

Strukturelle und funktionelle Genomik
von nicht-katalytischen Domänen
aus humanen Proteinen
am Beispiel von RUN-, SEP- und WW-Domänen

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

Apotheker Michael Soukenik
aus Mutlangen

Mai 2005

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Oschkinat
FG NMR-unterstützte Strukturforschung
Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie
Campus Berlin-Buch
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin
Deutschland

2. Gutachter: Prof. Dr. U. Heinemann
FG Kristallographie
Max-Delbrück-Center für Molekulare Medizin
Robert-Rössle-Str. 10
13122 Berlin
Deutschland

Datum der Disputation am 24.10.2005

Danksagung

Die hier vorgestellte Arbeit entstand am Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie (FMP) auf dem Campus Berlin-Buch. Nachfolgend möchte ich gerne allen beteiligten Personen für die sehr gute und kooperative Zusammenarbeit während meiner Promotionszeit danken.

Herrn Prof. Dr. Hartmut Oschkinat danke ich ganz herzlich für die Vergabe des Themas, seiner Unterstützung, sowie für zahlreiche Ideen und Vorschläge zur Durchführung der Domänenprojekte in seiner Arbeitsgruppe „NMR-supported structural biology“ am FMP. Insbesondere gilt mein Dank meiner „Doktormutter“ Dr. Anne Diehl, die mich von Anfang an stets beratend, sehr engagiert und mit wachem Auge durch die Projekte begleitet hat. Sie ermöglichte mir den Einstieg in die experimentellen Arbeiten der Proteinchemie und sorgte immer für eine offene und herzliche Stimmung im Labor mit viel Kuchen ...

Ein besonderer Dank gehört Dr. Dietmar Leitner und Dr. Dirk Labudde für die Einführung in die NMR-Spektroskopie und Strukturrechnung mit ARIA sowie bei zahlreichen Hilfestellungen und Anregungen zur Bewerksstellung dieser Arbeit. Weiter möchte ich mich bei Dr. Linda Ball und Dr. Peter Schmieder bedanken für die Unterstützung bei der NMR-Spektroskopie.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich den Mitarbeitern der Proteinstrukturfabrik Berlin für die Zuverfügungstellung der p47 SEP Klone, den beiden technischen Angestelltinnen Martina Leidert und Kristina Rehbein für die Unterstützung bei der Herstellung zahlreicher Proteine und bei Dr. Dorit K. Nägler (Institut für klinische Chemie und Biochemie, LMU München) für die durchgeführten Inhibitionsstudien der p47 SEP Domäne und für die Überlassung der humanen Protease Cathepsin L.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Ricardo Pires für die sehr engagierte Betreuung bei der Komplex-Strukturbestimmung der humanen WW Domäne Gas7 und bei Dr. Livia Otte und Dr. Michael Beyermann für die Bereitstellung der synthetisch hergestellten benötigten Peptide.

Herrn Prof. Dr. Udo Heinemann (MDC) danke ich für die Möglichkeit sein Labor für die Durchführung von Kristallisationsansätzen nutzen zu können. Dabei möchte ich mich ganz

herzlich bei Dr. Katja Fälber und Anette Feseke für die Einführung in die experimentellen Arbeiten dort bedanken .

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „NMR-supported structural biology“ gilt mein Dank für die angenehme und kreative Arbeitsatmosphäre und für tolle stimmungsvolle Seminarfahrten, insbesondere in die sächsische Schweiz, nach Malchin, Rügen und zum Brückentensee. Mein Gruß und besonderer Dank geht an Urs Wiedemann, Matthias Hiller , Dr. Prisca Boisguerrin und Christoph Brockmann für wertvolle Hilfestellungen bei der Arbeit im Labor und am Rechner und Andrea Steuer für die Erledigung aller bürokratischer Vorkommnisse.

„Sport frei !“ – ein Dank und Gruß an das Fussball und Badminton Team des FMP/ MDC für die Erholung nach der Arbeit und für endlose Matches drinnen und draußen. Ebenso gebürt mein Dank an die Eiswanderer Arvid und Dietmar für aufregende, unvergessliche Ausflüge in die Berliner und Brandenburgische Seenlandschaft.

Im besonderen möchte ich mich bei meiner Freundin Anne, Ihrer sowie meiner Familie und bei meinen Freunden Florian und Hans-Christian, für die Motivationsschübe und den notwendigen Rückhalt während meiner Doktorandenzeit bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Proteindomänen	1
1.1.1	Verwendung des Domänenbegriffes in der Strukturbiologie	2
1.1.2	Direkte und indirekte Verfahren zur Vorhersage von Domänen	3
1.2	Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen durch nicht-katalytische Domänen	4
1.2.1	WW-Domäne	4
1.2.2	Klassifizierung von WW-Domänen aufgrund ihrer spezifischen Bindungsmotive	7
1.3	Strukturell und funktionell nicht klassifizierte Domänen	9
1.3.1	RUN-Domäne	9
1.3.2	SEP-Domäne	11
1.3.2.1	Modularer Aufbau des Adaptorproteins p47	11
1.3.2.2	Biologischer Kontext p47/p97	12
1.4	NMR-Spektroskopie	14
1.4.1	Prinzipien der NMR-Spektroskopie	14
1.4.1.1	Chemische Verschiebung	15
1.4.1.2	Skalare Kopplungen und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen	16
1.4.2	Klassische und moderne Verfahren zur Strukturbestimmung von Proteinen	17
1.5	Aufgabenstellung	18
1.6	Referenzen	19
2	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Bakterienstämme	25
2.1.2	Klonierungsvektoren	25
2.1.3	Expressionsvektoren	25
2.1.4	Puffer und Lösungen	25
2.1.5	Medien	26
2.1.6	Synthetische Peptide	27
2.2	Molekularbiologische Methoden	28
2.2.1	Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels PCR	29
2.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	31
2.2.3	Transformation der Plasmide in chemisch kompetente Zellen	31
2.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA	32
2.2.4.1	Photometrische Bestimmung von DNA Präparationen	32
2.3	Biochemische Methoden	32
2.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	32
2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-Page)	32
2.3.3	Proteinexpression und Reinigung	33
2.3.3.1	RUN-Konstrukt (1-180) aus dem humanen Protein RUFY 1	33
2.3.3.2	SEP-Konstrukte des humanen Protein p47	34

2.4	NMR-Spektroskopie.....	36
2.4.1	WW-Domäne	36
2.4.2	SEP-Domäne.....	36
2.5	Strukturrechnung mit ARIA/CNS.....	39
2.6	Herstellung der Cysteinproteasen Cathepsin L, B und X	40
2.6.1	Enzymkinetische fluorimetrische Messungen mit den Cathepsinen L, B und X	41
2.7	Weitere Methoden.....	42
2.8	Referenzen	43
3	Generierung von Domänenkonstrukten für die NMR-Strukturbestimmung	45
3.1	Herstellung von Expressionskonstrukten am Beispiel der RUN-Domäne	45
3.2	Proteinpräparation und Reinigung der RUN-Domäne (1-180) aus dem humanen Protein RUFY1	47
3.3	NMR-spektroskopische Untersuchungen	48
3.4	Welche Anforderungen an die Probengüte sind für die NMR-Strukturbestimmung zu stellen?	50
3.4.1	Welche Bedingungen erfüllt das RUN-Konstrukt (1-180) ?	50
4	NMR-Struktur-Funktions-Bestimmung der humanen p47 SEP-Domäne	51
4.1	Proteinpräparation und Reinigung des humanen p47 SEP-Domänenkonstruktes G1-S2-p47 (171-270).....	51
4.2	Resonanzzuordnung	53
4.2.1	Strategie der Resonanzzuordnung.....	53
4.2.2	Zuordnung der Signale des Peptidrückgrats	55
4.2.3	Zuordnung der aliphatischen und aromatischen Seitenkettensignale.....	60
4.2.4	Abschluß der Resonanzzuordnung	61
4.2.5	Sekundärstrukturvorhersagen auf Basis der gefundenen chemischen Verschiebungen	63
4.3	Berechnung der Proteinstruktur mit ARIA/CNS	64
4.3.1	Ermittlung zusätzlicher Abstandsrandbedingungen	64
4.3.2	Finale Strukturrechnung der humanen p47 SEP-Domäne.....	66
4.4	Die NMR-Struktur der humanen p47 SEP-Domäne	67
4.4.1	Strukturbeschreibung.....	67
4.4.2	Dynamikuntersuchungen am G1-S2-p47 (171-270) Konstrukt	70
4.4.3	Proteinsequenzalignment und experimentelle Domänengrenzen.....	72
4.4.4	Oberflächen der humanen p47 SEP-Domäne.....	73

4.5	Entwicklung einer strukturbasierten Hypothese zur Funktion der p47 SEP-Domäne	75
4.5.1	Vergleich der p47 SEP-Domäne mit Cysteinproteinase-Inhibitoren aus der Cystatin-Superfamilie	76
4.5.2	Bestimmung der Inhibition der Cathepsine L, B und X durch G1-S2 p47 (171-270) mittels eines Fluoreszenz-Aktivitätsassay	77
4.5.3	NMR-Titration von deuteriertem ¹⁵ N markiertem G1-S2 p47(171-270) mit unmarkiertem Cathepsin L.....	78
4.6	Diskussion	81
4.6.1	Struktureller Vergleich der p47 SEP-Domänen aus Rattus norvegicus und Homo sapiens	81
4.6.2	Welche Bedeutung hat der konservierte Sequenzabschnitt (250-262) für das p47 Protein ?	82
4.6.3	Analyse der Wechselwirkung zwischen der p47 SEP-Domäne und den Cathepsinen L,B und X	82
4.7	Ausblick	83
4.8	Referenzen.....	83
5	NMR-Komplexstruktur der hGas7 WW-Domäne mit dem prolinreichen Liganden LIPPPPPL	87
5.1	Resonanzzuordnung des Komplexes der hGas7 WW-Domäne mit dem Peptid LIPPPPPL	87
5.2	ARIA/CNS-Strukturrechnung für den Komplex der hGas7 WW-Domäne und dem Liganden LIPPPPPL	89
5.3	Die Struktur des Komplexes aus der hGas7 WW-Domäne mit dem prolinreichen Liganden LIPPPPPL	89
5.4	Diskussion	93
5.5	Referenzen.....	95
	Zusammenfassung/Summary.....	96
	Anhang.....	101
	Abkürzungsverzeichnis	
	Publikationen	
	Curriculum Vitae	