

Struktur und Funktion von EVH1-Domänen

—

Structure and Function of EVH1 Domains

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
Jürgen Zimmermann
aus Siegburg

Juni 2004

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit habe ich von Mai 2000 bis Februar 2004 am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie Berlin unter Leitung von Dr. Linda J. Ball and Prof. Dr. Hartmut Oschkinat angefertigt.

Dissertation eingereicht am: 02. März 2004

Tag der Disputation: 13. Juli 2004

Erstgutachter: Prof. Dr. Hartmut Oschkinat

Zweitgutachter: Prof. Dr. W. Saenger

Ich erkläre, alle Hilfsmittel und Hilfen vollständig angegeben und diese Arbeit selbständig verfasst zu haben.

Berlin, den 02. März 2004

Table of Contents

Curriculum vitae	7	
Acknowledgements	8	
Abbreviations	9	
Aufgabenstellung und Zielsetzung	10	
Aim of this work	12	
1	Introduction	14
	1.1 EVH1 domains are protein-protein interaction modules	16
	1.2 Proline is special	17
	1.3 Spred proteins contain a new class of EVH1 domains	18
2	Design of ligands for the human VASP EVH1 domain	19
	2.1 Design of a peptomer library	20
	2.2 Binding studies of peptomer ligands by Biacore	24
	2.3 Binding studies of peptomer ligands by NMR: Chemical shift mapping	26
	2.4 Models of Binding and Ligand Design	28
	2.5 Discussion	34
3	Oligomerization and structural characterization of the human VASP EVH2 domain	35
	3.1 CD spectroscopy	37
	3.2 NMR Resonance Assignment	38
	3.3 Analytical ultracentrifugation	40
	3.4 ¹⁵ N relaxation measurements	42
	3.5 Symmetry Considerations	45
	3.6 Residual Dipolar Couplings	46
	3.7 Model of EVH2 monomer	49
	3.8 Discussion	50
4	Structure of the human Spred2 EVH1 domain	52
	4.1 Resonance assignment	53
	4.2 ¹⁵ N relaxation measurements	55
	4.3 Dihedral angle restraints	56
	4.4 CYANA structure calculation	58
	4.5 Structure analysis	62
5	Materials and Methods	66
	5.1 Synthesis of peptomers	66
	5.1.1 Preparation of Bromo-acetic acid-2,4-dinitrophenylester	66
	5.1.2 Preparation of peptomers on a membrane	67
	5.1.2.1 Preparation of cellulose membrane	67
	5.1.2.2 Defining the spots	68
	5.1.2.3 Spotting of peptomers	69
	5.1.2.4 Incubation of membrane with GST-EVH1	72

5.1.3	Peptomer synthesis in milligram amounts	72
5.2	Expression of recombinant, isotope labelled proteins	74
5.2.1	Media and Chromatography	75
5.2.2	Expression of the human VASP EVH2 domain	76
5.2.3	Preparation of uniformly ^2H , ^{15}N -labelled EVH1	77
5.3	Further Methods	79
5.3.1	CD Spectroscopy	79
5.3.2	NMR spectroscopy of the human Spred2 EVH1 domain	79
5.3.3	CYANA structure calculations	80
5.3.4	Biacore measurements	81
5.3.5	VASP EVH2 NMR spectroscopy and structure calculations	82
5.3.6	Analytical ultracentrifugation	84
6	Appendix	85
6.1	Human VASP EVH1 domain	86
6.1.1	NH resonance assignment	86
6.2	Human VASP EVH2 domain	87
6.2.1	Resonance assignment	87
6.2.2	Dihedral angle restraints	88
6.2.3	H-Bond restraints	89
6.2.4	Residual Dipolar Couplings	90
6.3	Human Spred2 EVH1 domain	91
6.3.1	Resonance assignment	91
6.3.2	Dihedral angle restraints	94
6.3.3	H-Bond restraints	95
	Zusammenfassung und Ausblick	96
	Summary and outlook	98
	Publications	100
	References	102