

Aus dem Institut für medizinische Physik und Biophysik
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin
Berlin

DISSERTATION

Interaktion zwischen der SH3-Domäne des humanen
Endophilins und möglichen Interaktionspartnern –
Expression und isotherme Titrationskalorimetrie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anna Amrit Jarchow

aus Hamburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. K. P. Hofmann
 2. Prof. Dr. T. Pomorski
 3. Prof. Dr. rer. nat. G. Ahnert-Hilger

Datum der Promotion: 27.03.2009

Nimm
dein Leben
in die Hand

ungläubig
schaue ich
meine Hand an

A. Schwarz

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Einleitung</u>	<u>5</u>
<u>1.1 Protein-Protein-Interaktionen</u>	<u>5</u>
<u>1.2 Die „src homology 3 domain“ (SH3-Domäne)</u>	<u>7</u>
<u>1.3 Die isotherme Titrationskalorimetrie</u>	<u>9</u>
<u>1.4 „Proteomics“ und das Ziel dieser Arbeit</u>	<u>10</u>
<u>2. Methoden</u>	<u>12</u>
<u>2.1 Proteinexpression</u>	<u>12</u>
<u>2.2 Proteinaufreinigung</u>	<u>15</u>
<u>2.3 ITC-Messungen</u>	<u>20</u>
<u>3. Ergebnisse</u>	<u>26</u>
<u>3.1 Expression/Aufreinigung im kleinen Maßstab</u>	<u>26</u>
<u>3.2 Expression/Aufreinigung im großen Maßstab</u>	<u>28</u>
<u>3.3 Ergebnisse der ITC-Messungen</u>	<u>32</u>
<u>4. Diskussion</u>	<u>38</u>
<u>4.1 Isotherme Titrationskalorimetrie als Methode</u>	<u>38</u>
<u>4.2 Stabilisierung der SH3-Domäne</u>	<u>40</u>
<u>4.3 Aussicht</u>	<u>42</u>
<u>5. Zusammenfassung</u>	<u>44</u>

ANHANG A: Literatur/Quellen
ANHANG B: Erklärung
ANHANG C: Lebenslauf
ANHANG D: Danksagung

1. Einleitung

1.1 Protein-Protein-Interaktionen

Wodurch werden die einzelnen Bestandteile des Zytoskeletts miteinander verknüpft? Was hält die Sarkomere im Muskel zusammen? Was bildet die Grundlage für den Kontakt zwischen dem Proteohormon Thyreotropin (TSH) und seinem Rezeptor? Auf diese Fragen lautet die Antwort: Protein-Protein-Interaktionen.

Viele Proteine im menschlichen Körper gehen während ihres Funktionszyklus transiente Interaktionen mit wechselnden Interaktionspartnern ein. Stellt man die Interaktionsmöglichkeiten mehrerer Proteine untereinander dar, so ergeben sich große Proteinnetzwerke wie in Abb. 1.1. In dieser Abbildung wurden 2358 Interaktionen zwischen 1548 Proteinen einer Hefezelle dargestellt (Uetz-Pohl/ Mayer 2004).

Ermöglicht werden Protein-Protein-Interaktionen durch sogenannte Protein-Domänen. Diese Domänen sind Abschnitte von Proteinen, die strukturell und funktionell als eigene Einheit vorliegen. Sie haben eine Länge von 40-150 Aminosäuren und besitzen eine spezifische Faltung, die unabhängig von der Faltung des restlichen Proteins ist. Durch diese Faltung und die Ladung der Aminosäuren in diesem Abschnitt können Domänen Bindungstaschen ausbilden. Diese lagern sich an spezifische Abschnitte anderer Proteine an und gehen mit diesen nicht-kovalente Bindungen ein. Diese Bindungen beruhen auf hydrophoben Kräften, Wasserstoff-Brücken-Bindungen und Ionen-Bindungen. Wasserstoff-Brücken-Bindungen und Ionen-Bindungen steuern auch die Spezifität einer Bindung. Diese Spezifität entsteht, indem die Bindungspartner einer Domäne ein Erkennungsmerkmal aufweisen. Bei dem Erkennungsmerkmal handelt es sich um eine definierte Anordnung bestimmter Aminosäuren mit Eigenschaften wie z.B. einer negativen Ladung oder einem Phenylrest (Uetz-Pohl 2004/ Mayer 2001).

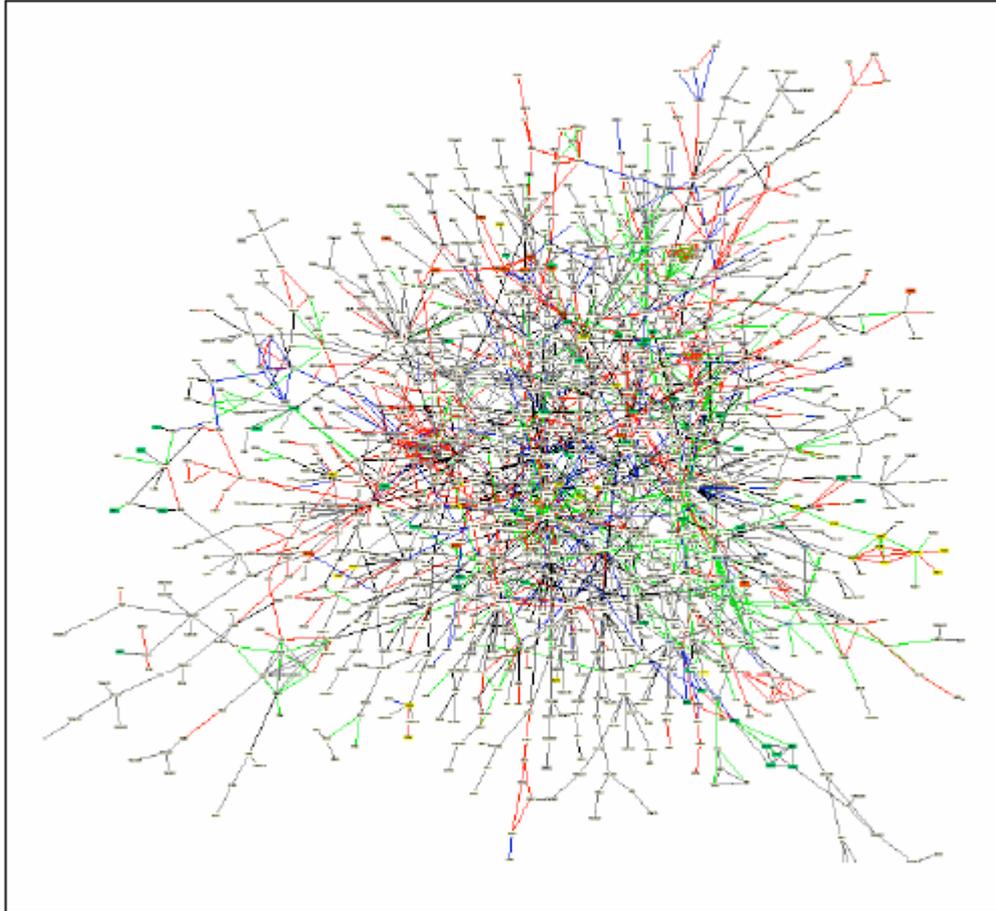


Abb. 1.1.: *Das Protein-Interaktionsnetzwerk einer Hefezelle.* Dieses Proteinnetzwerk wurde von P. Uetz und E. Pohl aus publizierten Daten rekonstruiert (Uetz-Pohl 2004). Die 1548 Proteine gehen 2358 Interaktionen ein. (Membranfusionsproteine: blau, Chromatinproteine: grau, Strukturproteine: grün, Fettstoffwechsel: gelb, Zellteilung: rot)

1.2 Die „src homology 3 domain“ (SH3-Domäne)

In der vorliegenden Arbeit wird die „src homology 3 domain“ (SH3-Domäne) des humanen Endophilin-1 untersucht. Sie wurde bereits in vielfältigen Arbeiten verwendet, so dass viele Details wie z.B. ihre Struktur und ihr Bindungsverhalten bekannt sind (siehe Faupel 2004).

Die SH3-Domäne (Abb.1.2 A) kommt als konservierter Protein-Abschnitt in vielen Proteinen der menschlichen Zelle vor. Diese sind häufig mit dem Zellskelett assoziiert. Außerdem ist die SH3-Domäne an Prozessen wie der Signaltransduktion oder der Endozytose beteiligt. Ursprünglich wurde die SH3-Domäne in Proteinen der Src-Familie gefunden, die in Sarkomeren vorkommen; daher der Name „src homology 3 domain“. Mittlerweile sind etwa 1000 Proteine verschiedener Spezies bekannt, die eine SH3-Domäne besitzen (Kay 2000, Mayer 2001).

Die SH3-Domäne besteht aus ca. 60 Aminosäuren. Die Länge variiert, da die SH3-Domäne in unterschiedlichen Spezies vorkommt. Ihre typische Faltung bildet drei Bindungstaschen (Abb.1.2 A). Von diesen Bindungstaschen sind zwei hydrophob und die dritte ist negativ geladen. Mit den hydrophoben Taschen lagert sich die SH3-Domäne an prolin-reiche Regionen von Interaktionspartnern an, welche die Sequenz PxxP haben (P=Prolin / x=austauschbare Aminosäure ohne bisher bekannter Funktion). Die negativ geladene Tasche ermöglicht eine relative Spezifität, da die bindenden Proteine an dieser Stelle ein Arginin oder Lysin besitzen müssen. Diese Spezifität ist jedoch nur schwach ausgeprägt (Mayer 2001). Je nachdem, ob sich die positiv geladene Aminosäure vor (+xxPxxP, das + steht für eine positiv geladene Aminosäure) oder hinter (PxxPx+) der prolinreichen Region des Interaktionspartners befindet, lagern sich die SH3-Domäne und das Protein in zwei unterschiedlichen räumlichen Orientierungen aneinander (Abb.1.2 B). Demnach werden die Proteine in Liganden der Klasse I und II eingeteilt (Ren et al.1993, Kay 2000).

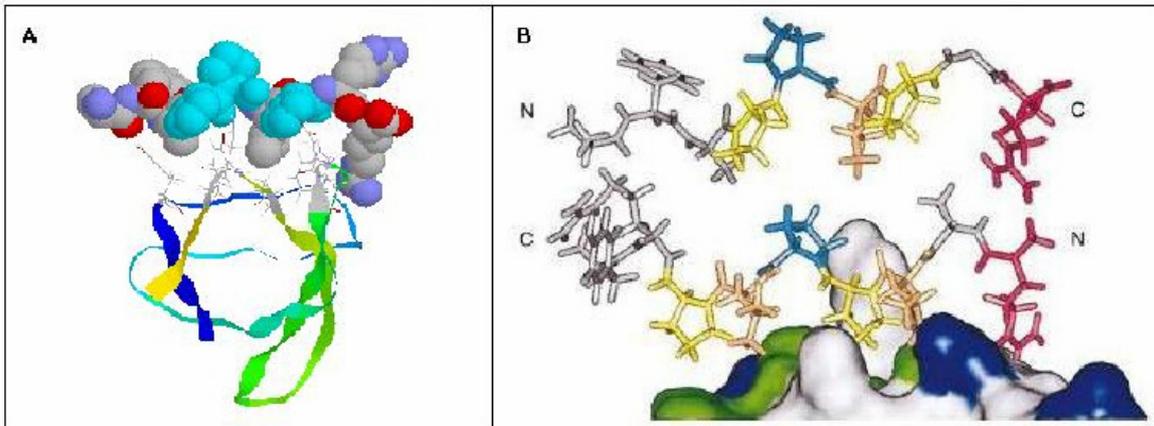


Abb.1.2: *Dreidimensionale Modelle der SH3-Domäne* A: Die einzelnen Aminosäuren der SH3-Domäne werden in Form von Bällen dargestellt, um den Aufbau der Bindungstaschen zu verdeutlichen. Bei dem Bindungspartner handelt es sich um ein Protein, das konstruiert wurde, um zu verdeutlichen, wie sich ein Interaktionspartner an die SH3-Domäne anlagert. (Bildquelle: Universität Jena) B: Bei diesem dreidimensionalen Modell wird gezeigt, in welcher räumlichen Orientierung sich die Interaktionspartner an die SH3-Domäne anlagern können. Je nachdem, auf welcher Seite des Abschnittes PxxP (P=Prolin / x=austauschbare Aminosäure ohne bisher bekannte Funktion) sich das Arginin/ Lysin befindet, werden die Proteine in Liganden der Klasse I (unteres Protein) und der Klasse II (oberes Protein) eingeteilt. (Bildquelle: Kay 2000)

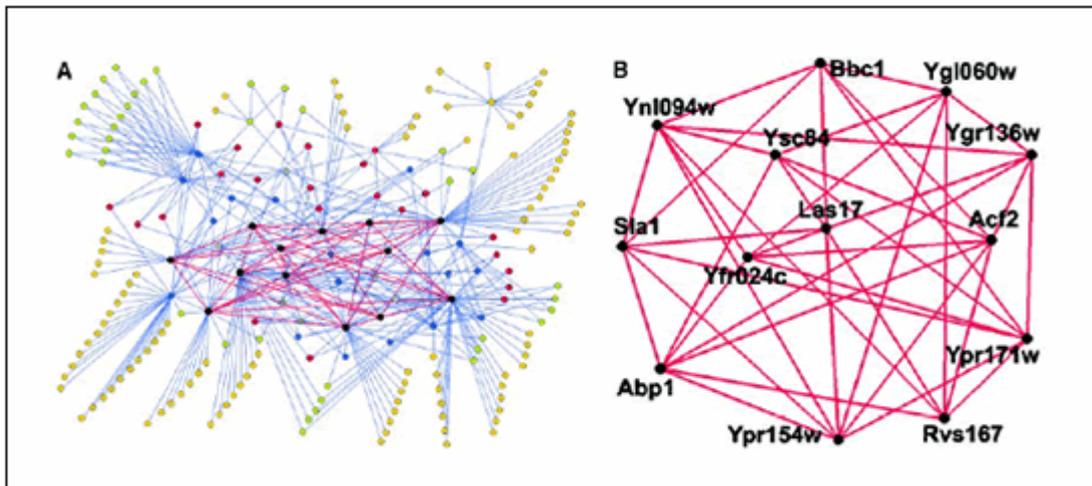


Abb.1.3: *Das SH3-Domäne-Protein-Interaktionsnetzwerk einer Hefezelle*. Per Computer wurden aufgrund von Bindungssequenzen wahrscheinliche Interaktionspartner der SH3-Domäne und daraus resultierende Verknüpfungen ermittelt. A: Die farbigen Punkte stehen für Proteine mit SH3-Domänen und ihre Interaktionspartner. Die unterschiedlichen Farben stehen für die Anzahl der Interaktionen, die ein Protein in diesem Netzwerk eingeht (eine Interaktion: gelb; zwei Interaktionen: grün; drei Interaktionen: rot; vier Interaktionen: blau; fünf Interaktionen: cyan; sechs Interaktionen: schwarz). B: Die Abkürzungen stehen für Proteine mit SH3-Domänen. Das Netzwerk ist hier stark schematisiert. (Bildquelle: Tong 2002)

1.3 Die isotherme Titrationskalorimetrie

Mit der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) lassen sich Interaktionen zwischen Stoffen gleicher oder unterschiedlicher Stoffklassen nachweisen. Diese Interaktionen reichen von Interaktionen zwischen zwei Peptiden, über Hormon-Rezeptor-Bindungen, bis zu Interaktionen zwischen Antikörpern und ihren Zelloberflächenproteinen.

Bei den Messungen am ITC handelt es sich um Titrationsen. Wenn zwei Bindungspartner interagieren, wird dem Messsystem Wärme entzogen, bzw. Wärme wird frei. Das hängt jeweils davon ab, ob es sich um eine endotherme oder exotherme Reaktion handelt. Diese Wärmeänderung wird gemessen und daraus die Änderung der Reaktionsenthalpie (ΔH) berechnet. Diese Größe beschreibt die Änderung des Energiezustandes eines Systems. Es müssen allerdings noch andere beteiligte Effekte berücksichtigt werden, wie die Temperaturabhängigkeit von ΔH , unbekannte Folgereaktionen oder eine Beteiligung des Lösungsmittels/ Puffers an der Reaktion. Dementsprechend stimmen die kalorimetrisch gemessenen Werte häufig nicht mit errechneten Werten überein.

Durch die Titration kann das Kalorimeter neben der Wärme auch die Affinität, bzw. den K_d -Wert der Interaktionspartner bestimmen. Aus dem K_d -Wert wiederum lässt sich die Größe der freien Enthalpie (ΔG) ermitteln. Bei ΔG handelt es sich um die Energie, die von der Gesamtenthalpie des Systems frei zur Verfügung steht, um Arbeit zu verrichten. Aus ihr lässt sich ableiten, ob eine Reaktion freiwillig abläuft. Die freie Enthalpie kann aus der Gleichgewichtskonstanten K ($K = 1:K_d$), der Temperatur T und der Gaskonstante R ($R = 8,314 \text{ J/mol K}$) errechnet werden:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K$$

Da die Reaktionsenthalpie ΔH , die Temperatur T und die freie Enthalpie ΔG bekannt sind, lässt sich nun nach der *Gibbs-Helmholtz-Gleichung* die Entropie ΔS berechnen. Diese beschreibt den Ordnungszustand eines Systems. Die *Gibbs-Helmholtz-Gleichung* lautet:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Somit liegt am Ende der Berechnung eine vollständige thermodynamische Beschreibung der Reaktion vor.

1.4 „Proteomics“ und das Ziel dieser Arbeit

Seit Abschluss des „*Human-Genome-Projects*“ liegen die Aminosäuresequenzen vieler unbekannter Proteine vor. Da sich aus den Sequenzen nur sehr bedingt die Funktion des Proteins im menschlichen Organismus ableiten lässt, müssen andere Methoden angewandt werden, um die Rolle, die das jeweilige Protein im menschlichen Körper spielt, besser verstehen zu können (Watson 2005). Diese Bemühungen werden unter dem Begriff „Proteomics“ zusammengefasst (Nock 2000). Zum einen werden Methoden entwickelt, mit denen sich Proteine herstellen lassen. Da es keine der *Polymerase Chain Reaction* (PCR) vergleichbare Methode der Vervielfältigung von Proteinen gibt, müssen Methoden wie die Expression von Proteinen in Bakterien und Hefen weiterentwickelt und verbessert werden. Des Weiteren werden Methoden gesucht, mit denen die subzelluläre Lokalisationen und die Interaktionen von Proteinen untersucht werden können. Die Messergebnisse von Methoden wie der isothermen Titrationskalorimetrie können Aufschluss darüber geben, welche Funktion ein Protein hat. Aus der Funktion lassen sich wiederum eventuelle Schlüsselpositionen in der Entwicklung von Krankheiten auf zellulärer Ebene ableiten.

Im Rahmen einer Doktorarbeit hat Thomas Faupel eine Methode entwickelt, mit der sich Protein-Protein-Interaktionen im großen Maßstab nachweisen lassen. Bei diesem *High-Density-Protein-Array* wurden die Proteine eines humanen, fetalen Gehirns untersucht. Die 36 864 Klone entstammten einer cDNS-Datenbank (Büssow 2004). Sie wurden auf einer Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) immobilisiert. Die Membran wurde dann mit einer Lösung mit radioaktiv markierter SH3-Domäne überspült. Dabei wurden 30 Klone als mögliche Interaktionspartner der SH3-Domäne identifiziert (Faupel 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun festgestellt werden, ob sich die isotherme Titrationskalorimetrie als Methode eignete, um Interaktionen zwischen der SH3-Domäne des Endophilin-1 und diesen 30 Klonen nachzuweisen. Zusätzlich wurde außerdem die Interaktion zwischen der SH3-Domäne und der sogenannten Lim-Domäne untersucht. Bei der Lim-Domäne handelte es sich um einen Abschnitt des „cystein- und glycinreichen Proteins 2“. Für die Messungen wurden ein kleinerer und ein größerer Abschnitt der Lim-Domäne verwendet.

Die Untersuchung einer möglichen Interaktion geschah in mehreren Schritten: Zuerst wurden die Proteine, die in der Arbeit von T. Faupel als mögliche Bindungspartner der SH3-Domäne bestimmt wurden, darauf überprüft, ob sie sich in einer Menge exprimieren und aufreinigen ließen, die für die Messung am ITC ausreichte. Die Proteine, auf die dies zutraf, wurden als nächstes in mehreren 2 l-Kulturen exprimiert und mittels Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC) und Gelfiltrations-Chromatographie (GFC) aufgereinigt.

Die SH3-Domäne und die beiden Abschnitte der Lim-Domäne mussten aufgrund der Erfahrung anderer Arbeiten nicht überprüft werden (Datenbank des MPI für molekulare Genetik), so dass sie direkt exprimiert und aufgereinigt werden konnten.

Daraufhin fanden die Messungen am Kalorimeter statt. Aus verschiedenen Veröffentlichungen war bekannt, dass sich die ITC grundsätzlich für Peptid-Peptid-, Peptid-Protein und Protein-Protein-Messungen eignet (Lemmon 1994, Pierce 1999). Für Versuche mit der SH3-Domäne wurden bisher nur Messungen durchgeführt, bei der ein Peptid zu der SH3-Domäne titriert wurde. Somit waren grundsätzlich Informationen über das Bindungsverhalten der SH3-Domäne vorhanden und es stellte sich nun die Frage, ob sich die ITC auch für die Messung von Interaktionen zwischen der SH3-Domäne und möglichen Interaktionspartnern eignet.

2. Methoden

2.1 Proteinexpression

2.1.1 Materialien

Name des Mediums/Puffers	Bestanteile	Anteil pro 1 Liter
4xSB-Konzentrat	Bactotrypton	48 g
	Hefe-Extrakt	96 g
	Glycerin 100%	16 ml
20xKPB	KH ₂ PO ₄	46 g
	K ₂ HPO ₄	243 g
2xYT	Bactotrypton	16 g
	Hefe-Extrakt,	10 g
	NaCl	5 g

Tab.2.1: Materialien - Expression I

Name der Lösung	Beschreibung	Konzentration der Stocklösung
Thiamin	Vitamin B12	20 mg/ml
Ampicillin	Antibiotikum	50 mg/ml
Kanamycin	Antibiotikum	30mg/ml
Chloramphenicol	Antibiotikum	100 mg/ml

Tab.2.2: Materialien – Expression II

2.1.2 Expression der Proteine

Bereits für eine frühere Untersuchung wurde die DNA von möglichen Interaktionspartnern der SH3-Domäne per Vektor in *E.coli*-Bakterien der Stämme *E.coli* XL-I Blue, *E.coli* SCS1 und *E.coli* DH10B eingebracht (Faupel 2004). Auf diesen Vektoren befanden sich zusätzlich Resistenzgene gegen Antibiotika mit unterschiedlichen Wirkungsspektren. Diese Antibiotika wurden während der Expression dem Kulturmedium beigefügt und unterdrückten das Wachstum anderer Bakterien, die andernfalls den eigentlichen Stamm hätten überwuchern können.

Diejenigen Klone, die für diese Arbeit ausgesucht wurden, wurden auf ihre Exprimierbarkeit überprüft, indem sie in einer *deepwell plate* im Maßstab von einem Milliliter exprimiert und mit Hilfe eines Roboters aufgereinigt wurden. Der entstandene Gesamtzellextrakt wurde zur Auswertung auf ein Acrylamid-Gel aufgetragen, angefärbt und die Intensität der Färbung und Größe der Banden wurden verglichen.

Von den Klonen, die für die weiteren Experimente verwendet werden sollten, wurden jeweils mehrere Kulturen mit einem Volumen von zwei Litern hergestellt. Dazu wurde in 500 ml-Erlenmeyerkolben eine Vorkultur gezogen. Das 100 ml 2xYT Medium, das zusätzlich aus 2ml Glucose, 5 ml 20xKPB und den Antibiotika Kanamycin (Endkonzentration: 15 µg/ml) und Ampicillin bzw. Chloramphenicol (Endkonzentration jeweils: 100 µg/ml) besteht, wurde mit den Klonen angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Welche Antibiotika hinzugegeben wurden, hing von den Resistenzgenen auf den Plasmiden der Bakterien ab.

In einen Erlenmeyer-Kolben mit einem Fünf-Liter-Volumen wurden 100 ml 20xKPB, Thiamin (Endkonzentration: 29 mg/l), 1300 ml Aqua Bidest und die Antibiotika Kanamycin (Endkonzentration: 21 mg/l) und Ampicillin bzw. Chloramphenicol (Endkonzentration: 143 mg/l) gegeben und über Nacht bei 37 °C vortemperiert.

Nach zwölf Stunden wurde die Vorkultur mit 500 ml 4xSB-Medium in die großen Kolben umgefüllt. Nach vier Stunden wurde die optische Dichte (OD) gemessen. Lag sie zwischen 1 und 1,5, so wurde die Kultur mit 1 mM IPTG induziert. Nach weiteren vier Stunden wurde die Kultur geerntet. Dazu wurde sie für 15 Minuten bei 3500 g abzentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das *Pellet* in 10 ml Expressionswaschpuffer resuspendiert und erneut für 20 Minuten bei 3500 g in 50 ml-*Falcontubes* zentrifugiert. Bis zur weiteren Aufreinigung wurden die Pellets in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem Gefrierschrank bei -80 °C aufbewahrt.

2.2 Proteinaufreinigung

2.2.1 Materialien

Name	Bestandteile	Endkonzentration	Hersteller
Resuspensionspuffer pH 7,5	Tris	20 mM	MERCK
	NaCl	300 mM	MERCK
	Imidazol	10 mM	
	Mercaptoethanol	2 mM	MERCK
	Proteaseinhibitor „Phenylmethylsulfonyl- Fluorid Plus“	1mM	ROCHE
	Proteaseinhibitor-Misch- -Tablette ohne EDTA	1 Tbl./80 ml	Boehringer Ingelheim
	Benzonase	500 Units	MERCK
Elutionspuffer 1	Imidazol	250 mM	MERCK
	NaCl	100 mM	MERCK
	Tris	20 mM	MERCK
Gelfiltrationspuffer pH 7,5	Tris	15 mM	MERCK
	NaCl	100 mM	MERCK

Tab.2.3: Puffer und Lösungen für die Aufreinigung der Proteine mit einem Histidin-*Tag*

Name	Bestandteile	Endkonzentration	Hersteller
Resuspensionspuffer	Tris	20 mM	MERCK
pH 7,5	NaCl	300 mM	MERCK
	Mercaptoethanol	5 mM	MERCK
	Proteaseinhibitor „Phenylmethylsulfonyl- Fluorid Plus“	1mM	ROCHE
	Proteaseinhibitor-Misch- -Tablette ohne EDTA	1 Tbl./80 ml	Boehringer Ingelheim
	Benzonase	500 Units	Merck
Waschpuffer GST	Tris	20 mM	MERCK
pH 7,4	NaCl	150 mM	MERCK
Elutionspuffer II	Tris	20 mM	MERCK
pH 8	GSH	10 mM	SIGMA
	NaCl	30 mM	MERCK
	Mercaptoethanol	2 mM	MERCK
Gelfiltrationspuffer	Tris	15 mM	MERCK
pH 7,5	NaCl	100 mM	MERCK

Tab.2.4:Puffer und Lösungen für die Aufreinigung der Proteine mit einem Glutathion-S- Tag

2.2.3 Aufreinigung der Proteine

Je nachdem, ob der DNS der aufzureinigenden Proteine vor dem Einbringen in die Bakterienzelle ein Histidin-*Tag* (HIS-*Tag*) oder ein Glutathion-S-*Tag* (GST-*Tag*) hinzugefügt wurde, mussten leicht von einander abweichende Reinigungsmethoden angewandt werden. Die ersten Schritte entsprachen sich mit Ausnahme der Zusammensetzung der Puffer (siehe Tab.2.2.1.a und b).

Das *Pellet* einer Kultur mit einem Volumen von zwei Litern war durchschnittlich 15 ml groß. Um es aufzutauen und zu resuspendieren, wurde die dreifache Menge an Resuspensionspuffer hinzugefügt. Mit Hilfe von Ultraschall wurden die *E.coli*-Zellen aufgeschlossen. Hierfür wurde das Ultraschallgerät Sonoplus von Bandelin verwendet. Es wurden zwei Beschallungszyklen gewählt, während derer die Bakterienzellen in einem Zeitraum von 30 s 75% der möglichen Energie ausgesetzt waren. Um eine Erwärmung der Zellen zu vermeiden, wurde die Lösung in ein Becherglas mit einem breiten Boden (150 ml) umgefüllt und auf Eis gelagert. Zwischen den Zyklen wurde eine Pause von drei Minuten eingehalten.

Als nächstes wurden unlösliche Zellbestandteile in zwei Zentrifugationsschritten à 10 min bei 50 000 g abgetrennt. Danach wurde der nun klare Überstand sterilfiltriert. Die folgenden Reinigungsschritte für den HIS- und GST-*Tag* wichen von einander ab.

Die Proteine mit einem HIS-*Tag* wurden auf eine Talon-Säule der Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC) aufgetragen. Dort banden sich die Histidine an das Talon, während ungebundenes Material als Durchfluss gesammelt wurde. Im nächsten Schritt wurden die gebundenen Proteine mit Hilfe des Elutionspuffers I von der Säule gelöst und in 1,5 ml-Fractionen gesammelt. Die Fractionen mit dem höchsten Proteinanteil wurden vereinigt und mit einer TEV-Protease (Stocklösung: 1 mg/ml, Verdünnung: 1/40) versehen, welche den HIS-*Tag* von den Proteinen entfernte.

Dieser Verdau fand über Nacht statt. Nachdem der Verdau abgeschlossen war, wurde die Proteinkonzentration der Lösung mit einem UV/VIS-Spektrophotometer der Firma Varian Inc. gemessen. Bei der UV/VIS-Spektroskopie wurden die Eigenschaften von ultraviolettem und sichtbarem Licht verwendet.

Hierbei wurde Licht (Wellenlängen: 200 nm bis 800 nm) zuerst durch eine Kontrolllösung und dann durch eine Messlösung geleitet und die Extinktion gemessen. Als eigentliche Extinktion der Messlösung galt dann die Differenz zwischen Kontroll- und Messwert. Diese konnte anhand der Formel $c = E/(\epsilon \cdot d)$ in eine Konzentration umgerechnet werden (c = Konzentration; E = Extinktion; ϵ = Extinktionskoeffizient; d = Schichtdicke der Messküvette, meist 1 cm). Der Extinktionskoeffizient ist für jedes Protein unterschiedlich und lässt sich anhand der Proteinsequenz bestimmen (Pace 1995).

Protein	ϵ (L*mol⁻¹*cm⁻¹)
SH3-Domäne	9970 (12950)
I17574	2980
I01538	31400
G11565	7450
O01523	47220
F10569	23380
137679	9970 (55810)
137672	27390 (73230)

Tab.2.5: Die Extinktionskoeffizienten der untersuchten Proteine. Die Berechnung bezieht sich auf die Anzahl der Tryptophan- und Tyrosinreste der Proteine (Pace 1995). Für die SH3-Domäne und die Proteinabschnitte 137679 und 137672 ergeben sich zwei Werte: Der erste Wert steht für den Extinktionskoeffizienten der Proteine nach dem Verdau und der zweite Wert steht für die Proteine vor dem Verdau. Der zweite Wert ist höher, da hier die Proteine noch mit dem Glutathion-S-Tag verbunden sind, welcher zusätzlich Tyrosin- und Tryptophanreste besitzt.

Die mit einem GST-Tag versehenen Proteine wurden auf eine GST-Matrix-Säule aufgetragen. Mit Hilfe eines Waschpuffers wurde die Säule gereinigt, so dass nur die gebundenen Proteine übrigblieben. Über Nacht wurde auch hier TEV-Protease (Stocklösung: 1 mg/ml, Verdünnung: 1/40) hinzugegeben, die spezifisch zwischen dem GST-Tag und dem Protein schnitt und somit das Zielprotein von der Säule löste. Das Protein wurden mit dem Elutionspuffer II von der Säule gespült und in Fraktionen gesammelt.

Im Anschluss an die Reinigung mit der HPLC mussten die HIS- bzw. GST-*Tags* und andere Stoffe, die durch die Aufreinigung hinzugekommen waren, wiederum aus der Lösung entfernt werden. Dies geschah mit Hilfe der Gelfiltrations-Chromatographie (GFC): Das Eluat der HPLC wurde auf eine Trenn-Säule aufgetragen. Diese Trennsäule war gefüllt mit quervernetzten Kügelchen, deren Durchmesser ca. 10 µm betrug. Durch die Quervernetzung wurden kleine Taschen gebildet, in denen kleinere Moleküle aus der Lösung leichter zurückgehalten wurden als größere. Da aufgrund eines Pumpsystems ein stetiger Durchfluss durch die Trenn-Säule herrschte, wurden die größeren Moleküle schneller wieder von der Säule eluiert. Der Durchfluss wurde aufgefangen und in 1 ml-Fractionen gesammelt. Wie bei der HPLC bestimmte eine UV-Lampe den Molekülgehalt im Durchfluss, so dass sich nachvollziehen ließ, in welchen Fractionen sich das gereinigte Protein befand. So wurden die Bestandteile der Lösung ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Fractionen mit dem gereinigten Protein vereint. Nach der GFC wurde die Konzentration des Proteins bestimmt. Als Methode wurde die UV/VIS-Spektroskopie verwendet (s.o).

Lag die Konzentration des Proteins nach der Aufreinigung unter dem Wert, der für die Messungen am ITC benötigt wurde (30 – 50 µM), wurde die Lösung durch die Zentrifugation in *Amicon-Ultrafiltration-Tubes* aufkonzentriert. War schließlich die benötigte Konzentration erreicht, konnte mit den Messungen begonnen werden.

Die einzelnen Schritte der Expression und der Aufreinigung wurden mit der Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft. Hierzu wurde eine kleine Probe der Protein-Lösung mit Natriumdodecylsulfat-Puffer (SDS-Puffer) versehen, damit die Proteine denaturierten, und auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Dieses Gel wurde zwischen zwei elektrische Pole gespannt und mit Gelelektrophoresepuffer umgeben.

Die Moleküle wanderten nun ihrer Größe und Ladung entsprechend im elektrischen Feld entlang, so dass sich Moleküle gleicher Größe und Ladung in Banden sammelten. War die Auftrennung abgeschlossen, wurde das Gel angefärbt. Mit Hilfe von Markern, die zusätzlich auf das Gel aufgetragen worden waren, ließ sich nun die Größe der Moleküle in den einzelnen Banden bestimmen.

2.3 ITC-Messungen

2.3.1 Das Titrationskalorimeter

Für die Messungen der Isothermen Titrationskalorimetrie wurde ein Kalorimeter der Firma MicroCal Inc. verwendet. Es bestand aus zwei Zellen (Abb.2.1), die in ein Gehäuse eingelassen waren. Diese Zellen fassten jeweils ein Volumen von 1,4 ml Flüssigkeit und waren so konstruiert, dass Proben über einen schmalen Kanal auf der Oberseite der Zellen eingefüllt werden konnten. Durch diesen Kanal wurde außerdem die Spritze für die Titrationsen eingeführt. Die Wände der Zellen bestanden aus einer Nickel-Molybdän-Chrom-Legierung. Dieses Material zeichnete sich durch eine sehr gute Wärmeleitfähigkeit aus. Dies war eine Voraussetzung für die Messungen der ITC, da Temperaturänderungen schnell und mit möglichst geringem Wärmeverlust von dem Inneren der Zelle zur Zelloberfläche geleitet werden mussten. Auf der Oberfläche der Zellen befanden sich Sensoren, die die Temperaturänderungen registrierten.

Eine der beiden Zellen diente als Referenzzelle und wurde mit Wasser oder Puffer gefüllt. In der zweiten Zelle wurden die Titrationsen durchgeführt. In ihr befanden sich zu Beginn der Titration nur einer der Interaktionspartner und im Laufe der Titration wurde ein zweiter hinzugefügt. Beide Interaktionspartner lagen in einem Puffer gelöst vor. Ein Regelsystem hielt die Temperatur der Zellen konstant und die Temperaturdifferenz zwischen ihnen möglichst gering. Dies geschah, indem beiden Zellen von außen Energie in Form von Strom zugeführt wurde.

Während einer Titration wurde Wärme frei, bzw. aufgenommen und die Temperatur in der Messzelle veränderte sich. Dadurch vergrößerte sich die Temperaturdifferenz zwischen der Mess- und der Referenzzelle. Kam es bei einem Titrationsschritt zur Freisetzung von Wärme, so wurde die Messzelle aufgeheizt. Das Regelsystem verminderte die von außen zugeführte Energiemenge (Leistung) entsprechend, bis die Temperaturdifferenz zwischen Mess- und Referenzzelle wieder möglichst gering war. Wurde Wärme aufgenommen, kühlte die Messzelle ab und das Regelsystem erhöhte die Leistung. Um die Messung auszuwerten, wird dann die Leistung als Funktion der Zeit betrachtet (siehe Abb.2.2).

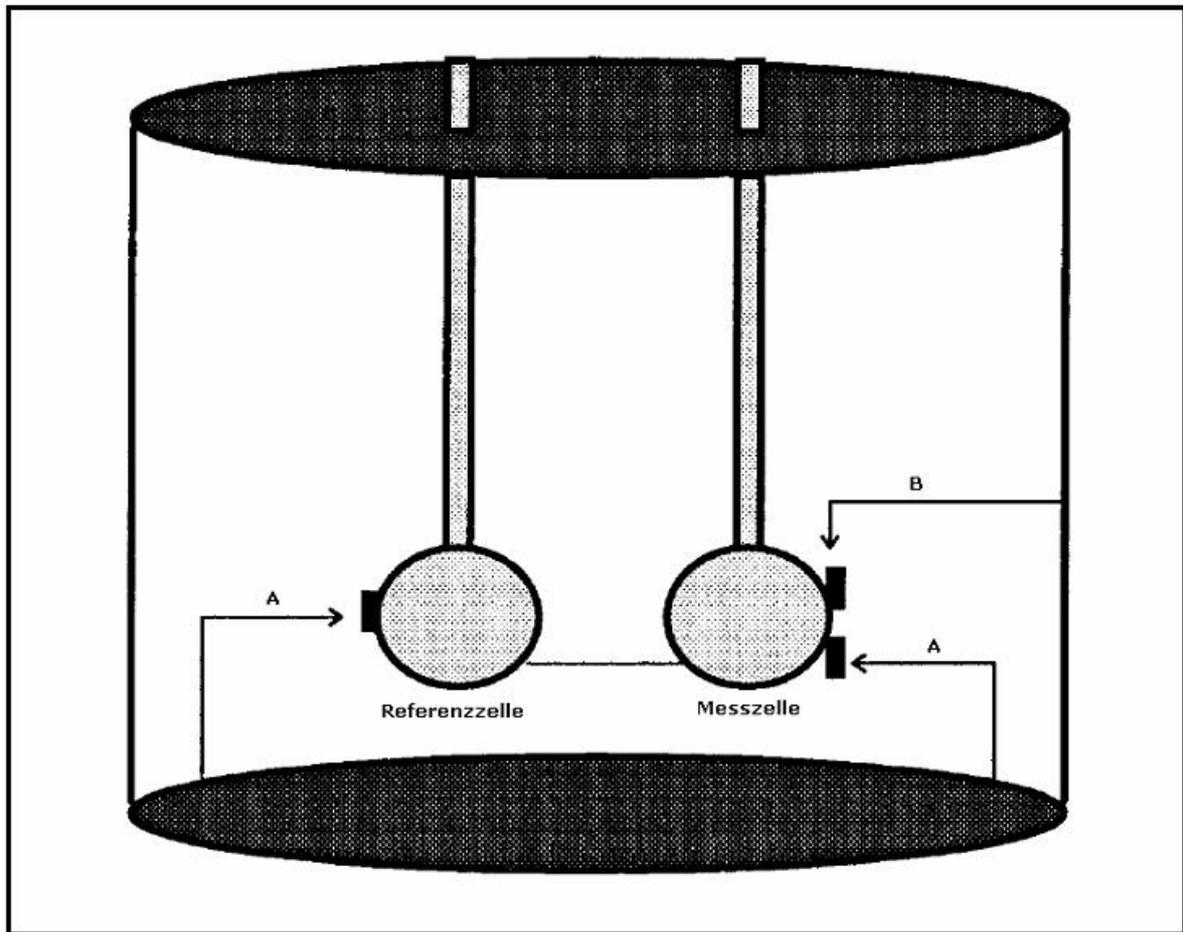


Abb.2.1.: *Das isotherme Titrationskalorimeter.* Mit den Pfeilen wird das Regelsystem des Kalorimeters dargestellt. Es sorgt dafür, dass die Temperatur der Mess- und Referenzzelle der für die jeweilige Messung benötigten Temperatur entspricht (A) und dass Temperaturveränderungen nach thermischen Reaktionen ausgeglichen werden (B).

2.3.2 Die Planung eines Experimentes

Bei den Messungen am ITC wurde die SH3-Domäne zu einem möglichen Interaktionspartner titriert. Die Titration war vollständig abgelaufen, wenn alle Bindungsstellen des Interaktionspartners der SH3-Domäne vollständig besetzt waren. Dazu mussten drei Faktoren sorgfältig aufeinander abgestimmt werden: die Anzahl der Injektionen, das Verhältnis der Konzentration der SH3-Domäne und der Konzentration der möglichen Bindungspartner am Anfang der Messung und die Menge an SH3-Domäne, die während der einzelnen Schritten von der Spritze in die Messzelle gelang.

Die Anzahl der Titrationschritte sollte so gewählt werden, dass die Messung nicht zu lange dauert, da die Aktivität von Proteinen mit der Zeit abnimmt. Andererseits sollten es aber genügend Schritte sein, um eine deutliche Titrationskurve registrieren zu können. War die Menge an SH3-Domäne pro Titrationsschritt zu gering, entstanden nur kleine Signale; war sie zu groß, entstanden zwar große Signale, aber es ließ sich keine Titrationskurve ableiten. Die Menge der SH3-Domäne und die Anzahl der Zwischenschritte mussten demnach so aufeinander abgestimmt werden, dass die gesammelten Datenpunkte ausreichten, um die Messung auswerten zu können.

Um das Stadium, in dem alle Bindungsstellen der Interaktionspartner besetzt sind, sicher zu erreichen, sollte die SH3-Domäne am Ende der Titration in einer höheren Konzentration in der Messzelle vorliegen als der Interaktionspartner. Das Verhältnis der Konzentrationen zu Beginn der Titration musste entsprechend berechnet und angepasst werden.

Grundsätzlich mussten vor einer Messung weitere Kontrollmessungen durchgeführt werden. Die SH3-Domäne wurde zu Puffer und Puffer zu möglichen Interaktionspartnern titriert, um herauszufinden, welche Signalgröße die einfache Verdünnung der einzelnen Komponenten der Messungen hatte.

2.3.3 Der Ablauf einer Messung

Vorbereitend wurden die SH3-Domäne und die Interaktionspartner mit Puffer verdünnt, bis die optimalen Anfangskonzentrationen erreicht wurde. Außerdem wurde der Lösung Glycerin zugegeben, um die Stabilität der Proteine zu erhöhen. Den Messlösungen wurde unter Vakuum gelöstes Gas entzogen, welches andernfalls durch Bildung von Gasblasen die Messung hätte stören können.

Die Lösung mit den möglichen Interaktionspartnern der SH3-Domäne wurde mit einer 2 ml-Spritze aufgenommen und in die Zelle appliziert. Dabei wurde durch leichte Rührbewegungen mit der Kanüle und durch ruckartiges Bewegen des Spritzen-Stempels einem Untermischen von Luft vorgebeugt. Die Lösung mit der SH3-Domäne wurde in eine Spritze mit den Volumina 100 µl, 150 µl oder 250µl aufgezogen. Die Spritze wurde vorsichtig durch den schmalen Kanal in die Zelle eingeführt und in der Halterung befestigt.

Daraufhin wurden mit Hilfe der mitgelieferten Software verschiedene Messgrößen der jeweiligen Messung angepasst: Zum einen wurde festgelegt, wie viele Titrationsschritte von dem Kalorimeter durchgeführt wurden und wie groß das Probenvolumen war, das pro Schritt in die Messzelle gegeben wurde. Der erste Titrationsschritt wurde kleiner gewählt als die folgenden. Er diente dazu, einen durch eine eventuelle Biegung der Spritze verursachten Verlust an Probe bei den Vorbereitungen auszugleichen und wurde noch nicht zu der eigentlichen Titration gerechnet (siehe Abb.2.2).

Des Weiteren wurde eingestellt, welche Zeitspanne zwischen der Kalibrierung des Gerätes und der ersten Messung lag und wie lang die Pausen zwischen den Titrationsschritten sein sollten. Bei einer zu kurzen Pause wäre die Baseline nicht erreicht worden, bevor der nächste Schritt begann, und eine zu lange Pause hätte die Messung unnötig verlängert. Zuletzt musste angegeben werden, in welchen Konzentrationen die Proben vorlagen.

Waren die Einstellungen abgeschlossen, wurde das Gerät kalibriert. Bereits zehn Stunden vor Beginn der Messung war die Messtemperatur eingestellt worden. Diese Zeitspanne benötigte das Titrationskalorimeter, um sich der neuen Temperatur anzunähern. Daher war die Messtemperatur zum Zeitpunkt der Messung annähernd erreicht.

Das Regelsystem des Kalorimeters bewirkte nun eine Erwärmung, bzw. Abkühlung der Referenz- und der Messzelle, bis die Messtemperatur genau erreicht und die Temperaturdifferenz zwischen den Zellen möglichst gering war. Dies wurde in einem Sichtfenster des MicroCal-Programms als konstante Basislinie wiedergegeben.

Nach diesen Vorbereitungen wurde die Messung durchgeführt und nach ihrem Abschluss mit Hilfe des MicroCal-Programms ausgewertet. Die Leistungsänderungen des Regelsystems wurden als Wärmesignale dargestellt. Nach einer Korrektur der Baseline, bei der leichte Abweichungen ausgeglichen wurden, konnten die Signale ausgewertet werden. Durch Integration über die Wärmesignale erhielt man die entstandene Wärme pro Stoffmenge.

In Abbildung 2.2 ist eine Beispielmessung abgebildet, bei der 1,78 mM Cytosin-Monophosphat (CMP) zu 0,056 mM RNase titriert wurde. Das CMP und die RNase waren in der stöchiometrische Faktor (N) betrug bei dieser Messung $N = 0,662 \pm 0,025$. Daraus ergaben sich: $K_d = (1,10 \pm 0,05) \mu\text{M}$ und $\Delta H = (-70,25 \pm 0,34) \text{ kJ/mol}$. Die Fehler ergaben sich daraus, dass die Anfangskonzentration durch Abwiegen bestimmt wurde. Somit entstanden leichte Abweichungen von den angegebenen Konzentrationen. Dies wirkte sich auf spätere Berechnungen aus. Diese Messungen wurde zu Beginn dieser Arbeit durchgeführt, um eine Vergleichsmöglichkeit zu den eigentlichen Experimenten zu haben, denn im Gegensatz zu der SH3-Domäne und ihren Interaktionspartnern ist die Affinität zwischen der RNase und dem CMP bekannt.

Wie in Abbildung 2.2 zu erkennen ist, waren die Wärmesignale zu Anfang am größten und wurden in den folgenden Schritten kleiner, bis sie schließlich eine konstante Größe erreichten. Die Erklärung dafür ist, dass am Anfang alle Bindungsstellen der Proteine in der Zelle frei waren und mit den Liganden in Interaktion traten. Je mehr Bindungsstellen mit Liganden besetzt wurden, desto weniger interagierten mit den Liganden, die in den folgenden Schritten hinzutitriert wurden. Dementsprechend wurde immer weniger Wärme frei, bzw. aufgenommen. In der Beispielmessung wurde nach 23 Injektionen ein Zustand der Sättigung erreicht, in dem alle Bindungsstellen mit Liganden besetzt waren. Dadurch änderte sich die Größe der Peaks nicht mehr und die Titration war abgeschlossen.

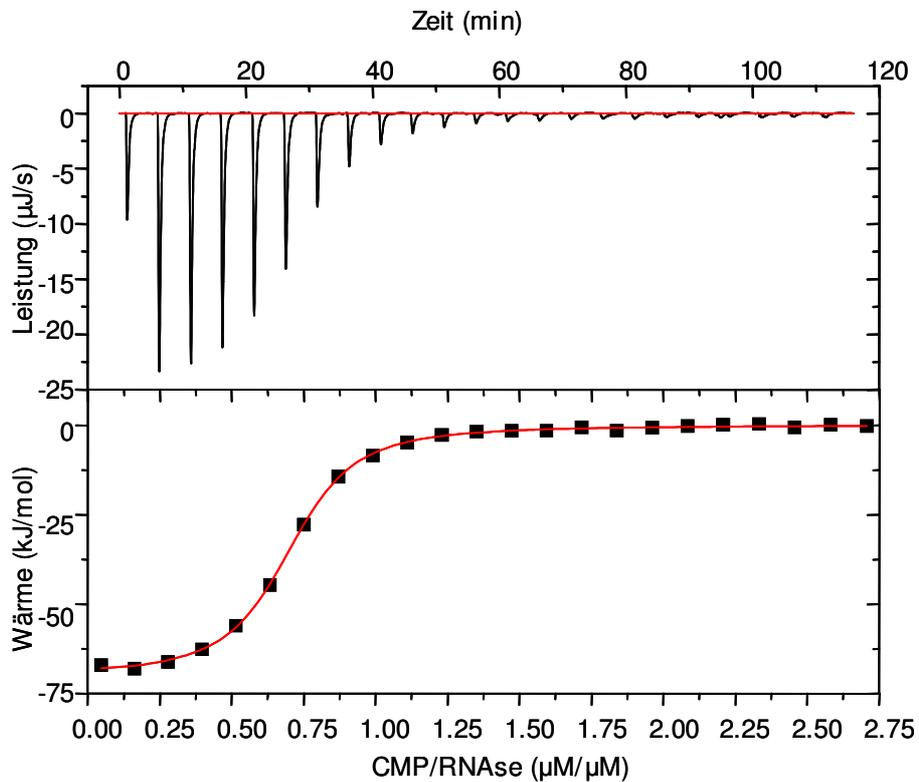


Abb.2.2: Beispiel für die Bindung eines Liganden an ein Makromolekül. Hierfür wurde Cytosin-Monophosphat (CMP) (1,78 mM) auf eine RNAse (0,056 mM) titriert. In dem oberen Teil der Abbildung befinden sich die Primärdaten der Messung in Form von Wärmesignalen. Die rote Linie entspricht hier der Basislinie. Bei dem unteren Teil handelt es sich um die Auswertung der Primärdaten. Die schwarzen Kästchen stehen für Datenpunkte, die sich aus der Integration über die Wärmesignale ergeben. An die Datenpunkte wird eine Bindungskurve angepasst (rote Linie unten). Nach der Analyse der Bindungskurve ergeben sich für $K_d = (1,10 \pm 0,05) \mu\text{M}$ bzw. für $\Delta H = (-70,25 \pm 0,34) \text{ kJ}/\text{mol}$.

3. Ergebnisse

3.1 Expression/Aufreinigung im kleinen Maßstab

In seiner Doktorarbeit hat Thomas Faupel 30 Proteine als mögliche Bindungspartner der SH3-Domäne identifiziert (Faupel 2004). Da für jede Messung am ITC große Mengen an Protein benötigt wurden, konnten nur diejenigen Proteine weiter untersucht werden, die sich ausreichend exprimieren und aufreinigen ließen. Deswegen wurde zuerst eine Überprüfung im kleinen Maßstab durchgeführt. Dazu wurde von jedem Klon in einer *deepwell plate* eine 1 ml-Kultur exprimiert und mit Hilfe eines Roboters aufgereinigt. Zur Bewertung der Proteine wurde die Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet: Die Proben wurden auf Polyacrylamid-Gele aufgetragen, durch ein elektrisches Feld nach der Ladung der Bestandteile in mehrere Banden aufgetrennt und angefärbt. Als Kriterium für die Auswahl der Proteine wurde die Farbdichte der Bande, die die Proteine enthielt, gewählt.

Es blieben fünf Proteine, die für eine genauere Untersuchung mit dem ITC in Frage kamen. Sie werden im Folgenden näher beschrieben. Die Buchstaben-Zahlen-Kombination in den Klammern hinter den Namen der Proteine geben an, worunter sie in Protein-Datenbanken geführt werden. Hinzu kommen die beiden Abschnitte der Lim-Domäne. Die sogenannten „kleine und große Lim-Domäne“ (137679 und 137672) sind Abschnitte des „cystein- und glycinreichen Protein 2“ (C24599). Diese Abschnitte beinhalten eine Domäne, welche mit Hilfe von Protein-Protein-Wechselwirkungen Entwicklungsprozesse des Zytoskeletts steuern (Peters 2004).

Ein weiterer möglicher Interaktionspartner der SH3-Domäne ist das sogenannte „programmed cell death 6 interacting protein“ (O01523). Dieses Protein wird von dem Humanen-Immunschwäche-Virus (HIV) für dessen Exozytose aus der befallenen Zelle benutzt (Schwedler et al. 2003).

Ein weiteres Protein ist das „heterogenous nuclear ribonuclearprotein A1“ (F10569). Dieser Name bezieht sich auf die Funktion des Proteins, da es den Transport der RNA aus dem Kern unterstützt. Eine Mutation in der DNA dieses Proteins ist mit Magenkrebs assoziiert. (René Descart Universität, Paris 2005).

Das „microtubule-associated protein 1 light chain 3A“ (G11565) spielt eine wichtige Rolle beim Abbau von zytoplasmatischen Komponenten durch das lysosomale System (Kouno T et al. 2005).

Über die Funktion des „hypothetical protein FLJ21610“ (I01538) wurden bisher keine näheren Informationen veröffentlicht.

Das „Rho-GTPase aktivierende Protein“ (I17574) gehört zu der Klasse der Slit-Robo-Proteine. Slit-Robo-Proteine sind an Kontrollfunktionen des gerichteten Nervenwachstums beteiligt, welche unter anderem eine wichtige Rolle bei der Regeneration von Dendriten spielen (Nasu-Nishimura et al.2006). Außerdem ließ sich nachweisen, dass es an der Signaltransduktion der tumor-induzierten Angiogenese beteiligt ist (Bhargava S 2005).

3.2 Expression/Aufreinigung im großen Maßstab

Die SH3-Domäne ließ sich, wie in Abbildung 3.1. zu sehen ist, gut exprimieren: Aus zwei 2 l-Kulturen konnten durchschnittlich 10 ml mit 1,4 mg/ml gewonnen werden. Wie sich anhand des Gels feststellen lässt, konnten durch die Aufreinigung der Lösung sämtliche Verunreinigungen entfernt werden. Im Laufe der Messungen wurde insgesamt ca. 60 mg SH3-Domäne aufgereinigt. Bei den Messungen wurden höhere Konzentrationen benötigt, als sie nach der Aufreinigung vorlagen. Deshalb wurde die Lösung mit der SH3-Domäne aufkonzentriert, bis ihre Endkonzentration höher als 2,2 mg/ml (300 μ M), bzw. 3,6 mg/ml (500 μ M) war.

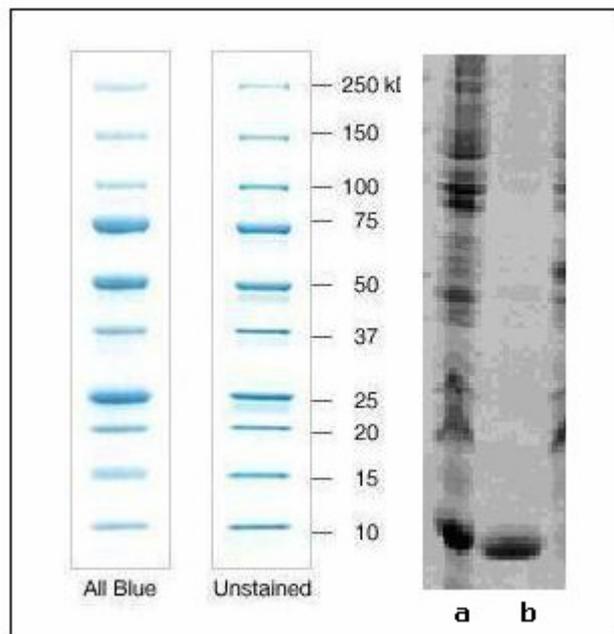


Abb.3.1: Die SH3-Domäne vor (Spur a) und nach (Spur b) der Aufreinigung (auf einem Polyacrylamid-Gel). In der ersten und zweiten Spalte sind die verwendeten Marker dargestellt.

Die möglichen Interaktionspartner der SH3-Domäne wurden in mehreren 2 l-Kulturen exprimiert und dann zuerst mittels der Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC) und anschließend mit der Gelfiltrations-Chromatographie (GFC) gereinigt. Zur Bewertung wurden die Lösungen mit den Proben nach der Expression und nach der Aufreinigung mit der Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht. Die Gele gaben durch den Vorher-Nachher-Vergleich der Banden Auskunft darüber, ob sich das gereinigte Protein in der Lösung befand und wie stark Verunreinigungen noch nach der Aufreinigung vorhanden waren.

Nach der Konzentrationsbestimmung durch die UV/Vis-Spektroskopie und der Auswertung der Gele ergaben sich folgende Ergebnisse:

- Am besten ließen sich das „Rho-GTPase aktivierende Protein“ und das „microtubule-associated protein 1 - light chain 3a“ mit 12 mg pro 2 l-Kultur exprimieren. Allerdings blieben nach der Aufreinigung Verunreinigungen in der Probe zurück (Abb.3.2. Spur Ib, bzw. Spur IIb).
- Die Expression der „großen Lim-Domäne“ ergab 6,5 mg pro 2 l-Kulturen. Nach der Aufreinigung wies das Gel mehrere Banden mit Verunreinigungen auf (Abb.3.2. Spur IVb).
- Die Lösungen mit der „kleinen Lim-Domäne“ und dem „hypothetical protein FLJ21610“, die jeweils aus zwei 2 l-Kulturen hervorgegangen waren, enthielten nach der Aufreinigung 2 mg Protein. In dem Gel mit der „großen Lim-Domäne“ (Abb.3.2. Spur IIIb) ließen sich nur zwei schwache Banden mit Verunreinigungen erkennen und eine stärkere in der Größenordnung von 30 kD. Die Probe mit dem „hypothetical protein FLJ21610“ ließ sich besser als die „kleine Lim-Domäne“ aufreinigen, wie in dem Gelbild in Abb.3.2. Spur VIb zu sehen ist. Doch die Probe war mit einem weiteren Protein verunreinigt. Dieses lag mit dem „hypothetical protein FLJ21610“ in einem Komplex vor, welcher erst durch den Denaturierungsprozess beim Auftragen auf das Gel dissoziiert wurde. Da das fremde Protein relativ groß war (Abb.3.1.2. Spur VIb, obere Bande bei 150 kD), konnte es sich um ein *Chaperon* handeln. Der Name dieser Proteine kommt aus dem Französischen und bedeutet „Anstandsdame“.

Ihre Funktion ist es, Proteine bei ihrer Faltung zu unterstützen. Aufgrund des nicht auflösbaren Komplexes konnte das „hypothetical protein FLJ21610“ nicht für Messungen am ITC benutzt werden. Außerdem deutet eine Bindung an ein Chaperon im Allgemeinen an, dass das Protein seine angestrebte Faltung noch nicht vollständig eingenommen hat. Somit war dieses Protein unbrauchbar für die Messungen am Kalorimeter.

- Das „heterogenous nuclear ribonuclearprotein A1“ ließ sich mit 0,7 mg pro 2 l-Kultur nur schwach exprimieren. Auf dem Polyacrylamid-Gel ließen sich nach der Aufreinigung weitere schwache Banden erkennen, welche auf eine lediglich leichte Verunreinigung der Proben-Lösung hindeuteten (Abb.3.2.Spur Vb).
- Wie sich in Abbildung 3.2. anhand der Spur VII b des Polyacrylamid-Gels erkennen ließ, war nach der Aufreinigung die Bande, in der sich das „programmed cell death 6 interacting protein“ befinden sollte, nicht mehr vorhanden. Da somit die Menge des Proteins zu gering für Messungen mit dem Kalorimeter war, konnte die Probe nicht weiterverwendet werden.

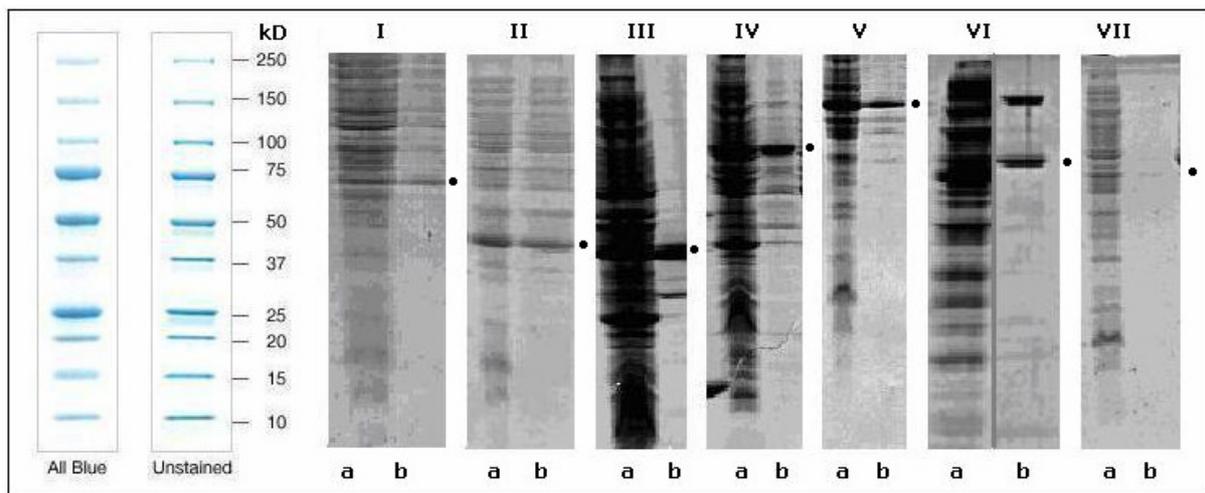


Abb.3.2.: Die möglichen Interaktionspartner der SH3-Domäne vor (Spur a) und nach (Spur b) der Aufreinigung (auf Polyacrylamid-Gelen): „Rho-GTPase aktivierende Protein“ (Spur I), „microtubule-associated protein 1 - light chain 3a“ (Spur II), „kleine Lim-Domäne“ (Spur III), „große Lim-Domäne“ (Spur IV), „heterogenous nuclear ribonuclearprotein A1“ (Spur V), „hypothetical protein FLJ21610“ (Spur VI) und „programmed cell death 6 interacting protein“ (Spur VII). Die schwarzen Markierungen neben den Gelbildern geben an, in welchen Banden sich die Proteine befinden. In der ersten und zweiten Spalte sind die verwendeten Marker dargestellt.

3.3 Ergebnisse der ITC-Messungen

Da die Arbeit am Kalorimeter viel experimentelle Erfahrung erforderte, wurden, wie vom Hersteller empfohlen, zuerst Übungsmessungen durchgeführt. Dazu wurde Wasser auf Wasser, Lösungsmittel auf Lösungsmittel und GTP auf eine RNase titriert. Das Ergebnis der GTP-RNase-Messungen ist in dem Methoden-Teil wiedergegeben (siehe Abbildung 2.2).

In dem nächsten Schritt wurde ermittelt, in welchem Konzentrationsbereich die SH3-Domäne bis zum Abschluss der Messung stabil blieb. Dazu wurde die SH3-Domäne in verschiedenen Konzentrationen in eine Spritze gegeben und zu dem Puffer in der Messzelle titriert. Bei diesen Titrations entstanden Verdünnungswärmesignale.

Die Messungen ergaben, dass die SH3-Domäne stabil blieb, solange sie in der Spritze nicht höher als 550 μM konzentriert wurde. In Abbildung 3.3. ist eine repräsentative Messung dargestellt. Bei den Messungen mit einer höher konzentrierten SH3-Domäne kam es zu einer Denaturierung der Domäne. Dies schränkte die Konzentration der möglichen Interaktionspartner ein, da sie aus weiter unten beschriebenen Gründen nicht höher als ein Zehntel der Konzentration der SH3-Domäne in der Spritze sein sollte. Somit durften die Proteine nicht höher als 55 μM konzentriert werden.

Die Messungen, bei denen die SH3-Domäne auf Puffer titriert wurde, fanden zusätzlich eine Anwendung als Kontrollmessungen. Die bei einer Titration der SH3-Domäne zu einem Interaktionspartner entstehenden Wärmesignale beinhalten immer auch die Verdünnungswärmesignale. Deswegen werden vor der weiteren Auswertung die Wärmesignale der Kontrollmessungen von dieser Messung subtrahiert.

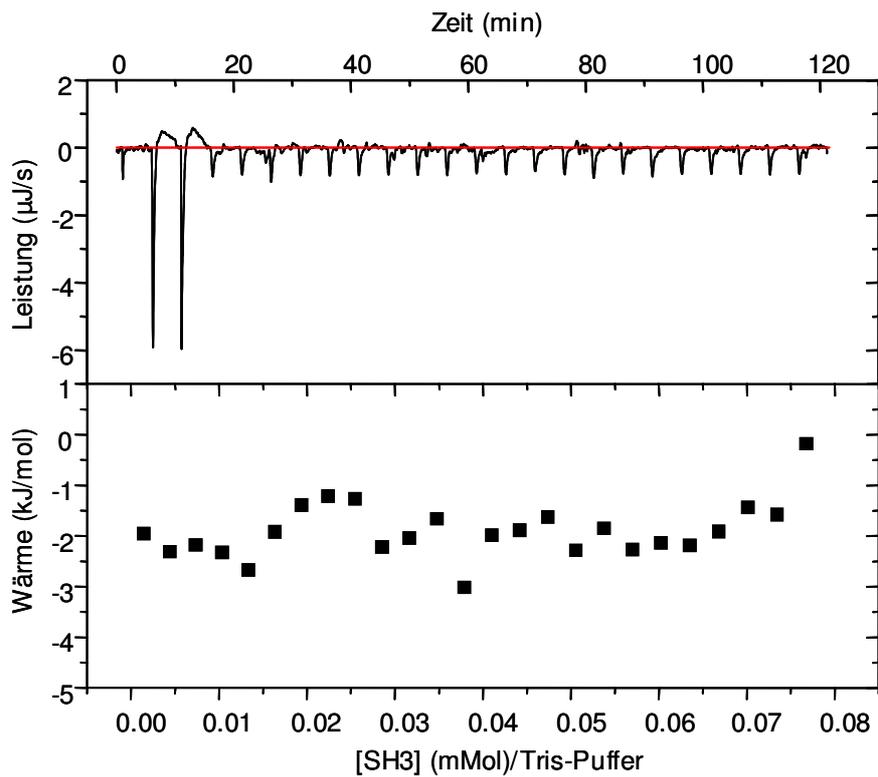


Abb.3.3: Die SH3-Domäne (500µM) wird auf das Tris-Puffer titriert. Die beiden größeren Peaks sind ein gerätebedingter Fehler, doch wie sich aus dem unteren Teil der Abbildung ablesen lässt, ist die entstehende Wärme nicht größer als bei den anderen Peaks.

Nachdem der Konzentrationsbereich feststand, in dem die SH3-Domäne stabil blieb, begannen die Messungen, bei denen die SH3-Domäne zu möglichen Interaktionspartnern titriert wurde. Das „heterogenous nuclear ribonuclearprotein A1“, das „microtubule-associated protein 1 - light chain 3a“ und die „große Lim-Domäne“ fielen während der Messungen aus, was sich zum einen an verrauschten Wärmesignalen wie in Abbildung 3.4. und zum anderen an Flocken denaturierten Proteins in der Messlösung nach Abschluss der Titration erkennen ließ. Pro Protein wurden mindestens drei Messungen mit der SH3-Domäne durchgeführt, um zu bestätigen, dass die Proteine im Verlauf der Messungen denaturierten. Außerdem wurde jeweils eine Messung durchgeführt, bei der statt der SH3-Domäne nur Lösungsmittel auf das Protein titriert wurde. Auch bei diesen Messungen fielen die Proteine aus.

Eine hohe Temperatur, eine hohe Konzentration der Proteine und eine lange Entgasungsdauer der Probe können die Stabilität der Proteine beeinträchtigen. Eine Senkung der Temperatur von 20°C auf 10°C, eine Verminderung der Konzentration der Proteine in der Messzelle unter 25 µM und eine Verkürzung der Entgasungsdauer von fünf auf drei Minuten trugen jedoch nicht zur Stabilisierung der Proteine bei. Das Entgasen der Probe konnte nicht beliebig verkürzt werden, da die Gefahr bestand, dass sich auch nach dem Entgasen noch Gas in der Probe befand. Dieses wurde dann unter Umständen erst während der Messung frei und störte sie dadurch. Andererseits konnte ein unnötig langes oder schnelles Rühren dazu führen, dass Schaum entstand, was auf ein Denaturieren der Proteine hindeutete.

Zusätzlich wurde mit der „großen Lim-Domäne“ stellvertretend ein weiterer Versuche durchgeführt: Jeweils 1 ml der Probe (50µM) mit 250 µl SH3-Domäne (500µM) und 1 ml der Probe (50µM) ohne Zugabe der SH3-Domäne wurden bei Raumtemperatur für drei Stunden in einem Reaktionsgefäß und in der Messzelle des Kalorimeters inkubiert. Die Probe in dem Reaktionsgefäß fielen nicht aus. Hingegen denaturierten die Proteine in der Messzelle. Dies könnte mit dem Materialunterschied der Behälter zusammenhängen. Während die Reaktionsgefäß (*Eppendorf Tubes*) aus Polypropylen bestanden, war das für die Messzellen verwendete Material eine Nickel-Molybdän-Chrom-Legierung. Dieser Versuch wurde dreimal wiederholt und lieferte übereinstimmende Ergebnisse.

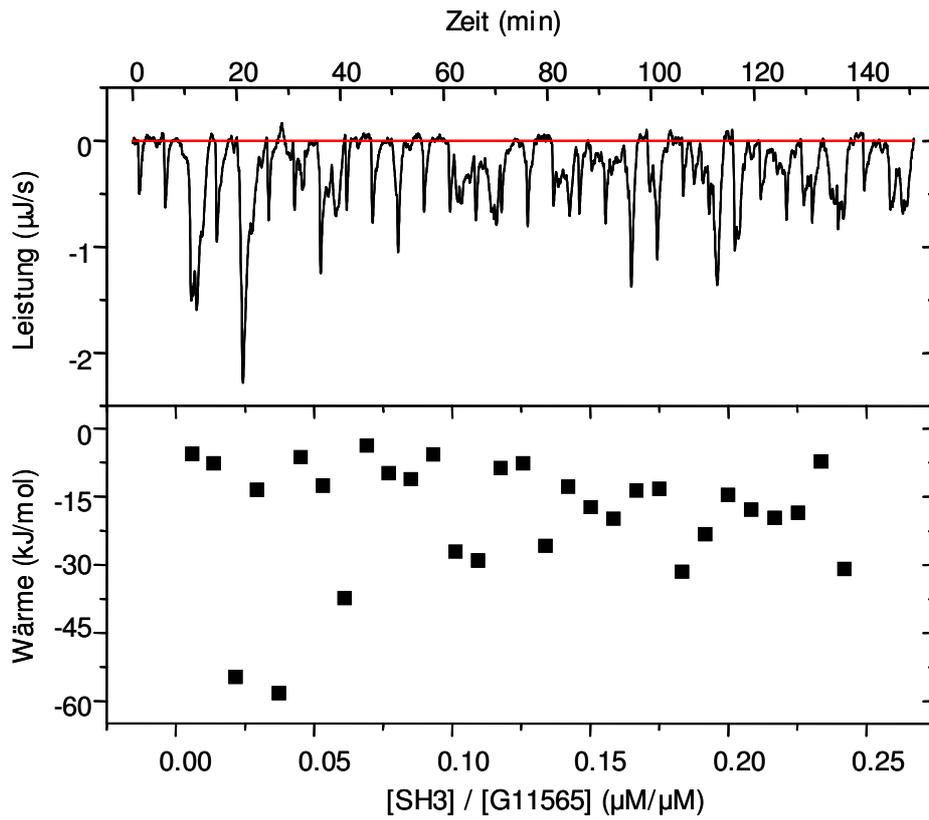


Abb.3.4: Die SH3-Domäne (300 µM) wird auf das "microtubule-associated protein 1 - light chain 3a"-Protein (30 µM) titriert. Während der Messung fiel das Protein aus. Daher wirken die Wärmesignale verrauscht.

Wenn die SH3 und das Protein während einer kompletten Messung stabil blieben, ergab sich ein Bild wie in Abbildung 3.5. Dies traf für die „kleine Lim-Domäne“ und das „Rho-GTPase aktivierende Protein“ zu, weswegen diese Proteine genauer untersucht wurden. Pro Protein wurden zwölf Messungen durchgeführt. Dabei wurden wie schon bei den oben genannten Proteinen die Parameter Temperatur und Konzentration und die Entgasungszeit variiert.

Bei den ersten drei Messungen lag kein optimales Konzentrations-Verhältnis vor, da sich zuerst vorrangig die Frage stellte, ob überhaupt ein Wärmesignal gemessen werden würde. Die SH3-Domäne war bei diesen Versuchen nur fünfmal höher konzentriert als die Proteine in der Zelle. Ein optimales Konzentrationsverhältnis lag vor, wenn die SH3-Domäne am Ende der Messung in der Zelle in der zweifachen Konzentration der möglichen Interaktionspartner vorlag. Dazu musste das Konzentrationsverhältnis SH3-Domäne:möglicher Bindungspartner am Anfang der Messungen 10:1 betragen. Konkret wurden bei diesen Messungen die Verhältnisse 300µM:30 µM und 500 µM:50 µM verwendet.

Sowohl bei den Anfangsmessungen mit der „großen Lim-Domäne“ als auch bei den Messungen mit optimalem Konzentrationsverhältnis konnten Wärmesignale gemessen werden, die sich eindeutig von Verdünnungssignalen unterschieden; es ließ sich jedoch keine Sättigungstendenz feststellen.

Bei den Messungen mit dem „Rho-GTPase aktivierende Protein“ schien es bei den ersten vier Versuchen mit einer im Verhältnis zu hohen Konzentration in der Zelle eine Tendenz zur Sättigung zu geben. In Abb.3.5. lässt sich die Verkleinerung der letzten Wärmesignale erkennen. Diese vermeintliche Sättigungstendenz ließ sich in den weiteren Messungen mit einem optimalen Konzentrationsverhältnis nicht bestätigen.

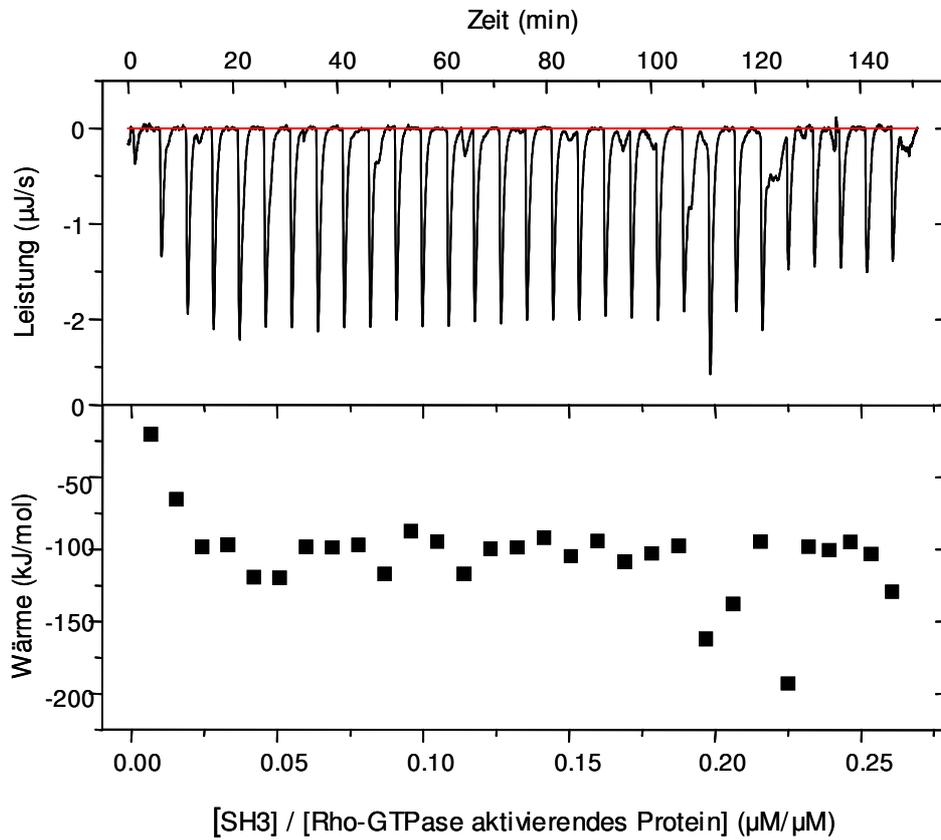


Abb.3.5: Die SH3-Domäne (300 μM) wird auf das „Rho-GTPase aktivierende Protein“ (80 μM) titriert. Bei dieser Titration ist das Verhältnis von SH3-Domäne zu dem möglichen Interaktionspartner noch nicht optimal, da hier lediglich festgestellt werden soll, ob Wärmesignale entstehen, die sich von den Wärmesignalen der Verdünnung unterscheiden lassen. Dabei schien sich eine Tendenz zu ergeben, die sich aber in weiteren Messungen nicht bestätigen ließ.

4. Diskussion

4.1 Isotherme Titrationskalorimetrie als Methode

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich die isotherme Titrationskalorimetrie für die Messung der Interaktion zwischen der SH3-Domäne und möglichen Interaktionspartnern eignet.

Die isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) hat zwei große Vorteile gegenüber anderen Methoden (siehe Kapitel 4.3.), mit denen Protein-Protein-Interaktionen gemessen werden. Zum einen müssen die Proteine nicht für die Untersuchung am Kalorimeter modifiziert werden. Zudem kann durch eine einzelne Messung die Affinität der Interaktionspartner (K_d -Wert) und die Reaktionsenthalpie (ΔH) bestimmt werden. Mit wenigen Rechenschritten lassen sich zudem die freie Enthalpie der Reaktion (ΔG) und die Entropieänderung des Systems (ΔS) bestimmen.

Nach der Auswertung der Messungen wurde deutlich, dass die ITC durch vier Faktoren in ihrer Verwendbarkeit für Protein-Protein-Interaktionsmessungen eingeschränkt werden: Durch die benötigte Proteinmenge, die Dauer einer Messung am Kalorimeter, die Stabilität der Proteine und die Größe der Wärmesignale.

Pro Einzelmessung am Kalorimeter wird eine große Menge an Protein verbraucht, so dass sich die Untersuchung nur bei Proteinen lohnt, die in ausreichendem Maße exprimiert werden können. Von den dreißig Proteinen, die zuvor als mögliche Interaktionspartner der SH3-Domäne bestimmt wurden (Faupel 2004), kamen nach der Expression im kleinen Maßstab nur fünf Proteine für eine Untersuchung am Kalorimeter in Frage. Die restlichen 26 Proteine konnten somit nicht untersucht werden. Außerdem stellte sich nach der Expression des „programmed cell death 6 interacting protein“ in einer 2 l-Kultur heraus, dass es nicht in einer ausreichenden Menge exprimiert wurde.

Aufgrund der Dauer einer Einzelmessung, die im Durchschnitt drei Stunden betrug, wurden für die Untersuchung einer Interaktionen zwischen der SH3-Domäne und einem möglichen Interaktionspartner mehrere Tage benötigt. Daher ist die Messungen nicht für ein sogenanntes Screening geeignet, bei dem möglichst viele Proteine in einem möglichst kurzen Zeitraum untersucht werden.

Die Stabilität der Proteine kann aus unterschiedlichen Gründen eingeschränkt sein (siehe Kapitel 4.2). Die Messungen mit dem dem „hypothetical protein FLJ21610“, dem „microtubule-associated protein 1 light chain 3A“, der „große Lim-Domäne“ des „cystein- und glycinreichen Protein 2“ und dem „heterogenous nuclear ribonuclearprotein A1“ lieferten keine brauchbaren Ergebnisse, da die Proteine während der Messungen ausfielen.

Des Weiteren wird allgemein bei vielen Protein-Protein-Interaktionen nur eine geringe Reaktionsenergie frei, bzw. aufgenommen. Die Wärmesignale am ITC sind dadurch häufig kleiner als $0,21 \mu\text{Cal/s}$. Damit sind sie aber zu klein, um ausgewertet zu werden (Handbuch des Geräteherstellers). Höhere Konzentrationen der Proteine können die Wärmesignale vergrößern, doch die höchstmögliche Konzentration wird durch die Stabilität der Proteine begrenzt. Das „Rho-GTPase aktivierende Protein“ und die „kleinen Lim-Domäne“ des „cystein- und glycinreichen Protein 2“ blieben während der Messungen stabil und erfüllten somit die Grundvoraussetzung, um am ITC untersucht zu werden. Doch die SH3-Domäne ließ nicht mit einer höheren Konzentration als $550 \mu\text{M}$ für die kalorimetrischen Messungen verwenden (siehe Kapitel 4.2). Daher konnten nur die Messungen ausgewertet werden, bei denen die Proteine in der Zelle im Verhältnis zu hoch konzentriert waren. Bei den Messungen mit optimalem Konzentrationsverhältnis ließen sich zwar auch Wärmesignale nachweisen, doch waren diese zu klein um ausgewertet zu werden.

4.2 Stabilisierung der SH3-Domäne

Die verwendete SH3-Domäne des Endophilin-1 wurde in der Spritze des Kalorimeters als Ligand verwendet. Sie blieb während der Messungen nur bis zu einer Konzentration von 550 μM stabil. Wurde sie höher konzentriert, fiel sie aus. Dies limitierte die Messungen, da die möglichen Bindungspartner in der Zelle niedrig konzentriert werden mussten, um das optimale Konzentrationsverhältnis aufrecht zu halten. Als Folge dessen konnten nur geringe Wärmesignale registriert werden. Da das optimale Spritze: Zelle-Verhältnis der Interaktionspartner 10:1 bis 20:1 betrug, mussten dementsprechend die Interaktionspartner in der Zelle in einer Konzentration unter 55 μM vorliegen. Ließe sich die SH3-Domäne während der Messungen besser stabilisieren, könnten höhere Konzentrationen der SH3-Domäne eingesetzt werden und die Wärmesignale würden sich voraussichtlich vergrößern.

Zwei Faktoren, die einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität eines Proteins haben, sind der pH-Wert der Lösung und die Temperatur. Der pH-Wert wurde bei dieser Arbeit direkt vor den Messungen überprüft. Dadurch lag er sicher in dem physiologischen Bereich von 7,35 - 7,4. Bei einer Temperatur von 36,5 °C haben viele humane Proteine ihr Funktionsmaximum, da dies der Körpertemperatur des Menschen entspricht. Allerdings liegen die Proteine in der Zelle häufig in Komplexen mit anderen Proteinen vor, wodurch sie stabilisiert werden. In den Messlösungen ist dies nicht der Fall. Bei einer Temperatur von 36,5 °C denaturieren daher viele Proteine während der Messungen am Kalorimeter, da die durchschnittliche Dauer einer Messung drei Stunden beträgt. Eine Senkung der Temperatur kann somit die Stabilität der Proteine erhöhen. Daher wurden die Titrationsen dieser Arbeit bei 10 °C und 25 °C durchgeführt.

Die Zusammensetzung der Salze eines Puffers können die Stabilität eines Proteins beeinflussen, selbst wenn die Zusammensetzung physiologisch ist. Der bei diesen Versuchen eingesetzte Tris-Puffer (Ferreon 2004) hat den Vorteil, dass er eine hohe Protonierungsenergie besitzt. Bei einer Interaktion zwischen zwei Interaktionspartnern kann es zu einer Protonierung oder Deprotonierung kommen. Dadurch kommt es bei der Verwendung von Tris-Puffer im Vergleich mit Imidazol- oder Phosphatpuffern zu der Bildung einer erhöhten Protonierungs-Energie, welche die Wärmesignale verstärkt.

Bei Messungen mit Proteinen, über die noch nicht viele Informationen über ihr Verhalten bei der ITC bekannt sind, ist diese Verstärkung von Signalen von Vorteil (Pierce 1999). Für die Auswertung der Titration, insbesondere für die Bestimmung von ΔH , ist es jedoch unerlässlich, die Messungen außerdem mit einem Puffer durchzuführen, der nur eine niedrige Protonierungsenergie besitzt. Diese Wärmesignale geben dann unverstärkt die Wärmemenge wieder, die bei der Interaktion frei, bzw. aufgenommen wird.

Zusätzlich gibt es neben dem eingesetzten Glycerin weitere Substanzen, die Proteine stabilisieren wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Albumin oder Dithiothreitol (DTT). Dabei ergeben sich jedoch folgende Schwierigkeiten: EDTA beeinflusst die Messungen des Titrationskalorimeters, Albumin bildet Komplexe mit den Proteinen und DTT beeinflusst die Faltung der Proteine. Dadurch werden die Funktionsmessungen der Proteine am Kalorimeter unmöglich gemacht. Es ist demnach schwierig, Substanzen zu finden, die für eine Proteinstabilisierung im Rahmen der isothermen Titrationskalorimetrie geeignet sind.

4.3 Aussicht

4.3.1 Weitere Methoden der Interaktionsmessung

Es gibt neben der isothermen Titrationskalorimetrie weitere Methoden, mit denen sich Interaktionen zwischen Molekülen nachweisen lassen. Doch als Voraussetzung für eine Messung müssen bei diesen Methoden Modifikationen an den Proteinen vorgenommen werden.

Bei der Plasmonenresonanz-Methode (z.B. von Biacore) wird einer der Bindungspartner in einem festen Medium auf einem sogenannten *Chip* immobilisiert. Der zweite Bindungspartner wird in einem Puffer gelöst über diesen *Chip* geleitet. Währenddessen wird der Brechungsindex über dem *Chip* gemessen. Er ändert sich proportional zu der Anzahl der Interaktionen, die die Bindungspartner eingehen.

Bei der Methode des *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) werden die Interaktionspartner mit fluoreszierenden Farbstoffen versehen. Einer der Interaktionspartner wird mit einem Donor-Farbstoff (Cyan fluoreszierendes Protein, CFP) versehen, der nach Lichtanregung Licht der Wellenlänge 476 nm abgibt. Der andere Interaktionspartner erhält einen Akzeptor-Farbstoff (gelb fluoreszierendes Protein, YFP). Findet eine Interaktion statt, wird die Energie des angeregten CFP auf das YFP übertragen. Somit befindet sich dann das YFP in einem angeregten Zustand und gibt Licht der Wellenlänge 527 nm ab. Gemessen wird die Übertragung der Energie an einem Fluoreszenzmikroskop. Aus der gemessenen Fluoreszenz-Intensität von Donor und Akzeptor lässt sich dann die Messung auswerten (Siegel 2000).

Bei dem Hefe-Zwei-Hybrid-System (Y2H) wird ein Transkriptionsfaktor der Hefe in zwei Untereinheiten aufgetrennt. Diese Untereinheiten werden jeweils mit einem der Interaktionspartner verbunden. Findet eine Interaktion zwischen den Interaktionspartnern statt, funktionieren die Untereinheiten wieder als Einheit und dementsprechend wieder als Transkriptionsfaktor. Ob eine Interaktion stattgefunden hat, lässt sich daran erkennen, ob das Zielprotein des Transkriptionsfaktors verstärkt exprimiert wird (Kretsch 2006).

Die Methoden der FRET und des Y2H-Systems haben den Nachteil, dass sich nur feststellen lässt, ob eine Interaktion stattgefunden hat, sich aber nur sehr bedingt quantitative Aussagen machen lassen.

4.3.2 ITC: Die möglichen Bindungspartner der SH3-Domäne als Peptide

Die Messungen am Kalorimeter wurden dadurch limitiert, dass die SH3-Domäne ab einer Konzentration von 550 μM ausfiel. Würde die SH3-Domäne in der Messzelle statt in der Spritze verwendet werden, könnte der Ligand in der Spritze bei einem optimalen Verhältnis von 10:1 (Spritze:Zelle) mit einer Konzentration von 5,5 mM verwendet werden.

Da es sich bei den möglichen Bindungspartnern der SH3 um Proteine handelt, wären sie zu groß, um als Liganden verwendet zu werden. Deswegen sollten die Proteine in mehrere Peptidabschnitte unterteilt werden. Hierbei wären die prolinreichen Abschnitte als bindende Regionen von besonderem Interesse. Frühere Messungen, bei denen Peptide zu der SH3-Domäne titriert wurden, ließen sich mit guten Ergebnissen durchführen (Ferreon 2004).

Mit dieser Methode könnte untersucht werden, ob eine Affinität zwischen der SH3-Domäne und ihren möglichen Bindungspartnern besteht, ohne dass den Peptiden zusätzlichen Aminosäureabschnitte oder Farbstoffe hinzugefügt werden müssten. Bei den oben angegebenen Konzentrationen der SH3-Domäne und der Peptide würde zudem die entstandene Wärme voraussichtlich ausreichen, um die Messung sicher auswerten zu können.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte festgestellt werden, ob sich die isotherme Titrationskalorimetrie als Methode eignet, um Interaktionen zwischen der SH3-Domäne des Endophilin-1 und 30 möglichen Interaktionspartnern (Faupel 2004) bzw. der sogenannten Lim-Domäne, einem Abschnitt des „cystein- und glycinreichen Proteins 2“, nachzuweisen.

Die Untersuchung von Interaktionen erfolgte in mehreren Schritten: Bei den möglichen Interaktionspartnern handelt es sich um Proteine, die zunächst darauf überprüft wurden, ob sie sich in einer Menge exprimieren und aufreinigen ließen, die für eine Messung am ITC ausreicht. Dies traf auf die folgenden Proteine zu: „programmed cell death 6 interacting protein“, „heterogenous nuclear ribonuclearprotein A1“, „microtubule-associated protein 1 light chain 3A“, „hypothetical protein FLJ21610“ und das „Rho-GTPase aktivierende Protein“. Somit wurden diese Proteine, die SH3-Domäne und zwei Abschnitten des „cystein- und glycinreichen Proteins 2“ exprimiert und mittels Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC) und Gelfiltrations-Chromatographie (GFC) aufgereinigt. Darauf folgten die Messungen am isothermen Titrationskalorimeter.

Die Messungen ergaben, dass die isotherme Titrationskalorimetrie durch vier Faktoren in ihrer Anwendbarkeit für den Nachweis von Interaktionen zwischen der SH3-Domäne und möglichen Interaktionspartnern eingeschränkt wird. Bei diesen Faktoren handelt es sich um die benötigte Proteinmenge, die Dauer einer Messung am Kalorimeter, die Stabilität der Proteine und die Größe der Wärmesignale.

Die Messungen am Kalorimeter wurden besonders dadurch limitiert, dass die SH3-Domäne ab einer bestimmten Konzentration ausfiel. Für weitere Untersuchungen wäre es daher wichtig, eine Möglichkeit zu finden, die SH3-Domäne auch in höheren Konzentrationen zu stabilisieren. Außerdem könnte eine veränderte Messweise am Titrationskalorimeter die Messungen unterstützen. Bei Verwendung der SH3-Domäne in der Messzelle anstatt in der Spritze, könnte der mögliche Bindungspartner in entsprechend höherer Konzentration eingesetzt werden. Dazu wäre es notwendig, die Bindungsstellen der Interaktionspartner zu isolieren.

ANHANG A

Literaturverzeichnis

Bhargava S. Charakterisierung von Slit/Robo beim duktalem Pankreaskarzinom und Evaluierung als anti-angiogenes Target. 2005 <http://www.huberlin.de/forschung/fdb/deutsch/PJ/PJ1999982289.html>

Büssow K, Quedenau Q, Sievert V et al. A catalog of human cDNA expression clones and its application to structural genomics. *Genome Biology* 2004;5:71.1-8

Campoya AV, Freire E. ITC in the post-genomic era. . .? Priceless. *Biophysical Chemistry* 2005;115:115- 124

Faupel T. Identification of protein-protein interactions *in vitro* based on high-density protein arrays. Dissertation 2004; Technische Universität Berlin

Ferreon JC, Hilser VJ. Thermodynamics of binding to SH3 domains: The energetic impact of polyprolin II helix formation. *Biochemistry* 2004;43:7787-7797

Genatlas der René Descart Universität, Paris 2005

Kay BK, Williamson MP, Sudol M. The importance of being proline: The interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *Faseb J* 2000;14:231-41

Kouno T, Mizuguchi M, Tanida I et al. Solution Structure of Microtubule-associated Protein Light Chain 3 and Identification of Its Functional Subdomains. *J. Biol. Chem* 2005;280:24610-24617

Kretsch T. Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe des Hefe Two-Hybrid-Systems. *Biotechnologie für Lehramtskandidaten*. Freiburg, Institut für Biologie. 2006

Lemmon MA, Ladbury JE. Thermodynamic studies of tyrosyl-phosphopeptid binding to the SH2 domain of p56. *Biochemistry* 1994;33:5070-5086

Mayer BJ. SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci* 2001;114:1253-63.

Nasu-Nishimura Y, Hayashi T, Ohishi T. Role of the Rho GTPase-activating protein RICS in neurite outgrowth. *Genes Cells* 2006;11:607-14

Nock S, Wagner P. Proteomics: Die post-genomische Revolution. *Chemie in unserer Zeit*. 34. Jahrgang. Weinheim, Wiley-VCH Verlag 2000

Pace CN, Vajdos F, Fee L et al. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 1995;4:2411-23

Peters M. Funktionen der Ubiquitinligasen RLIM und Rnf6 in der Regulation von LIM-Domänen Proteinnetzwerke. Dissertation 2004. Universität Hamburg

Pierce MM, Raman CS, Nall BT. Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions. *Methods* 1999;19:213-221

Schwedler U, Stuchel M, Müller B et al. The protein network of HIV budding. *Cell press* 2003;114:701-713

Seewald K. Bioanalytik - Proteinanalytik. http://www.genetik.uni-bielefeld.de/Genetik/phyto/docs/bioanalytik_Stunde4_4.pdf (21.08.06).

Siegel RM, Chan FK, Zacharias DA et al. Measurement of molecular interactions in living cells by fluorescence energy transfer between variants of the green fluorescent protein. *Sci* 2000;38:PL1.

Uetz P, Pohl E. Protein-Protein und Protein-DNA-Interaktionen. *Molekulare Biotechnologie* (Wink et al). Weinheim, Wiley-VCH Verlag. 2004

Watson JD, Laskowski RA, Thornton JM. Predicting protein function from sequence and structural data. *Structural Biology* 2005;15:275-284

Bildquellen

Uetz P, Pohl E. Protein-Protein und Protein-DNA-Interaktionen. *Molekulare Biotechnologie* (Wink et al), Wiley-VCH 2004

Winstead ER. Yeast Proteomics. *JC Venter Institute GNN* 2002.

Kay BK, Williamson MP, Sudol M. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *Faseb J* 2000;14(2):231-41

Tong AHY, Drees B, Nardelli G et al. A Combined Experimental and Computational Strategy to Define Protein Interaction Networks for Peptide Recognition Modules. *Science* 2002;295:321-324

Universität Jena. Proline – SH3-domains.

<http://www.imb-jena.de/ImgLibDoc/cispep/proline/SH3.html> (13.03.06).

ANHANG B

Erklärung

„Ich, Anna Amrit Jarchow, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationschrift mit dem Thema *-Interaktion zwischen der SH3-Domäne des humanen Endophilins und möglichen Interaktionspartnern – Expression und isotherme Titrationskalorimetrie-* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

ANHANG C

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

ANHANG D

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. K. P. Hofmann dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit an dem Institut für medizinische Physik und Biophysik durchzuführen.

Außerdem gilt mein Dank Dr. Martin Heck für seine Betreuung und seine Geduld. Ich bin sehr froh über die Erfahrungen, die ich den letzten zwei Jahren gesammelt habe. Manchmal gilt einfach: Zähne zusammen beißen und durch.

Kerstin Zimmermann möchte ich dafür danken, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. So entmutigt konnte ich gar nicht sein, dass sie mich nicht wieder aufgebaut hätte.

Als mich der Computer im Stich ließ, hat Andreas von Usedom mich dabei unterstützt, meine Daten zu retten. Dafür mein Dank!

Allen weiteren Mitarbeitern des Institutes für medizinische Physik und Biophysik möchte ich dafür danken, dass ich mich als Medizinerin zwischen lauter Naturwissenschaftler nie verloren gefühlt habe.

Ich möchte Dr. Konrad Büssow und seiner Arbeitsgruppe vom Max-Planck-Institut für molekulare Genetik dafür danken, dass ich dort die Expression der Proteine durchführen konnte. Ohne Dr. Christoph Scheich, Claudia Quedenau und Janett Tischer hätte ich wohl nicht gelernt, was man alles beachten muss, wenn man möchte, dass die Bakterien auch wachsen.

Zu guter letzt bedanke ich mich bei meiner Familie. Ohne ihre Zuversicht und ihr Vertrauen wäre mir die Durchführung dieser Arbeit eindeutig schwerer gefallen.