phosphite reaction of symmetrical glycosyl-phosphites with azido-peptides and polyglycerols [sic!]. *Org Biomol Chem*, 10, 6211-6216.
- Böhrsch V, Serwa R, Majkut P, Krause E, Hackenberger CP (2010). Site-specific functionalisation of proteins by a Staudinger-type reaction using unsymmetrical phosphites. *Chem. Commun*, 46, 3176-3178.

- Borrmann A, Milles S, Plass T, Dommerholt J, Verkade JM, Wiessler M, Schultz C, van Hest JC, van Delft FL, Lemke EA (2012). Genetic encoding of a bicyclo[6.1.0]nonyne-charged amino acid enables fast cellular protein imaging by metal-free ligation. *ChemBiochem*, 13, 2094-2099.
- Borsook H (1950). Protein turnover and incorporation of labelled amino acids into tissue proteins in vivo and in vitro. *Physiol Rev.*, 30, 216-290.
- Bryant SS, Mitchell AL, Collins F, Miao W, Marshall M, Jove R (1996). N-terminal sequences contained in the Src homology 2 and 3 domains of p120 GTPase-activating protein are required for full catalytic activity toward Ras. *J Biol Chem.*, 271, 5195-5199.
- Burbach BJ, Srivastava R, Ingram MA, Mitchell JS, Shimizu J (2011). The pleckstrin homology domain in the SKAP55 adapter protein defines the ability of the adapter protein ADAP to regulate integrin function and NF- κ -B activation. *J Immunol*, 186, 6227-6237.
- Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TPJ, Leahy DJ, Lemmon, MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokoyama S. (2003). An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol. Cell*, 12, 541-552.
- Carl Ludwig: Diffusion zwischen ungleich erwärmten Orten gleich zusammengesetzter Lösungen. *Sitzungsbericht. Kaiser. Akad. Wiss. (Mathem.-Naturwiss. Cl.)*, Wien, 65: 539. 1856.
- Chacko BM, Qin B, Correia JJ, Lam SS, de Caestecker MP, Lin K. (2001). The L3 loop and C-terminal phosphorylation jointly define Smad protein trimerization. *Nat Struct Biol.*; 8, 248-53.
- Charles Soret: Sur l'état d'équilibre que prend, du point de vue de sa concentration, une dissolution saline primitivement homogène, dont deux parties sont portées à des températures différentes. *Archives de Genève*, 3e période, tome II, p. 48; 1879.
- Chen CC, Smith DL, Bruegger BB, Halpern RM, Smith RA (1974). Occurrence and distribution of acid-labile histone phosphates in regenerating rat liver. *Biochemistry*, 13, 3785-3789.
- Chen CC, Bruegger BB, Kern CW, Lin YC, Halpern RM, Smith RA (1977). Phosphorylation of nuclear proteins in rat regenerating liver. *Biochemistry*, 16, 4852-4865.
- Chen H, Ma J, Li W, Eliseenkova AV, Xu C, Neubert TA, Miller WT, Mohammadi M. (2007). A molecular brake in the kinase hinge region regulates the activity of receptor tyrosine kinases. *Mol. Cell*, 27, 717-730.
- Chin JW, Santoro SW, Martin AB, King DS, Wang L, Schultz PG. (2002a). Addition of p-azido-L-phenylalanine to the genetic code of *Escherichia coli*. *J Am Chem Soc.*, 124, 9026-9027.
- Chin JW, Martin AB, King DS, Wang L, Schultz PG. (2002b). Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 11020-11024.
- Chin JW. (2011). Reprogramming the genetic code. *EMBO J.*, 30, 2312-2324.
- Chishti AH et al. (1998). The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem Sci.*, 23, 281-282.
- Christofk, H.R., Vander Heiden, M.G., Wu, N., Asara, J.M. and Cantley, L.C. (2008) Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature*, 452, 181-186.
- Cobb, M.H., Sang, B.C., Gonzalez, R., Goldsmith, E., and Ellis, L. (1989). Auto-phosphorylation activates the soluble cytoplasmic domain of the insulin receptor in an intermolecular reaction. *J. Biol. Chem.*, 264, 18701-18706.
- Craig D, Howell MT, Gibbs CL, Hunt T, Jackson RJ. (1992). Plasmid cDNA-directed protein synthesis in a coupled eukaryotic in vitro transcription-translation system. *Nucleic Acids Res.*, 20, 4987-4995.
- da Silva AJ, Li Z, de Vera C, Canto E, Findell P, Rudd CE. (1997). Cloning of a novel T-cell protein FYB that binds FYN and SH2-domain-containing leukocyte protein 76 and modulates interleukin 2 production. *Proc Natl Acad Sci*, 94, 7493-7498.
- Dawson PE, Muir TW, Clark-Lewis I, Kent SB. (1994). Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*, 266, 776-779.

- Devaraj NK, Upadhyay R, Haun JB, Hilderbrand SA, Weissleder R (2009). Fast and sensitive pretargeted labeling of cancer cells through a tetrazine/trans-cyclooctene cycloaddition. *Angew Chem Int Ed*; 48, 7013-7016.
- DeVries JK, Zubay G (1967). DNA-directed peptide synthesis. II. The synthesis of the alpha-fragment of the enzyme beta-galactosidase. *Proc Natl Acad Sci USA*; 57, 1010–1012.
- Duhr S, Arduini S, Braun D (2004). Thermophoresis of DNA determined by microfluidic fluorescence. *Eur Phys J E Soft Matter*, 15, 277-286.
- Duhr S, Braun D (2006). Why molecules move along a temperature gradient. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 19678-19682.
- Dunant NM, Messerschmitt AS, Ballmer-Hofer K (1997). Functional interaction between the SH2 domain of Fyn and tyrosine 324 of hamster polyomavirus middle-T antigen. *J. Virol*, 71, 199-206.
- Durocher D, Henckel J, Fersht AR, Jackson SP. (1999). The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif. *Mol. Cell*, 4, 387-394.
- Elsholz AK, Turgay K, Michalik S, Hessling B, Gronau K, Oertel D, Mäder U, Bernhardt J, Becher D, Hecker M, Gerth U. (2012). Global impact of protein arginine phosphorylation on the physiology of *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 7451-7456.
- End P, Gout I, Fry MJ, Panayotou G, Dhand R, Yonezawa K, Kasuga M, Waterfield MD (1993). A biosensor approach to probe the structure and function of the p85 alpha subunit of the phosphatidylinositol 3-kinase complex. *J Biol Chem*, 268,10066-10075.
- Ettmayer P, France D, Gounarides J, Jarosinski M, Martin MS, Rondeau JM, Sabio M, Topiol S, Weidmann B, Zurini M, Bair KW. (1999). Structural and conformational requirements for high-affinity binding to the SH2 domain of Grb2(1). *J Med Chem*, 42, 971-980.
- Favelyukis, S., Till, J.H., Hubbard, S.R., and Miller, W.T. (2001). Structure and autoregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* , 8, 1058–1063.
- Frese S, Schubert WD, Findeis AC, Marquardt T, Roske YS, Stradal TE, Heinz DW. (2006). The phosphotyrosine peptide binding specificity of Nck1 and Nck2 Src homology 2 domains. *J Biol Chem.*, 281,18236-18245.
- Fuhrmann J, Schmidt A, Spiess S, Lehner A, Turgay K, Mechtler K, Charpentier E, Clausen T (2009). McsB is a protein arginine kinase that phosphorylates and inhibits the heat-shock regulator CtsR. *Science*, 324, 1323–1327.
- Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Zhu HJ, Walker F, Frenkel MJ, Hoyne PA, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW, Ward CW. (2002). Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 110, 763–773.
- Geng L, Raab M, Rudd CE (1999). Cutting edge: SLP-76 cooperativity with FYB/FYN-T in the Up-regulation of TCR-driven IL-2 transcription requires SLP-76 binding to FYB at Tyr595 and Tyr651. *J Immunol*. 1999 Dec 1;163(11):5753-7.
- Geoghegan KF, Stroh JG (1992). Site-directed conjugation of nonpeptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine. *Bioconjug Chem*, 3, 138-46.
- Gerrits M, Strey J, Claußnitzer I, von Groll U, Schäfer F, et al. (2007) Cell-free Synthesis of Defined Protein Conjugates by Site-directed Cotranslational Labeling. In: Kudlicki T, Katzen F, Bennett R, editors. *Cell-free Expression*. Austin: Landes Bioscience. pp. 166-180.
- Glover NR, Tracey AS. (1999). Structure, modelling, and molecular dynamics studies of the inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by sulfotyrosine peptides. *Biochem Cell Biol.*, 77, 469-486.
- Gold LM, Schweiger M. (1969). Synthesis of phage-specific alpha- and beta-glucosyl transferases directed by T-even DNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*; 62, 892-898.
- Gold LM, Schweiger M. (1971). Synthesis of bacteriophage-specific enzymes directed by DNA in vitro. *Methods Enzymol*, 20, 537-542.

- Gololobov YG, Kasukhin LF (1992). Recent advances in the staudinger reaction. *Tetrahedron*, 48, 1353-1406.
- Grangeasse C, Cozzone AJ, Deutscher J, Mijakovic I. (2007) Tyrosine phosphorylation: an emerging regulatory device of bacterial physiology. *Trends Biochem Sci*, 32, 86–94.
- Grewal T, Koese M, Tebar F, Enrich C. (2011). Differential Regulation of RasGAPs in Cancer. *Genes Cancer*, 2, 288-297.
- Gruen LC, Kortt AA, Nice E (1993). Determination of relative binding affinity of influenza virus N9 sialidases with the Fab fragment of monoclonal antibody NC41 using biosensor technology. *Eur J Biochem*, 217, 319-325.
- Guan KL, Dixon JE (1991) Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate. *J Biol Chem*, 266, 17026–17030.
- Hackenberger CP, Friel CT, Radford SE, Imperiali B. (2005). Semisynthesis of a glycosylated Im7 analogue for protein folding studies. *J Am Chem Soc*, 127, 12882-12889
- Hackenberger CP, Schwarzer D (2008). Chemoselective ligation and modification strategies for peptides and proteins. *Angew Chem Int Ed Engl*, 47, 10030-10074
- Hao B, Gong W, Ferguson TK, James CM, Krzycki JA, Chan MK (2002). A new UAG-encoded residue in the structure of a methanogen methyltransferase. *Science*, 296, 1462-1466.
- Hao M, Lowy AM, Kapoor M, Deffie A, Liu G, Lozano G. (1996). Mutation of phosphoserine 389 affects p53 function in vivo. *J Biol Chem*, 271, 29380–85.
- Hause RJ Jr, Leung KK, Barking JL, Ciaccio MF, Chuu CP, Jones RB (2012). Comprehensive Binary Interaction Mapping of SH2 Domains via Fluorescence Polarization Reveals Novel Functional Diversification of ErbB Receptors. *PLoS One*, 7, e44471.
- Heuer K, Arbuzova A, Strauss H, Kofler M, Freund C. (2005). The helically extended SH3 domain of the T cell adaptor protein ADAP is a novel lipid interaction domain. *J Mol Biol*, 348, 1025-1035.
- Heuer K, Kofler M, Langdon G, Thiemke K, Freund C. (2004). Structure of a helically extended SH3 domain of the T cell adapter protein ADAP. *Structure*, 12, 603-610.
- Himanen JP, and Nikolov DB (2003). Eph signaling: a structural view. *Trends Neurosci*, 26, 46–51.
- Hoffhines AJ, Damoc E, Bridges KG, Leary JA, Moore KL (2006). Detection and purification of tyrosine-sulfated proteins using a novel anti-sulfotyrosine monoclonal antibody. *J Biol Chem*, 281, 37877-37887.
- Hogg N, Laschinger M, Giles K, McDowall A (2003). T-cell integrins: More than just sticking points. *J Cell Sci*, 116, 4695-4705.
- Huang J, Tilly D, Altman A, Sugie K, Grey HM. (2000). T-cell receptor antagonists induce Vav phosphorylation by selective activation of Fyn kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 10923-10929.
- Huang H, Li L, Wu C, Schibli D, Colwill K, Ma S, Li C, Roy P, Ho K, Songyang Z, Pawson T, Gao Y, Li SS (2008). Defining the specificity space of the human SRC homology 2 domain. *Mol Cell Proteomics*, 7, 768-784.
- Huisgen R (1963). 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew Chem Int Ed*, 2, 565-598.
- Hunter T, Sefton BM. (1980) Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77, 1311-1315.
- Imhof D, Wavreille AS, May A, Zacharias M, Tridandapani S, Pei D. (2006). Sequence specificity of SHP-1 and SHP-2 Src homology 2 domains. Critical roles of residues beyond the pY+3 position. *J. Biol. Chem*, 281, 20271–20282.
- IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997).
- Jadwin JA, Ogiue-Ikeda M, Machida K. (2012). The application of modular protein domains in proteomics. *FEBS Lett*, 586, 2586-2596.

- Jelesarov I, Bosshard HR (1999). Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J Mol Recognit*, 12, 3-18.
- Jia Z, Barford D, Flint AJ, Tonks NK (1995). Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B. *Science*, 268, 1754–1758.
- Johnson LN, Noble ME, Owen DJ (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell*, 85, 149-158.
- Jones RB, Gordus A, Krall JA, MacBeath G (2006). A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays. *Nature*, 439, 168–174.
- Ju T, Niu W, Cerny R, Bollman J, Roy A, Guo J. (2013). Molecular recognition of sulfotyrosine and phosphotyrosine by the Src homology 2 domain. *Mol Biosyst.*, 9, 1829-32.
- Kaneko T, Huang H, Cao X, Li X, Li C, Voss C, Sidhu SS, Li SS. (2012). Superbinder SH2 Domains Act as Antagonists of Cell Signaling. *Sci Signal.* , 5, ra68.
- Kaneko T, Huang H, Zhao B, Li L, Liu H, Voss CK, Wu C, Schiller MR, Li SS. (2010). Loops govern SH2 domain specificity by controlling access to binding pockets. *Sci Signal*, 3, ra34.
- Kaushansky A, Gordus A, Chang B, Rush J, MacBeath G (2008a). A quantitative study of the recruitment potential of all intracellular tyrosine residues on EGFR, FGFR1 and IGF1R. *Mol Biosyst*, 4, 643–653.
- Kaushansky A, Gordus A, Budnik BA, Lane WS, Rush J, MacBeath G. (2008b). System-wide investigation of ErbB4 reveals 19 sites of Tyr phosphorylation that are unusually selective in their recruitment properties. *Chem Biol*, 15, 808–817.
- Kavanaugh, W.M., Turck, C.W., Williams, L.T. (1995) PTB domain binding to signaling proteins through a sequence motif containing phosphotyrosine. *Science*, 268, 1177–1179.
- Keppler A, Gendreizig S, Gronemeyer T, Pick H, Vogel H, Johnsson K (2003). A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nat Biotechnol*, 21, 86-89.
- Keppler A, Pick H, Arrivoli C, Vogel H, Johnsson K (2004). Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells. *Proc Natl Acad Sci*, 101, 9955-9999.
- Kiga D, Sakamoto K, Kodama K, Kigawa T, Matsuda T, Yabuki T, Shirouzu M, Harada Y, Nakayama H, Takio K, Hasegawa Y, Endo Y, Hirao I, Yokoyama S (2002). An engineered Escherichia coli tyrosyl-tRNA synthetase for site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in eukaryotic translation and its application in a wheat germ cell-free system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 9715-20.
- Kim J, Sitaraman S, Hierro A, Beach BM, Odorizzi G, Hurley JH (2005). Structural basis for endosomal targeting by the Bro1 domain. *Dev Cell*, 8, 937–947.
- Ksionda O, Saveliev A, Köchl R, Rapley J, Faroudi M, Smith-Garvin JE, Wülfing C, Rittinger K, Carter T, Tybulewicz VL (2012). Mechanism and function of Vav1 localisation in TCR signalling. *J Cell Sci*, 125, 5302-5314.
- Labadia ME, Jakes S, Grygon CA, Greenwood DJ, Schembri-King J, Lukas SM, Warren TC, Ingraham RH (1997). Interaction between the SH2 domains of ZAP-70 and the tyrosine-based activation motif 1 sequence of the zeta subunit of the T-cell receptor. *Arch Biochem Biophys*, 342, 117-125.
- Ladbury JE., Lemmon MA, Zhou M, Green J, Botfield MC, Schlessinger J (1995). Measurement of the binding of tyrosyl phosphopeptides to SH2 domains: a reappraisal. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 3199-3203.
- Kuropka B, Witte A, Sticht J, Majkut P, Kliche S, Schraven B, Krause E, Freund C (2013). A structured tyrosine phosphorylation site of ADAP interacts with ZAP70 and functions inside-out-signaling. *Manuscript in preparation*.
- Ladbury JE, Arold ST (2011). Energetics of Src homology domain interactions in receptor tyrosine kinase-mediated signalling. *Methods Enzymol*, 488, 147–183.

- Lamoureaux TL, Lee DH (2011). Chemical activation of MEK1—a redox trigger for evaluating the effects of phosphorylation. *Chem Commun*, 47, 8623-5.
- Lange G, Lesuisse D, Deprez P, Schoot B, Loenze P, Bénard D, Marquette JP, Broto P, Sarubbi E, Mandine E. (2003). Requirements for specific binding of low affinity inhibitor fragments to the SH2 domain of (pp60)Src are identical to those for high affinity binding of full length inhibitors. *J Med Chem.*, 46, 5184-5195.
- Lange S, Sylvester M, Schümann M, Freund C, Krause E. (2010). Identification of phosphorylation-dependent interaction partners of the adapter protein ADAP using quantitative mass spectrometry: SILAC vs (18)O-labeling. *J Proteome Res.*, 9, 4113-4122.
- Lederman M, Zubay G (1967). DNA-directed peptide synthesis. I. A comparison of T2 and Escherichia coli DNA-directed peptide synthesis in two cell-free systems. *Biochem Biophys Acta*, 149, 253-258.
- Lemmon MA, Schlessinger J. (2010). Cell Signalling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell*, 141, 1117-1134.
- Lemmon MA.(2008) Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 9, 99-111.
- Li SC, Zwahlen C, Vincent SJ, McGlade CJ, Kay LE, Pawson T, Forman-Kay JD (1998). Structure of a Numb PTB domain-peptide complex suggests a basis for diverse binding specificity. *Nat Struct Biol.*, 5,1075-83.
- Link AJ, Tirrell DA. (2003). Cell surface labeling of Escherichia coli via copper(I)-catalyzed [3+2] cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc*, 125, 11164–11165.
- Lisman J, Schulman H, Cline H (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci*; 3, 175-190.
- Liu BA, Engelmann BW, Nash PD (2012). The Language of SH2 Domain Interactions Defines Phosphotyrosine-Mediated Signal Transduction. *FEBS Lett*, 586, 2597.
- Liu BA, Shah E, Jablonowski K, Stergachis A, Engelmann B, Nash PD. (2011). The SH2 domain-containing proteins in 21 species establish the provenance and scope of phosphotyrosine signaling in eukaryotes. *Sci. Signal.*, 4, ra83.
- Liu CC, Schultz PG (2006). Recombinant expression of selectively sulfated proteins in Escherichia coli. *Nat Biotechnol.*, 24, 1436-40.
- Los GV et al. (2008). HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem Biol*, 3, 373-382.
- Luo BH, Carman CV, Springer TA (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol.*, 25, 619-647.
- Macek B, Mijakovic I, Olsen JV, Gnad F, Kumar C, Jensen PR, Mann M (2007). The Serine/Threonine/Tyrosine Phosphoproteome of the Model Bacterium Bacillus subtilis. *Mol Cell Proteomics*. 6, 697-707.
- Madin K, Sawasaki T, Ogasawara T, Endo Y (2000). A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 559-564.
- Mamchak AA, Sullivan BM, Hou B, Lee LM, Gilden JK, Krummel MF, Locksley RM, DeFranco AL (2008). Normal development and activation but altered cytokine production of Fyn-deficient CD4+ T cells. *J Immunol*, 181, 5374-5385.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298, 1912-1934.
- Matthaei JH, Nirenberg MW (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in E. coli upon RNA prepared from ribosomes. *Biochem Biophys Res Commun*, 4, 404-408.
- Mayer BJ. (2001) SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci.*, 114, 1253-1263.

- Meins M, Jenö P, Müller D, Richter WJ, Rosenbusch JP, Erni B. (1993). Cysteine phosphorylation of the glucose transporter of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 268, 11604–11609.
- Merk H, Meschkat D, Stiege W (2003) Expression-PCR: from Gene Pools to Purified Proteins Within 1 Day. In: Swartz JR, editor. *Cell-Free Protein Expression*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer. pp. 15-23.
- Mohammadi, M., Schlessinger, J., and Hubbard, S.R. (1996). Structure of the FGF receptor tyrosine kinase domain reveals a novel autoinhibitory mechanism. *Cell*, 86, 577–587.
- Mohebiany AN, Nikolaienko RM, Bouyain S, Harroch S (2012). Receptor-type tyrosine phosphatase ligands: looking for the needle in the haystack. *FEBS J.*, 280, 388-400.
- Möller H, Böhrsch V, Bentrop J, Bender J, Hinderlich S, Hackenberger CP. (2012). *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51, 5986-5990.
- Muir TW, Sondhi D, Cole PA (1998). Expressed protein ligation: a general method for protein engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 6705-6710.
- Mukherjee M, Chow SY, Yusoff P, Seetharaman J, Ng C, Sinniah S, Koh XW, Asgar NF, Li D, Yim D, Jackson RA, Yew J, Qian J, Iyu A, Lim YP, Zhou X, Sze SK, Guy GR, Sivaraman J. (2012). Structure of a novel phosphotyrosine-binding domain in Hakai that targets E-cadherin. *EMBO J.*, 31, 1308–1319.
- Musci MA, Hendricks-Taylor LR, Motto DG, Paskind M, Kamens J, Turck CW, Koretzky GA (1997). Molecular cloning of SLAP-130, an SLP-76-associated substrate of the T cell antigen receptor-stimulated protein tyrosine kinases. *J Biol Chem.*, 272, 11674-11677.
- Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM, Shaw AS. (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell.*; 84, 889-897.
- Neel BG, Gu H, Pao L. (2003). The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci.*, 28, 284-293.
- Nilsson BL, Kiessling LL, Raines RT (2000). Staudinger ligation: a peptide from a thioester and azide. *Org Lett.*, 2, 1939-41.
- Nirenberg MW, Matthaei JH (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 47, 1588–1602.
- Nuoffer C, Zanolari B, Erni B (1988). Glucose permease of *Escherichia coli*. The effect of cysteine to serine mutations on the function, stability, and regulation of transport and phosphorylation. *J Biol Chem*, 263, 6647–6655.
- Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M. (2006) Global, in vivo and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*, 127, 635-48.
- Pamonsinlapatham P, Hadj-Slimane R, Lepelletier Y, Allain B, Toccafondi M, Garbay C, Raynaud F (2009). p120-Ras GTPase activating protein (RasGAP): a multi-interacting protein in downstream signaling. *Biochimie*, 91, 320-328.
- Pannifer AD, Flint AJ, Tonks NK, Barford D (1998). Visualization of the cysteinyl-phosphate intermediate of a protein-tyrosine phosphatase by x-ray crystallography. *J Biol Chem*, 273, 10454–10462.
- Park HS, Hohn MJ, Umehara T, Guo LT, Osborne EM, Benner J, Noren CJ, Rinehart J, Söll D (2011). Expanding the genetic code of *Escherichia coli* with phosphoserine. *Science*, 333, 1151-1154.
- Patterson KI, Brummer T, O'Brien PM, Daly RJ (2009). Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem J*, 418, 475–489.
- Pawson T, Gish GD (1992) SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell*, 71, 359-62.
- Pawson T, Gish GD, Nash P. (2001). SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol*, 11, 504-511.
- Pawson T, Nash P (2003) Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science*, 300, 445-52.

- Payne G, Stolz LA, Pei D, Band H, Shoelson SE, Walsh CT (1994). The phosphopeptide-binding specificity of Src family SH2 domains. *Chem Biol*, 1, 99-105.
- Pelham HR, Jackson RJ (1976). An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem*, 67, 247-256.
- Perler, F. B. (2002). InBase, the Intein Database. *Nucleic Acids Res.* 30, 383-384.
- Peterson EA, Greenberg DM (1952). Characteristics of the amino acid-incorporating system of liver homogenates. *J Biol Chem*, 194, 359-375.
- Plass T, Milles S, Koehler C, Szymański J, Mueller R, Wiessler M, Schultz C, Lemke EA. (2012). Amino acids for Diels-Alder reactions in living cells. *Angew Chem Int Ed*, 51, 4166-4170.
- Pollard TD (2010). A Guide to Simple and Informative Binding Assays. *Mol. Cell. Biol.*, 21, 4061-4067.
- Pollard TD, Earnshaw WC (2007). *Cell Biology*. Second Edition. W. B. Saunders, New York. pp. 902.
- Potter LR, Hunter T. (1998) Phosphorylation of the kinase homology domain is essential for activation of the A-type natriuretic peptide receptor. *Mol Cell Biol.*, 18, 2164–72.
- Raab M, da Silva AJ, Findell PR, Rudd CE (1997). Regulation of Vav-SLP-76 binding by ZAP-70 and its relevance to TCR zeta/CD3 induction of interleukin-2. *Immunity*, 6, 155-164.
- Roberts BE, Paterson BM (1973). Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 2330–2334.
- Robertson SA, Noren CJ, Anthony-Cahill SJ, Griffith MC, Schultz PG (1989). The use of 5'-phospho-2 deoxyribocytidylylriboadenosine as a facile route to chemical aminoacylation of tRNA. *Nucleic Acids Res.*, 17, 9649-9660.
- Robinson DR, Wu YM, Lin SF (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, 19, 5548-5557.
- Rostovtsev VV, Green LG, Fokin VV, Sharpless KB. (2002). A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed*, 41, 2596–2599.
- Saito K, Tautz L, Mustelin T (2007). The lipid-binding SEC14 domain. *Biochim Biophys Acta*, 1771, 719–726.
- Sako D, Comess KM, Barone KM, Camphausen RT, Cumming DA, Shaw GD. (1995). A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding. *Cell*; 83, 323-31.
- Satyanarayana A, Kaldis P (2009). Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*, 28, 2925-39.
- Saxon E, Bertozzi CR (2000). Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction. *Science*, 287, 2007-2010.
- Saxon E, Armstrong JI, Bertozzi CR (2000). A "Traceless" Staudinger Ligation for the Chemoselective Synthesis of Amide Bonds. *Org. Lett.*, 2, 2141-2143.
- Schaller GE, Shiu SH, Armitage JP. (2011). Two-component systems and their co-option for eukaryotic signal transduction. *Curr Biol*. 21(9), R320-30.
- Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahimi OA, Eliseenkova AV, Yeh BK, Yayon A, Linhardt RJ, Mohammadi M (2000). Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol. Cell*, 6, 743–750.
- Seet BT, Dikic I, Zhou MM, Pawson T. (2006). Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 7, 473-83.
- Serwa R, Majkut P, Horstmann B, Swiecicki JM, Gerrits M, Krause E, Hackenberger CP. (2010). Site-specific PEGylation of proteins by a Staudinger-phosphite reaction. *Chem Sci*, 1, 596-602.

- Serwa R, Wilkening I, Del Signore G, Mühlberg M, Claussnitzer I, Weise C, Gerrits M, Hackenberger CP (2009). Chemoselective Staudinger-Phosphite Reaction of Azides for the Phosphorylation of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48, 8234-8239.
- Siekevitz P, Zamecnik PC (1951). In vitro incorporation of 1-C-¹⁴C-DL-alanine into proteins of rat liver granular fractions. *Fed Proc*, 10, 246-247.
- Sletten EM, Bertozzi CR. (2011). From mechanism to mouse: a tale of two bioorthogonal reactions. *Acc Chem Res.*, 44, 666-76.
- Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Xu J, Marfatia SM, Chishti AH, Crompton A, Chan AC, Anderson JM, Cantley LC. (1997). Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science.*, 275, 73-77.
- Spirin AS (1991). Cell-free protein synthesis bioreactor. In: Todd P, Sikdar SK, Beer M (eds) *Frontiers in Bioprocessing II*. American Chemical Society, Washington, DC, pp 31-43.
- Springer TA (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*, 76, 301-314.
- Stahelin RV, Kong KF, Raha S, Tian W, Melowic HR, Ward KE, Murray D, Altman A, Cho W (2012). Protein kinase C θ C2 domain is a phosphotyrosine binding module that plays a key role in its activation. *J Biol Chem.*, 287, 30518-28.
- Staudinger H, Meyer J (1919). Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylenderivate und Phosphinimine. *Helv. Chim. Acta*, 2, 635-646.
- Stephanowitz H, Lange S, Lang D, Freund C, Krause E. (2012). Improved two-dimensional reversed phase-reversed phase LC-MS/MS approach for identification of peptide-protein interactions. *J Proteome Res.*, 11, 1175-1183.
- Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN (2000). Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 69, 183-215.
- Stone MJ, Chuang S, Hou X, Shoham M, Zhu JZ. (2009). Tyrosine sulfation: an increasingly recognised post-translational modification of secreted proteins. *N Biotechnol*; 25, 299-317.
- Sun F, Ding Y, Ji Q, Liang Z, Deng X, Wong CC, Yi C, Zhang L, Xie S, Alvarez S, Hicks LM, Luo C, Jiang H, Lan L, He C (2012). Protein cysteine phosphorylation of SarA/MgrA family transcriptional regulators mediates bacterial virulence and antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109: 15461-15466.
- Swerdel MR, Fallon AM. (1989). Cell-free translation in lysates from *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) cells. *Comp Biochem Physiol B.*, 93, 803-806.
- Tan CS, Bodenmiller B, Pasulescu A, Jovanovic M, Hengartner MO, Jørgensen C, Bader GD, Aebersold R, Pawson T, Linding R (2009). Comparative analysis reveals conserved protein phosphorylation networks implicated in multiple diseases. *Sci Signal*, 2, ra39.
- Tarrant MK, Cole PA. (2009) The chemical biology of protein phosphorylation. *Annu Rev Biochem.*, 78, 797-825.
- Thomason P, Kay R. (2000) Eukaryotic signal transduction via histidine-aspartate phosphorelay. *J Cell Sci.* 113, 3141-50.
- Thorsness PE, Koshland DE Jr. (1987) Inactivation of isocitrate dehydrogenase by phosphorylation is mediated by the negative charge of the phosphate. *J Biol Chem.*, 262, 10422-25.
- Tian WQ, Wang YA (2004). Mechanisms of Staudinger Reactions within Density Functional Theory. *J. Org. Chem.*, 69, 4299-4308.
- Tong L, Warren TC, Lukas S, Schembri-King J, Betageri R, Proudfoot JR, Jakes S. (1998). Carboxymethyl-phenylalanine as a replacement for phosphotyrosine in SH2 domain binding. *J Biol Chem.*, 273, 20238-20242.
- Tonks NK (2006). Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 833-846.

- Tonks NK (2012). Protein tyrosine phosphatases – from house keeping enzymes to master regulators of signal transduction. *FEBS J*, 280, 346-378.
- Tonks NK, Diltz CD, Fischer EH (1988). Characterization of the major protein tyrosine phosphatases of human placenta. *J Biol Chem*, 263, 6731–6737.
- Tornøe CW, Christensen C, Meldal M. (2002). Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem*, 67, 3057–3064.
- Uhlik MT, Temple B, Bencharit S, Kimple AJ, Siderovski DP, Johnson GL. (2005). Structural and evolutionary division of phosphotyrosine binding (PTB) domains. *J. Mol. Biol.*, 345, 1-20.
- Vallée MRJ, Artner LM, Dervede J, Hackenberger CP (2013). Alkyne phosphonites for sequential azide-azide couplings. *Angew. Chem. Int. Ed*, 52, 9504-9508.
- Vallée MRJ, Majkut P, Wilkening I, Müller G, Hackenberger CP (2011). Staudinger-Phosphonite Reactions for the Chemoselective Transformation of Azido-Containing Peptides and Proteins. *Org. Lett.*, 13, 5440–5443.
- van Agthoven T, van Agthoven TL, Dekker A, van der Spek PJ, Vreede L, Dorssers LC (1998). Identification of BCAR3 by a random search for genes involved in antiestrogen resistance of human breast cancer cells. *EMBO J.*, 17, 2799-2808.
- van der Linden WA, Li N, Hoogendoorn S, Ruben M, Verdoes M, Guo J, Boons GJ, van der Marel GA, Florea BI, Overkleeft HS. (2012). Two-step bioorthogonal activity-based proteasome profiling using copper-free click reagents: a comparative study. *Bioorg Med Chem.*, 20, 662-666.
- Waksman G, Kominos D, Robertson SC, Pant N, Baltimore D, Birge RB, Cowburn D, Hanafusa H, Mayer BJ, Overduin M, Resh MD, Rios CB, Silverman L, Kuriyan J. (1992) Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides. *Nature* 358, 646–653.
- Waksman G, Shoelson SE, Pant N, Cowburn D, Kuriyan J (1993). Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: crystal structures of the complexed and peptide-free forms. *Cell*, 72, 779–790.
- Wang DS.; Shaw G (1995). The association of the C-terminal region of beta I sigma II spectrin to brain membranes is mediated by a PH domain, does not require membrane proteins, and coincides with a inositol-1,4,5 triphosphate binding site. *Biochem Biophys Res Commun.*, 217, 608–615.
- Wang H, Wei B, Bismuth G, Rudd CE (2009). SLP-76-ADAP adaptor module regulates LFA-1 mediated costimulation and T cell motility. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 12436-12441.
- Wang L, Brock A, Herberich B, Schultz PG (2001). Expanding the genetic code of *Escherichia coli*. *Science*, 292, 498-500.
- Wang L, Zhang Z, Brock A, Schultz PG. (2003). Addition of the keto functional group to the genetic code of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci*, 100, 56-61.
- Wang Q, Parrish AR, Wang L. (2009a). Expanding the genetic code for biological studies. *Chem Biol*, 16, 323-336.
- Ward CW, Lawrence MC, Streltsov VA, Adams TE, McKern NM (2007). The insulin and EGF receptor structures: new insights into ligand-induced receptor activation. *Trends Biochem. Sci.*, 32, 129–137.
- Widauer C, Grutzmacher H, Shevchenko I, Gramlich V (1999). Insights into the Staudinger Reaction: Experimental and Theoretical Studies on the Stabilization of cis-Phosphazides. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 10, 1659-1664.
- Winnick T (1950a). Incorporation of labelled amino acids into proteins of embryonic and tumor tissue homogenates. *Fed Proc*, 9, 247.
- Winnick T (1950b). Studies on the mechanism of protein synthesis in embryonic and tumor tissues. II. Inactivation of fetal rat liver homogenates by dialyses and reactivation by the adenylic acids system. *Arch Biochem*, 28, 338-347.

- Xie J, Supekova L, Schultz PG. (2007). A genetically encoded metabolically stable analogue of phosphotyrosine in *Escherichia coli*. *ACS Chem Biol.*, 2, 474-478.
- Xu R, Ayers B, Cowburn D, Muir TW. (1999). Chemical ligation of folded recombinant proteins: segmental isotopic labeling of domains for NMR studies. *Proc Natl Acad Sci*, 2, 388-393.
- Yaffe MB. (2002). Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 3, 177-186.
- Yun M, Wu J, Workman JL, Li B. (2011). Readers of histone modifications. *Cell Res.*, 21, 564-578.
- Zhang H, Zha X, Tan Y, Hornbeck PV, Mastrangelo AJ, Alessi DR, Polakiewicz RD, Comb MJ. (2002) Phosphoprotein analysis using antibodies broadly reactive against phosphorylated motifs. *J Biol Chem*, 277, 39379-87.
- Zhang Y, Wang H. (2012). Integrin signalling and function in immune cells. *Immunology.*, 135, 268-75.
- Zheng W, Zhang Z, Ganguly S, Weller JL, Klein DC, Cole PA.. (2003) Cellular stabilization of the melatonin rhythm enzyme induced by nonhydrolyzable phosphonate incorporation. *Nat Struct Biol.*, 10, 1054-57.
- Ziener MA, Mason A, Carlson DM. (1982). Cell-free translations of proline-rich protein mRNAs. *J Biol Chem.*, 257, 11176-11180.

10. Verzeichnis der erfolgten Publikationen

Majkut P, Claußnitzer I, Merk H, Freund C, Hackenberger CP, Gerrits M (2013). Completion of proteomic data sets by K_d measurement using cell-free synthesis of site-specifically labeled proteins. PLoS ONE, *eingereicht*.

Majkut P, Böhrsch V, Serwa R, Gerrits M, Hackenberger CP (2012). Site-specific modification of proteins by the Staudinger-phosphite reaction. Methods Mol Biol. 2012;794, 241-249.

Böhrsch V, Serwa R, Majkut P, Krause E, Hackenberger CP (2010). Site-specific functionalisation of proteins by a Staudinger-type reaction using unsymmetrical phosphites. Chem. Commun, 46, 3176-3178.

Kuropka B, Witte A, Sticht J, Majkut P, Kliche S, Schraven B, Krause E, Freund C (2013). A structured tyrosine phosphorylation site of ADAP interacts with ZAP70 and functions inside-out-signaling. *Manuskript in Vorbereitung*.

Serwa R, Majkut P, Horstmann B, Swiecicki JM, Gerrits M, Krause E, Hackenberger CP. (2010). Site-specific PEGylation of proteins by a Staudinger-phosphite reaction. Chem Sci, 1, 596-602.

Vallée MRJ, Majkut P, Wilkening I, Müller G, Hackenberger CP (2011). Staudinger-Phosphonite Reactions for the Chemoselective Transformation of Azido-Containing Peptides and Proteins. Org. Lett., 13, 5440–5443.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADAP	Adhesion and degranulation promoting adapter protein
ATP	Adenosin Triphosphat
APS	Amoniumperoxodisulfat
AzPhe	p-Azido-L-Phenylalanin
BCAR3	Breast cancer anti-estrogen resistance 3
CaM	Calmodulin
Carma1	CARD-containing MAGUK protein 1
CD	Cluster of differentiation
cmF	p-Carboymethyl-L-Phenylalanin
DNA	Deoxyrinbonucleinsäure (desoxy ribonuclecleic
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	Disintegrations per minute
DUSP	Dual specificity phosphatase
EGFR	Epidermal growth factor receptor
E-PCR	Expressions-PCR
EPL	Expressed protein ligation
ESI-TOF	Electrospray ionisation – time of flight
FERM	Four-point-one(4.1), Ezrin, Radixin, Moesin
FHA	Forkhead-associated
FITC	Fluoresceinisothiocyant
g	Erdbeschleunigung (9, 81 kg ms ⁻²)
GdmCl	Guanidiniumchlorid
GEF	Guanosinenucleotide exchange factor
GFP	Green fluorescent protein
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanosin Triphosphat
HBS	Hepes buffered saline
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansolfonsäure)
HLFA	Human liver fatty acid binding protein
HYB	Hakai tyrosine bindung
IL	Interleukin
ITC	Isothermal titration calorimetry
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton

K _d	Dissoziationskonstante
K _m	Michaeliskonstante
LAT	Linker for activation of T-cells
Lck	Lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase
M	Molar (mol/l)
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MEK1	MAPK/ERK kinase 1
mRNA	Boten-RNA (messenger-RNA)
MST	Microscale Thermophorese
NCL	Native chemische Ligation
NLS	Nuclear localization signal/sequence
nm	Nanometer
NRTK	Nicht Rezeptor Tyrosinkinase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PDZ	PSD95/SAP90, Discs large, Zonula occludentes-1
PEG	Polyethylenglykol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PH	Pleckstrin homology
PLCG1	Phospholipase C, gamma 1
PIK3R1	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha
PKC	Proteinkinase C
Pmp	p-Phosphonomethyl-L-Phenylalanin
pSer	Phosphoserin
PTB	Phospho tyrosine binding
pThr	Phosphothreonin
PTK	Proteintyrosinkinase
PTM	Posttranlationale Modifikation
PTP	Proteintyrosinphosphatase
pTyr	Phosphotyrosin
RasGAP	Ras GTPase-activating protein
RF1	Release factor 1
rpm	Revolutions per minute
RPTP	Rezeptor Phosphotyrosinphosphatase
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RNA	Ribonucleinsäure
SAM	Sterile alpha motif

SDS	Sodium dodecylsulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec, s	Sekunde
SH2	Src homology 2
SH3	Src homology 3
SILAC	Stable isotope labeling by amino acids in cell culture
SKAP55	Src kinase-associated phosphoprotein of 55 kDa
SLP-76	SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa
SPR	Surface Plasmon resonance
sTyr	p-Sulfo-L-Tyrosin
TBE	Tris, Borsäure, EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TEV	Tobacco etch virus
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
uv	Ultraviolett
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
WW-Domäne	Tryptophan-Tryptophan Domäne
ZAP-70	Zeta-chain-associated protein kinase 70