

Biochemische Charakterisierung des Immunzellproteins ADAP

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

eingereicht im Fachbereich
Biologie, Chemie, Pharmazie
FREIE UNIVERSITÄT BERLIN

vorgelegt von
Diplom-Biochemiker
Marc Sylvester
aus Wuppertal

Oktober 2008

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Priv.-Doz. Dr. Christian Freund am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin im Zeitraum von Juli 2003 bis Oktober 2008 angefertigt.

2. Gutachterin: Prof. Dr. Petra Knaus, Freie Universität Berlin, Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie, Institut für Chemie – Biochemie.

Disputation am 12. Januar 2009

Gewidmet meiner Mutter und Ingrid.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Angeborenes Immunsystem	1
1.1.2	Adaptives Immunsystem	2
1.1.3	T-Zellen	4
1.1.4	T-Zellaktivierung	6
1.1.5	Integrine	11
1.2	ADAP	17
1.2.1	Biochemische Eigenschaften von ADAP	18
1.2.2	Protein-Bindungspartner in T-Lymphozyten	24
1.2.3	ADAP in der Hämatopoese	33
1.2.4	Weitere biologische Funktionen	34
1.2.5	ADAP in anderen Zelltypen	35
1.2.6	ADAP-Homolog PRAM-1	39
1.3	Zielsetzung dieser Arbeit	41
2	Material und Methoden	43
2.1	Materialien	43
2.1.1	Allgemeine Chemikalien	43
2.1.2	Enzyme	43
2.1.3	Vektoren	45
2.1.4	Oligonukleotide und DNA-Sequenzierungen	46
2.1.5	DNA-Konstrukte	46
2.1.6	Bakterienstämme	53
2.1.7	Antikörper	54
2.1.8	Geräte	56
2.2	Methoden	59
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	59
2.2.2	Präparation und Analyse von Proteinen	64
2.2.3	Methoden zur Untersuchung von Proteinfunktionen <i>in vitro</i>	78
2.2.4	NMR	81

Inhaltsverzeichnis

2.2.5	Zellkulturmethoden	81
3	Ergebnisse	87
3.1	Phosphorylierung	87
3.1.1	<i>In vitro</i> -Phosphorylierungssystem	87
3.1.2	Strukturelle Änderungen in phospho-hSH3 ^C	94
3.1.3	Massenspektrometrische Phosphorylierungsana- lyse	100
3.1.4	<i>In vitro</i> -Kinetik	108
3.2	Lipidbindung	121
3.2.1	Einfluss von Lipiden auf die Phosphorylierung	122
3.2.2	Einfluss der Redox-Bedingungen auf die Lipid- bindung	124
3.2.3	Lipidbindung mit steigenden PIP ₂ -Konzentrationen	125
3.2.4	Selektivität der hSH3 ^N -Bindung an verschiedene Lipidspezies	128
3.3	Weitere Bindungsstudien	132
3.3.1	hSH3 ^N -Interaktionspartner	132
3.3.2	Carma1-Bindung	136
3.3.3	SKAP55-Kompetition mit hSH3 ^C	141
3.4	Funktionale Studien	142
3.4.1	Nukleäre Lokalisation	142
4	Diskussion	145
4.1	Phosphorylierung	145
4.1.1	Kinase-Aktivität	145
4.1.2	Aufreinigung von zellulärem ADAP	146
4.1.3	Charakterisierung der Bindung an Fyn-SH2	147
4.1.4	Phosphorylierung der Domänen	148
4.1.5	Identifizierung von Phosphorylierungsstellen au- ßerhalb der Domänen	154
4.1.6	Weitere Analysen der ADAP-Phosphorylierung	156
4.1.7	Dephosphorylierung von ADAP	157
4.1.8	<i>In vitro</i> -Phosphorylierungskinetik	158
4.2	Lipidbindung	163
4.2.1	Lipidbindung und Phosphorylierung	163
4.2.2	hSH3 ^N -Bindung unter reduzierenden und oxidie- renden Bedingungen	164
4.2.3	Einfluss der Lipidspezies auf die hSH3 ^N -Bindung	165
4.2.4	Kooperativität der PI(4,5)P ₂ -Bindung	167

4.3	Weitere ADAP-Interaktionen	168
4.3.1	hSH3 ^N -Interaktionspartner	168
4.3.2	Carma1-Bindung	170
4.3.3	SKAP55-ADAP-Bindung	174
4.4	Kernlokalisierung	175
	Abkürzungsverzeichnis	179
	Zusammenfassung	183
	Abstract	185
	Literaturverzeichnis	186
	Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit	205
	Danksagung	207

Tabellenverzeichnis

2.1	Eigene DNA-Konstrukte	51
2.2	Fremdkonstrukte	52
2.3	Antikörper	55
2.4	Verwendete Geräte	57
3.1	Mögliche posttranslationale Modifikationen laut MS- Analyse	103
3.2	Identifizierte ADAP-Phosphorylierungsstellen	106
3.3	Phosphorylierungszustände von Fyn	114
3.4	Übersicht der eingesetzten Lipide	129
3.5	ADAP-Konstrukte zur Kernlokalisierung	143

Abbildungsverzeichnis

1.1	Supramolekulare Aktivierungscluster	7
1.2	Signalweiterleitung am T-Zellrezeptor	10
1.3	Integrinkonformationen	13
1.4	Inside-Out-Signalweg	16
1.5	ADAP-Primärstrukturskizze	19
1.6	Vergleich der ADAP-Domänen	31
1.7	NF κ B-Signalweg	32
3.1	Vorhersagewerte verschiedener Algorithmen für Tyrosinreste in ADAP	88
3.2	Fyn-Aktivitätskontrollen	89
3.3	ADAP-Phosphorylierung <i>in vitro</i>	90
3.4	Optimierung der ADAP-Phosphorylierung	93
3.5	Anreicherung von Phospho-ADAP	95
3.6	hSH3 ^C -HSQC vor und nach Phosphorylierung	98
3.7	Änderung der chemischen Verschiebungen nach Phosphorylierung	99
3.8	Lage der beeinflussten Aminosäurereste in der Tertiärstruktur von hSH3 ^C	101
3.9	Vorversuch zur Isolierung von zellulärem ADAP	104
3.10	Optimierte Isolierung von zellulärem ADAP	105
3.11	Bindung von phosphorylierten ADAP-Fragmenten an Fyn-SH2	107
3.12	Phosphorylierungsstellen in den Tertiärstrukturen von hSH3 ^N	108
3.13	Detektion der ADAP-Phosphorylierung	110
3.14	Kinetik der ADAP-Phosphorylierung	111
3.15	Linearisierung der Phosphorylierungssignale (20°C)	113
3.16	Linearisierung der Phosphorylierungssignale (16°C)	114
3.17	Vorbehandlung von Fyn mit Phosphatase oder Csk	116
3.18	Verlauf der Phosphorylierung nach Vorbehandlung von Fyn mit Csk	118
3.19	ATP-Verbrauchsassay	119

Abbildungsverzeichnis

3.20 Titration von Fyn-SH2 mit ADAP-Phosphopeptid	120
3.21 Bindung der Domänen an Lipidvesikel	123
3.22 Phosphorylierung in Gegenwart von Lipidvesikeln . . .	124
3.23 hSH3 ^N -Lipidbindung	126
3.24 hSH3 ^C -Bindung an PIP ₂ -enthaltende Vesikel	127
3.25 hSH3 ^N -Bindung an Lipide verschiedener Sättigung . . .	130
3.26 Kopfgruppenselektivität von hSH3 ^N	131
3.27 Struktureller Vergleich Wildtyp- und Cys ₂ -Ser ₂ -hSH3 ^N .	133
3.28 hSH3 ^N Affinitätschromatographie unter Redox- Bedingungen	135
3.29 HT014-Bindungsexperimente an hSH3 ^N	136
3.30 Carma- und ADAP-Konstrukte	138
3.31 Immundetektion von Carma und ADAP	139
3.32 Bindungsexperimente von Carma1 an GST-ADAP- Konstrukten	140
3.33 Bindung von ADAP an Carma-PDZ	141
3.34 SKAP55(288-300)-Einfluss auf die hSH3 ^C -Lipidbindung .	142
3.35 Mikroinjektion von GST-ADAP(NLS)-GFP-konstrukten .	144

1 Einleitung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht das Adapterprotein ADAP (*Adhesion and Degranulation promoting Adapter Protein*). Es wird hauptsächlich in T-Zellen und Zellen der myeloiden Reihe exprimiert. Bisher sind nur ADAP-Funktionen in Zellen des Immunsystems von Säugetieren beschrieben worden. Daher soll hier zunächst der Aufbau des Immunsystems dargestellt werden. Daraufhin wird der Signalweg beschrieben, an dem ADAP hauptsächlich beteiligt ist. Schließlich wird ADAP im Detail vorgestellt. Neben den biochemischen Eigenschaften soll insbesondere das Netzwerk der Protein-Protein-Bindungen erläutert werden, an denen ADAP teilnimmt.

1.1 Das Immunsystem

Tiere und Pflanzen sind einer permanenten Bedrohung durch pathogene Mikroorganismen und Viren ausgesetzt. Um dieser zu begegnen entwickelten Tiere ein Immunsystem, das zudem vorteilhafte Symbiosen zwischen Tier und Mikroorganismus zulässt. Es leistet somit eine Unterscheidung zwischen Fremd und Selbst sowie „bedrohlich“ und „vorteilhaft“. Bei Wirbeltieren unterscheidet das Immunsystem außerdem Mitglieder einer Art und ermöglicht somit die Identifizierung von Individuen. Um diese Leistungen zu erbringen, hat sich ein komplexes und dynamisches System entwickelt, das aus angeborener Immunität und erworbenen (adaptiven) Immunantworten besteht.

1.1.1 Angeborenes Immunsystem

Wirbeltiere können fremde Mikroorganismen identifizieren, indem sie deren wiederkehrende Merkmale mit Hilfe von spezialisierten Rezeptoren erkennen. Hierzu zählen unter anderem Toll-like-Rezeptoren (TLR), die zum Beispiel doppelsträngige RNA (TLR3), unmethylierte

1 Einleitung

Nukleotidsequenzen des Typs RRCpGYY^[1](TLR9), Lipopolysaccharide (TLR4) und N-terminales N-Formylmethionyl erkennen können. Makrophagen und Neutrophile sind spezialisierte Zellen, die über diese Rezeptoren verfügen. Sie werden als inflammatorische Zellen bezeichnet, da ihre Aktivität die typischen Entzündungssymptome nach einer Infektion auslöst. Sie migrieren chemotaktisch zu Bakterien und Parasiten und schütten dort Zytokine und Chemokine als Signale für weitere Zellen aus.

Die Zerstörung von Mikroorganismen findet über vier Mechanismen statt:

1. Oponisierung: Mit Hilfe des Komplementsystems wird auf verschiedenen Wegen eine proteolytische Kaskade aktiviert, die im Ergebnis eine Markierung der Zielzelle (Oponisierung) und deren Zerstörung durch Membranporenbildung nach sich zieht (Gros *et al.*, 2008). Hierbei führt die Markierung der Zielzelle zur Migration von Makrophagen und Neutrophilen zum Ort der Entzündung.
2. Phagozytose: Die rezeptorvermittelte Aufnahme von Bakterien stellt eine weitere Möglichkeit zu deren Vernichtung dar. Hierbei werden Bakterien über einen lysosomalen Weg abgebaut.
3. Respiratory Burst: Makrophagen können große Mengen reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* - ROS) produzieren, um phagozytierte Mikroorganismen zu zerstören (siehe auch 1.2.5.2).
4. Weitere bakterizide Substanzen wie Defensine (antimikrobielle Peptide) und Lysozym (Zellwand-auflösendes Enzym) können von Makrophagen durch Exozytose freigesetzt werden und somit Bakterien in der Umgebung schädigen.

1.1.2 Adaptives Immunsystem

Das angeborene Immunsystem reagiert zwar schnell auf ein breites Spektrum verschiedener Infektionen, „lernt“ in der Lebensspanne eines

^[1]Die DNA-Nomenklatur orientiert sich an den Empfehlungen der International Union of Biochemistry von 1984 (IUBC, 1985)

Individuums aber nicht mit neuen Erregern umzugehen oder bekämpfte Erreger wiederzuerkennen. Um diese Funktion zu erfüllen, hat sich bei Wirbeltieren ein weiteres System entwickelt, das eine flexible und bei erneuter Exposition auch schnelle und gründliche Reaktion auslöst. Diese adaptive Immunantwort steht dabei in enger Verbindung mit der angeborenen Immunität. Das adaptive Immunsystem besteht aus humoralen und zellulären Reaktionen. Humoral bedeutet dabei, dass lösliche Moleküle (Antikörper) produziert und ins Blut abgegeben werden, um dort eine Markierung und Inaktivierung von Erregern zu bewirken. Der zelluläre Teil kann zum einen eine regulierende Funktion haben (z.B. T-Helferzellen) oder selbst die Vernichtung von Pathogenen erreichen (z.B. zytotoxische T-Zellen).

1.1.2.1 Antigenpräsentation

Am Anfang der Immunantwort steht die Präsentation von Pathogenfragmenten auf der Zelloberfläche im Komplex mit MHC^[2]-Molekülen. Alle Zellen (mit Ausnahme von Erythrozyten) können durch Prozessierung von Proteinen zytosolischer Pathogene Peptide des Pathogens im Komplex mit MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche präsentieren. Spezialisierte antigenpräsentierende Zellen (APC) haben außerdem MHC-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche im Komplex mit Peptiden, die durch Prozessierung von Pathogenen aus intrazellulären Vesikeln stammen.

Dendritische Zellen, B-Lymphozyten und Makrophagen können die Funktion der Antigenpräsentation erfüllen. Eine hervorgehobene Rolle nehmen hierbei dendritische Zellen ein. Unreife dendritische Zellen (DC) erkennen Mikroorganismen im peripheren Gewebe mit Hilfe von TLRs. Durch die Ligation der TLRs mit den kognaten Strukturen der Bakterien werden die dendritischen Zellen aktiviert. Sie nehmen außerdem kontinuierlich umgebende Flüssigkeit mit eventuell vorhandenen Viren über Pinozytose auf. Aktivierte DC migrieren zu Lymphknoten, wo sie naive T-Lymphozyten aktivieren.

^[2]Major histocompatibility complex

1 Einleitung

1.1.2.2 Antikörper

Ein wichtiges Merkmal einer Immunantwort ist die Bildung von Antigen-spezifischen Antikörpern. Sie werden von Plasmazellen produziert, die aus B-Zellen hervorgehen. Durch genetische Kombinatorik können diese ähnlich wie T-Zellen ein großes Spektrum verschiedener Spezifitäten hervorbringen, wobei pro Zelle nur eine einzige Ausprägung von Oberflächen-Immunglobulin (B-Zellen) bzw. Antikörpern (Plasmazellen) hergestellt wird. Verschiedene Klassen von Antikörpern mit gleicher Spezifität werden von einer Zelle gebildet. Die Klassen sind funktional unter anderem spezialisiert auf Neutralisierung von Pathogenen (IgG1-4, IgA), Opsonisierung von Mikroorganismen (IgG1) oder Aktivierung des Komplementsystems (IgM, IgG3). Außerdem erreichen die Klassen unterschiedliche Kompartimente im Organismus. Mehrere Zytokine beeinflussen die Entscheidung, welche Klasse von Antikörpern gebildet wird (den *Class Switch*). Die B-Zelle verändert daraufhin die Expression der konstanten Region der schweren Kette der Antikörper, während die variablen Regionen unverändert exprimiert werden.

1.1.3 T-Zellen

Während B-Lymphozyten die entscheidende Komponente für den löslichen Teil des adaptiven Immunsystems darstellen (Antikörper), sind T-Lymphozyten die zentrale Komponente der zellulären Immunantwort. Ihre Rezeptoren erkennen Antigenpeptide nur, wenn diese auf einem MHC-Molekül präsentiert sind. Hierzu ist ein Zell-Zell-Kontakt erforderlich. Reife T-Lymphozyten präsentieren neben dem T-Zellrezeptor (TCR) entweder CD8 oder CD4. MHC-Klasse-I-Moleküle werden von CD8 erkannt, während CD4 MHC-Klasse-II-Moleküle bindet. Antigene zytosolischen Ursprungs können somit von extrazellulären und über Vesikel aufgenommene Pathogene unterschieden werden. Die beiden T-Zelltypen rufen verschiedene Antworten hervor. CD8-positive Zellen wenden in der Regel zytotoxische Mechanismen an, um z.B. eine Virus-infizierte Zelle abzutöten. CD4-positive Zellen aktivieren hingegen als „T-Helferzellen“ Effektorzellen wie Makrophagen (durch die Subpopulation T_H1 -Zellen) oder B-Lymphozyten (durch T_H2 -Zellen).

1.1.3.1 Leukozyten-Migration

Eine kritische Komponente des Immunsystems ist die Bewegung von Leukozyten aus dem Blut in periphere Organe. Sie folgen den inflammatorischen Signalen von Neutrophilen und Monozyten in entzündete Gewebe. Dieser Prozess der Chemotaxis wird durch Chemokine und Adhäsionsmoleküle vermittelt, die sich auf den Leukozyten und dem Gefäßendothel befinden. Die Migration in das Zielgewebe und von Lymphozyten in die Lymphknoten wird durch die koordinierte Abfolge verschiedener Einzelschritte erreicht. Die Migration in Lymphknoten findet an feinen Blutgefäßen, den endothelialen Venolen statt (Smith *et al.*, 2007). Im ersten Schritt wird in Gegenwart großer Scherkräfte im Blutstrom durch eine Selectin-Sialoglycoprotein-Wechselwirkung nur eine Verlangsamung des Leukozyten erreicht (Rolling). Die unterstützende Interaktion des Integrins LFA-1 (*leukocyte function-associated antigen-1*) mit dem interzellulären Adhäsionsmolekül ICAM^[3] kann daraufhin die Zell-Endothel-Bindung stabilisieren. Die Aktivierung der Integrine kann innerhalb von Millisekunden erfolgen (Neelamegham *et al.*, 1998). Zum Mechanismus der Aktivierung siehe 1.1.5.

Arretierte Leukozyten ändern ihre Morphologie (Polarisierung) und können dann zwischen Endothelzellen zum darunterliegenden Gewebe migrieren (Transmigration). Dies kann entweder transzellulär oder durch endotheliale Zellkontakte stattfinden. Letzteres erfordert die konzertierte Öffnung von endothelialen Zell-Zell-Kontakten, das Vorstoßen einer Seite des Leukozyten, das Nachziehen des hinteren Teils der Zelle und schließlich das Wiederverschließen des Endothels. Der Vorgang beinhaltet eine komplexe Signalprozessierung, an der unter anderem die $\alpha_4\beta_1$ -Integrine mit ihrem Regulator Paxillin, Src-Familien-Kinasen sowie Rac und seine Effektoren beteiligt sind. Außerdem können Chemokin-Signale eine richtungsgebende Rolle spielen. Im lymphatischen System kommen Lymphozyten dann in Kontakt mit löslichen und zellgebundenen Antigenen. Im Lymphknoten migrieren Lymphozyten entlang spezialisierter Trägerzellen in die T- bzw. B-Zellzone (Bajénoff *et al.*, 2006). Die Migration folgt dabei unterschiedlichen Chemokinen für B- und T-Zellen.

^[3]*Intercellular adhesion molecule*

1 Einleitung

1.1.4 T-Zellaktivierung

T-Lymphozyten eines Typs unterscheiden sich in der äußerst diversen Ausprägung ihrer Lymphozytenrezeptoren (TCRs). Jede Zelle trägt dabei nur eine Ausprägung dieses Rezeptors. Durch die kombinatorische Neuorganisation von Immunglobulinen mit verschiedenen genetischen Mechanismen ist die Zahl der unterschiedlichen Rezeptoren und dementsprechend der erkannten Liganden sehr groß (ca. $2,5 \cdot 10^7$; Arstila *et al.*, 1999).

Kommt es zur Begegnung einer APC, die ein Antigen präsentiert mit einem T-Lymphozyten, der einen passenden (kognaten) Rezeptor aufweist, kommt es zur Ausbildung einer stabilen Verbindung (immunologische Synapse, siehe unten) und der Aktivierung des Lymphozyten. Eine volle Aktivierung wird nur durch die Gruppierung (Clustering) von Lymphozytenrezeptoren ausgelöst.

Für eine volle Aktivierung, die auch weitere Immuneffekte auslöst, ist neben der Signalweiterleitung durch den TCR aber auch eine Kostimulation über CD28 notwendig. Dieser Rezeptor auf T-Zellseite erkennt CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) auf Seite der Antigen-präsentierenden Zelle (Vincenti & Luggen, 2007). Dies stellt eine Kontrollinstanz gegen unbeabsichtigte Aktivierung dar.

Eine der Folgen der T-Zellaktivierung ist die selektive Vermehrung des Lymphozyten mit dem kognaten Rezeptor. Dieser Prozess wird klonale Expansion genannt und ermöglicht die zielgenaue und quantitative Bewältigung der Infektion. Hierbei ist die autokrine IL-2-Schleife entscheidend. Das Zytokin wird von T_H1 - oder $CD8^+$ -T-Zellen als Proliferationssignal für sich selbst und benachbarte Zellen sekretiert. T_H2 -Zellen nutzen analog IL-4 als proliferatives Signal.

1.1.4.1 Immunologische Synapse

Nach der Kontaktaufnahme zwischen Lymphozyt und APC durch die Rezeptor-MHC-Interaktion findet eine Umverteilung vieler Moleküle statt, die an der Signalaufnahme und -Prozessierung im Lymphozyten beteiligt sind. Insbesondere bildet sich an der Kontaktfläche der Zellen eine stabile Verbindung aus, die als immunologische Synapse bezeichnet wird (Paul & Seder, 1994; Shaw & Dustin, 1997). Hierbei wird

eine Entmischung vieler zuvor homogen verteilter Proteine beobachtet (Monks *et al.*, 1998). Zunächst bildet sich ein Cluster von Adhäsionsmolekülen, anschließend wandern die TCR-MHC-Komplexe in das Zentrum der Kontaktfläche. LFA-1 und dessen Bindungspartner auf APC-Seite ICAM lokalisieren danach wieder nach außen, wo sie eine ringförmige Struktur bilden, In der Kontaktebene bildet sich somit schließlich ein zentraler Cluster von Molekülen wie TCR/CD3, PKC θ ^[4] und Fyn^[5], der von einem Gürtel weiterer Signal- und Adhäsionsmoleküle wie LFA-1, Talin und ADAP umgeben ist. Der innere Bereich wird *central supramolecular activation cluster* (cSMAC) genannt, der äußere *peripheral SMAC* (pSMAC). Eine schematische Darstellung findet sich in Abb. 1.1. Neben der Protein-Heterogenität in der Leukozytenmembran wird auch eine heterogene Verteilung von Membranlipiden beobachtet. Diese sogenannten *lipid rafts* sind Bereiche mit hohem Cholesterol, Glyco- und Sphingolipidgehalt. Die funktionellen Implikationen sind jedoch strittig. Ebenso ungeklärt sind der Mechanismus der Synapsenbildung und deren physiologische Bedeutung.

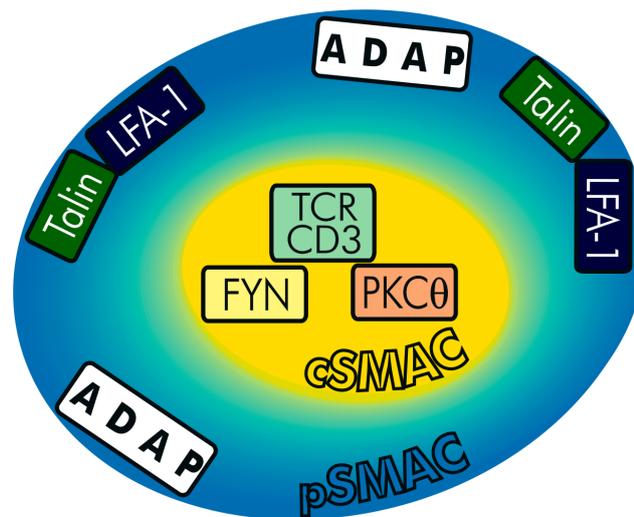


Abbildung 1.1: **Schema des SMAC eines T-Lymphozyten.** Schematische Aufsicht auf den T-Zell-Bereich einer Lymphozyt-APC-Kontaktfläche. Innen, gelb: zentraler Aktivierungscluster (cSMAC). Außen, blau: peripherer Cluster (pSMAC), mit Lokalisation ausgewählter Proteine. In Anlehnung an Monks *et al.*, 1998.

^[4]Protein kinase C

^[5]Fgr, Yes-related novel gene

1 Einleitung

1.1.4.2 Frühe T-Zell-Signalweiterleitung

Der primäre Aktivierungsschritt in der T-Lymphozytenaktivierung ist die Ligation des T-Zellrezeptors mit Antigen-beladenem MHC-Molekül. Die physiologischen Effekte wie Proliferation, Zytokin-Ausschüttung, Veränderung der Morphologie und Genexpression werden durch ein Zusammenspiel von Kinasen, Phosphatasen, Adaptern, kleinen GTP-bindenden Proteinen und anderen Enzymen verursacht. Aufgrund der starken Verflechtung der beteiligten Proteine, ist der Signalweg vom membranständigen Rezeptor zu den Zielvorgängen nicht linear, sondern durch eine Netzstruktur mit komplexen Abhängigkeiten geprägt. Hierdurch wird die unverzichtbare Kontrolle über die einzelnen Immunreaktionen aufrecht erhalten. Fehlerhafte oder überschießende Reaktionen die für den Organismus bedrohlich sein könnten werden somit minimiert. Bei Defekten dieser Kontrolle kommt es zu Autoimmunerkrankungen.

Der T-Zell-Rezeptorkomplex besteht aus vier Dimeren: Dem TCR-Heterodimer aus α - und β -Untereinheiten, den Heterodimeren $CD3\gamma\epsilon$ und $CD3\delta\epsilon$ sowie dem $CD3\zeta\zeta$ -Homodimer. Die TCR-Untereinheiten α und β sind für die spezifische Interaktion mit einem Antigen-beladenen MHC-Molekül verantwortlich. Die CD3-Untereinheiten γ , δ und ϵ haben nur sehr kurze zytoplasmatische Abschnitte. Bei den ζ -Ketten ist im Gegensatz dazu der Großteil des Proteins im Zytoplasma. Eine schematische Übersicht ausgewählter Komponenten des frühen Signalwegs ist in Abb. 1.2 dargestellt.

Der Rezeptorkomplex besitzt keine enzymatische Aktivität. Er ist für die Verstärkung des Signals im Zytoplasma daher angewiesen auf die Src-Familien-Kinase Lck^[6] (Cooper & Qian, 2008). Der genaue Mechanismus der Signalübertragung von der Interaktion mit MHC-Peptidkomplex zur Aktivierung von Lck ist noch unklar, involviert vermutlich aber die Bildung von TCR-Komplexen („Clustern“), den räumlichen Ausschluss von deaktivierenden Enzymen wie SHP-1 und Csk, sowie die Aktivierung von Lck durch die Phosphatase CD45.

Eine wichtige Rolle bei der vollen Aktivierung der intrazellulären Signalkaskaden spielen die Korezeptoren CD4 und CD8. Sie binden

^[6]*Lymphocyte specific protein tyrosine kinase*

MHC-Klasse-II- bzw. -Klasse-I-Moleküle. Die isolierte Bindung von CD4 an MHC-Klasse-II-Moleküle (in Abwesenheit des TCR-Komplexes) ist dabei überraschend schwach (Cammarota *et al.*, 1992). Lck bindet konstitutiv an den zytoplasmatischen Teil von CD4 oder CD8 (siehe 1.2.2.1 auf Seite 24). Durch die Lck-CD4/CD8-Bindung wird Lck zu den zytoplasmatischen Abschnitten des TCR rekrutiert, wenn dieser den MHC-Peptidkomplex bindet. Aktives Lck kann dann besondere Tandem-Tyrosinmotive der Art YxxL/IX₆₋₈YXXL/I phosphorylieren. Diese werden als ITAMs bezeichnet (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*). In den zytoplasmatischen Sequenzen von CD3 γ , δ , ϵ ist jeweils ein ITAM vorhanden. In den ζ -Ketten sind jeweils drei ITAMs enthalten.

Die phosphorylierten ITAMs sind Bindungsstellen für weitere Proteine wie ZAP-70^[7] (eine Syk-Familien-Kinase) und stellen Ausgangspunkte für Signalkomplexe dar. Lck phosphoryliert außerdem SLP-76 und ZAP-70 sowie Kinasen der Tec-Familie. Die Syk- und Tec-Familien-Kinasen werden daraufhin aktiv und können ihrerseits multiple Signalkaskaden anstoßen. Die Steigerung der Intensität der Tyrosinphosphorylierung gehört zu den ersten beobachtbaren Effekten nach TCR-Ligation. Sie findet vor der Ausbildung der supramolekularen Aktivierungscluster (SMACs) statt.

1.1.4.3 Adapterproteine

Signalproteine können enzymatischer oder nicht-enzymatischer Natur sein. Wichtige Enzyme im T-Zell-Signalweg sind Kinasen wie Lck, Fyn und PKC sowie Lipid-modifizierende Enzyme (zum Beispiel PLC γ). Beide Gruppen von Signalproteinen enthalten in der Regel Adapterdomänen, die Protein-Protein- oder Protein-Lipidbindung vermitteln können. Beispiele für wiederkehrende Module sind SH2-, SH3-, PDZ-, PH- und PTB-Domänen sowie prolinreiche Sequenzen und Phosphorylierungsmotive. Einige der Interaktionen sind regulierbar durch posttranslationale Modifikationen. Beispielsweise kann durch Tyrosinphosphorylierung eines Peptidmotivs eine selektive Interaktion mit bestimmten SH2-Domänen ermöglicht werden.

^[7]70 kDa ζ associated protein

Adapterproteine sind eine Gruppe von Signalproteinen ohne enzymatische Funktion. Sie vereinen typischerweise mehrere Bindungsfunktionen. Somit können Adapter Netzwerke von Protein-Interaktionen ausbilden. Durch die Veränderbarkeit der Bindungseigenschaften (zum Beispiel durch posttranslationale Modifikationen) sind diese Netzwerke dynamisch und ermöglichen die Selbstorganisation eines Signalwegs. Hierbei kann ein Adapter in mehreren Pools auftreten und dort unterschiedliche Funktionen wahrnehmen.

Adapter sind Substrate für die Kinasen der ersten Ebene und schaffen durch ihre vielfältigen Interaktionen Stabilität und Regulierbarkeit. Sie können mitunter Enzymen eine Plattform bieten und so die zeitliche und örtliche Organisation enzymatischer Funktionen erreichen. Adapter treten in Form von löslichen oder membrangebundenen Proteinen auf. Mitglieder beider Gruppen können während der Signalprozesse umverteilt werden. Einige zytoplasmatische Adapter wie ADAP können aus einer zytosolischen in eine membran-proximale Lokalisation wechseln. Transmembranadapter wie LAT (*Linker for activation of T-cells*) können lateral in spezialisierte Membranbereiche (Rafts) diffundieren (Zhang *et al.*, 1998). Bei LAT ist hierfür eine Bis-Palmitoylierung notwendig. Die Raft-Lokalisierung ist in diesem Fall aber nicht unbedingt für die Funktion erforderlich (Zhu *et al.*, 2005). Des Weiteren wird LAT auch in einem endosomalen Pool gefunden und kann nach TCR-Aktivierung an die Plasmamembran transportiert werden (Bonello *et al.*, 2004).

1.1.5 Integrine

Integrine bilden die wichtigste Klasse von Zelladhäsionsmolekülen im Immunsystem. 24 Heterodimere der α - und β -Untereinheiten sind bekannt. Sie haben neben ihrem großen extrazellulären Teil mit Immunglobulin-ähnlichen Domänen eine Transmembranregion und einen relativ kurzen zytoplasmatischen Teil. Strukturelle Untersuchungen für LFA-1 (Nishida *et al.*, 2006) zeigen drei Hauptkonformationen: Eine Form, bei der die äußere Hälfte des Dimers in Richtung Membran geknickt ist (**A** in Abb. 1.3), eine gestreckte, geschlossene Konformation, bei der die α - und β -Untereinheiten über die ganze Länge in Kontakt stehen (**B**) sowie eine gestreckte, offene Konformation, wobei die Untereinheiten bis auf die Kopfinteraktion separiert sind (**C**). Die Autoren der elektronenmi-

1 Einleitung

kroskopischen Studie bringen die beobachteten Konformationen mit einer niedrigen (A), mittleren (B) und hohen Ligandenaffinität (C) in Verbindung, wie sie für das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ demonstriert wurde (Takagi *et al.*, 2002).

Der Übergang von der geknickten in die offenen Konformationen kann durch die physiologischen Liganden, entsprechende Antikörperfragmente oder Mg^{2+}/Mn^{2+} induziert werden. Diese divalenten Kationen sind in der α_{IIb} I-Domäne an der sogenannten MIDAS^[8] koordiniert (Shimaoka *et al.*, 2003). Diese befindet sich an der Bindungsfläche zwischen Integrin und ICAM-Domäne 1. Außerdem kann die Aktivierung vom zytoplasmatischen Teil induziert werden. Dies kann vermutlich durch die Bindung von Talin oder RAPL^[9] an eine der zytoplasmatischen Sequenzen bewirkt werden (siehe folgenden Abschnitt zum Inside-Out-Signaling). Hierbei wird angenommen, dass der intermediäre Affinitätszustand auftreten kann, wenn eine räumliche Nähe der zytoplasmatischen Sequenzen der Monomere vorliegt. Beim hochaffinen Zustand tritt vermutlich eine stärkere Separierung dieser terminalen Peptide auf, möglicherweise induziert durch Bindung des extrazellulären Liganden (Dustin *et al.*, 2004). Neben der Affinitätserhöhung können durch laterale Diffusion in der Membran und Verankerung am Zytoskelett Bereiche mit hoher Dichte von Integrindimeren entstehen. Dieses Clustering erhöht die Avidität der Integrine und wird zum Beispiel bei der T-Zellaktivierung beobachtet (van Kooyk *et al.*, 1999).

1.1.5.1 Inside-Out-Signaling

Die Modulation der Integrin-Aktivität ist auf mehreren Ebenen der T-Zellfunktion von Bedeutung. Insbesondere die Migration des Lymphozyten zwischen den Kompartimenten Blutstrom, Endothel und innerhalb des Lymphsystems sowie die Antigen-Erkennung benötigen eine Steuerung der Integrin-Adhäsion. Die intrazelluläre Aktivierung von Integrinen nach T-Zellrezeptor-Stimulation folgt einem Signalweg, der als *inside out signaling* bezeichnet wird. Damit wird er vom umgekehrten Weg, also von den Integrinen zu intrazellulären Effektoren abgegrenzt (siehe nächster Abschnitt).

^[8]*metal ion-dependent adhesion site*

^[9]*Regulator for cell adhesion and polarization enriched in lymphoid tissues* oder RASSF5

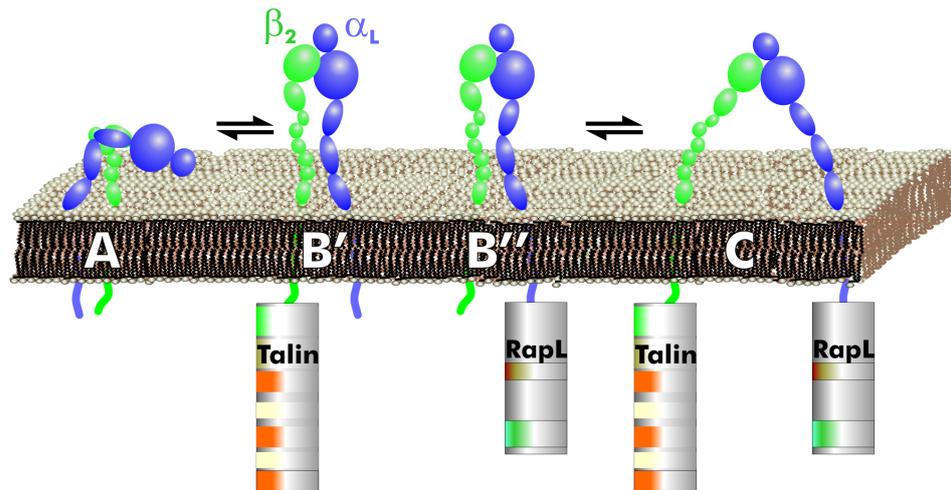


Abbildung 1.3: **Schema der Integrinkonformationen**, hier $\alpha_L\beta_2$ (LFA). **A** Inaktive Form mit niedriger ICAM-1-Affinität, **B'** geschlossene Form mittlerer Affinität, Talin gebunden an den zytosomatischen Teil von β_2 oder **B''** geschlossene Form mittlerer Affinität, RapL gebunden an den zytosomatischen Teil von α_L , **C** offene Form mit voller Affinität gebunden an Talin und RapL. Modell der Bindung in Anlehnung an Dustin *et al.* (2004).

Die Aktivierung von Integrinen wird innerhalb von Minuten nach TCR-Stimulation beobachtet (Dustin & Springer, 1989) und basiert nicht auf einer Erhöhung der Integrin-Expression oder der Präsentation an der Plasmamembran. Die frühen Aktivierungsschritte am TCR führen unter anderem zu einer Phosphorylierung von LAT, SLP-76, Fyn und ADAP sowie weiterer Signalkomponenten, die für die Integrin-Aktivierung wichtig sind. Hierdurch wird LAT zum Kern eines Komplexes, der unter anderem $\text{PLC}\gamma$, Gads^[10], SLP-76, Vav und die Tec-Familien-Kinase Itk^[11] beinhaltet. Im Gegensatz zu den meisten anderen Transmembranproteinen ist LAT nach TCR-Stimulation in Lipid-Rafts zu finden (Zhang *et al.*, 1998). Abb. 1.4 fasst die vermutete Sequenz des Inside-out-Signalwegs zusammen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur eine Auswahl von Komponenten gezeigt.

Für das Inside-out-Signaling ist die Bindung zwischen SLP-76, ADAP

^[10]Growth factor receptor-bound protein 2-related adaptor downstream of Shc oder GRAP2/Mona

^[11]IL2-inducible T-cell specific kinase

1 Einleitung

und SKAP55 entscheidend. SLP-76 findet sich durch die Gads-LAT-Bindung an der Plasmamembran nach Aktivierung (Boerth *et al.*, 2000b). ADAP bindet SLP-76 und rekrutiert SKAP55. Hierbei ist bemerkenswert, dass ADAP-LAT (transmembran)- und SKAP55-LAT-Chimären eine starke konstitutive Integrin-Aktivierung hervorrufen (Kliche *et al.*, 2006). Interessanterweise ist die Aktivierung am stärksten bei Proteinkonstrukten, die nicht Raft-lokalisiert sind (LAT-Cysteinmutanten). Hierdurch wird die besondere Bedeutung der ADAP- (und SKAP55-) Membranlokalisation für den Signalweg deutlich.

SKAP55 bildet eine Verknüpfung zu zwei weiteren Proteinen, die als Integrin-Regulatoren identifiziert wurden: Rap1 und RIAM (*Ras related protein* bzw. *RAP1 interacting adapter molecule*, Kliche *et al.*, 2006). Rap1 ist ein kleines G-Protein aus der Familie der Ras-Proteine. RIAM ist ein Adapter, der eine RA- und eine PH-Domäne sowie prolinreiche Sequenzen besitzt. Die Domänen scheinen dabei als Einheit zu funktionieren, z.B. bei der Rekrutierung von Rap1 (Lafuente *et al.*, 2004). Auch RIAM bildet wie ADAP durch seine Bindung von Profilin und Ena/VASP eine potenzielle Verbindung zum Aktinzytoskelett. Die RIAM-SKAP55-Bindung ist konstitutiv (Menasche *et al.*, 2007).

Zwei weitere Proteine sind als Rap-Effektoren bekannt und spielen für die Integrinaktivierung eine Rolle: Medeiros *et al.* (2005) zeigten, dass PKD1^[12] die Membranlokalisierung und Aktivierung von Rap1 reguliert. PKD wird von PKC phosphoryliert und beide interagieren mit Diacylglycerol (DAG)/Phorbolestern. Ohne PKD können Phorbolester die Integrinaktivierung nicht auslösen, was im Hinblick auf die C1-Domäne (DAG-Bindung) in CalDAG von Bedeutung ist. Eine direkte Interaktion mit Integrinen wurde von Medeiros *et al.* (2005) beschrieben. PKD reguliert die Membranlokalisierung von Rap1 über die Bindung an die PKD-PH-Domäne.

Auch RAPL stellt eine Verknüpfung zwischen Integrinen und Rap1 dar. Die genaue Interaktion mit Integrinen ist auch hier unklar, aber eine Bindung an α -Untereinheiten wird postuliert, da eine LFA-1-Aktivierung über Rap1 auch nach Entfernung der zytoplasmatischen Reste der β_2 , aber nicht der α -Kette möglich ist (Tohyama *et al.*, 2003). Außerdem wird eine Rolle in der möglichen Relokalisierung von vorgeformten

^[12]Proteinkinase D, auch PKC μ

Rap1-Effektoren-Integrin-Komplexen in Endosomen zur Plasmamembran diskutiert (Dustin *et al.*, 2004). Die Aktivierung von Rap1 kann dann wahrscheinlich durch die GEFs CalDAG und C3G bewirkt werden (Reedquist *et al.*, 2000). Inside-out-Signale konvergieren bei der direkten Interaktion des Integrin-Modulators Talin mit β -Untereinheiten von Integrinen (Tadokoro *et al.*, 2003).

Die Komplexität der Vorgänge erschwert eine vollständige Betrachtung aller Komponenten. Einige Proteine wurden daher in Abb. 1.4 ausgelassen. Hiervon sind unter anderem von Bedeutung: Itk als PLC γ -Aktivator und die Zytoskelett-Modulatoren Vav1, Nck^[13] und VASP. Außerdem ist die Darstellung aller Signalproteine an der Plasmamembran eine Vereinfachung. Es liegen Hinweise auf eine kompliziertere räumliche und zeitliche Organisation des Inside-Out-Signalwegs vor. Möglicherweise existieren vorgeformte Komplexe von Signalmolekülen in zytoplasmatischen Vesikeln, die nach Immunrezeptor-Stimulation an die Plasmamembran gelangen und dort aktiviert werden (Bivona *et al.*, 2004; Pizon *et al.*, 1994).

1.1.5.2 Outside-In-Signaling

Integrine sind nicht nur intrazellulär regulierte Adhäsionsmoleküle, sondern auch eigenständige Rezeptoren. Treten sie in Wechselwirkung mit ihrem extrazellulären Bindungspartner (z.B. LFA-1 mit ICAM-1), wird eine Weiterleitung des äußeren Signals über die zytoplasmatische Region an intrazelluläre Bindungspartner möglich. Physiologische Effekte sind zum Beispiel die Veränderung des Zytoskeletts und die Modulation von Migration, Proliferation und Zytokin-Ausschüttung. Die von ihnen ausgelösten Signalkaskaden werden als *outside-in-signaling* bezeichnet. Dabei überlappen sich überraschenderweise viele Komponenten der eingehenden und ausgehenden Signalwege. Insbesondere die Zelltyp-spezifischen Src- und Syk-Kinasen, Adapter wie SLP-76, sowie Vav1 und PLC γ sind in beiden Signalwegen von Bedeutung (Jakus *et al.*, 2007). Die genaue Funktion eines Proteins kann sich aber durchaus zwischen Inside-Out- und Outside-In-Signalweg unterscheiden, wie Abtahian *et al.* (2006) für SLP-76 gezeigt haben. Sogar

^[13]Non catalytic region of tyrosine kinase

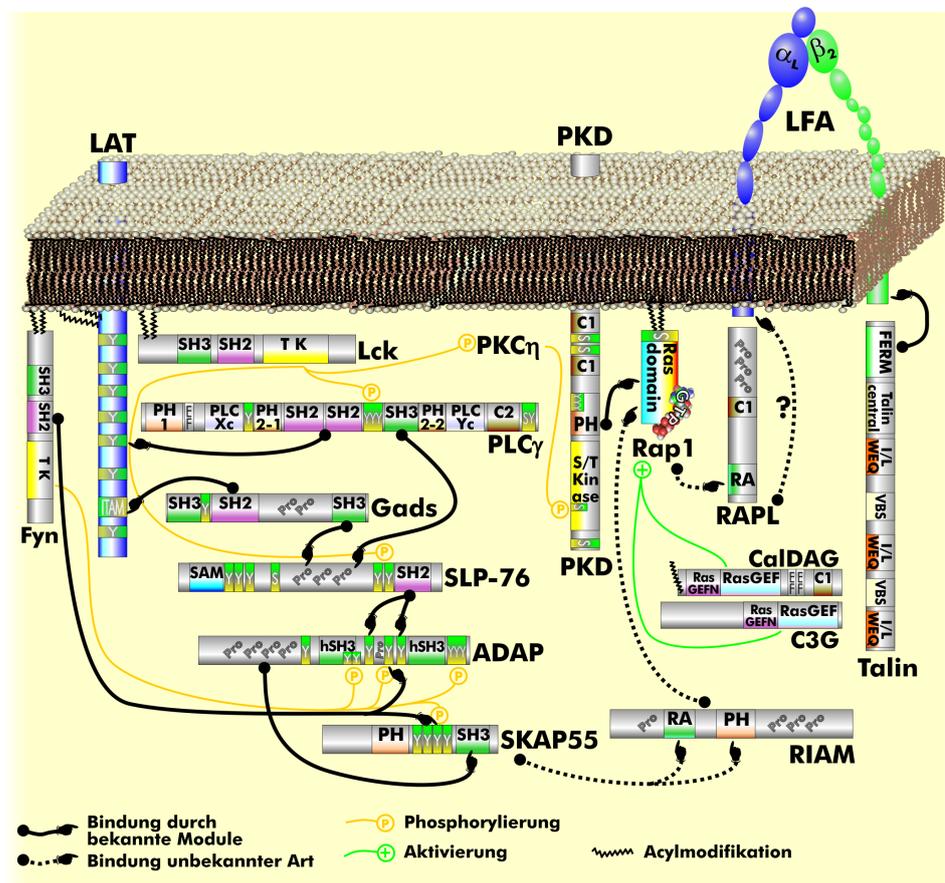


Abbildung 1.4: Schema der Inside-Out-Signalkaskade. Beteiligte Proteine mit Domänenstruktur und wichtigen funktionellen Motiven. „S“:Serinphosphorylierungsstelle, „Y“: Tyrosinphosphorylierungsstelle, „Pro“: prolinreiche Sequenzen, weitere Symbolerklärungen siehe Legende.

ITAM-enhaltende Rezeptoren werden vom Outside-In-Signalweg je nach Zelltyp genutzt (zum Beispiel FcR γ in NK-Zellen). Die komplexen Abhängigkeiten zwischen den beiden Signalrichtungen sind noch nicht geklärt.

Eine mögliche Rolle von ADAP im Outside-In-Signaling wurde von Suzuki *et al.* (2007) beschrieben. Grundlage hierfür war die Beobachtung einer „Actin-Wolke“ in einigen T-Lymphozyten nach LFA-1-Stimulation, sofern die Zellen ADAP und SLP-76 exprimierten. Tyrosinphosphoryliertes ADAP kopräzipitierte mit LFA-1 nach Aktivierung mit anti-LFA-1-Antikörper. Ob die beschriebene Verminderung der TCR-Signalschwelle in Gegenwart der Actin-Wolke eine physiologische Bedeutung hat, ist noch nicht hinreichend demonstriert. Befunde, die in dieselbe Richtung deuten, wurden von Mueller *et al.* (2007) publiziert (siehe 1.2.4, S. 34, Befunde aus weiteren Zelltypen siehe 1.2.5, S. 35).

1.2 ADAP

Das ADAP (*Adhesion and Degranulation promoting Adapter Protein*)-Gen, wurde nahezu parallel als *SLP-76-associated phosphoprotein of 130 kDa* (SLAP-130, Musci *et al.*, 1997) und *Fyn binding protein* (Fyb, da Silva *et al.*, 1997b) aus cDNA-Bibliotheken isoliert. Die Beschreibung des Fyn-bindenden Proteins als Tyrosinkinase substrat wurde bereits 1992 und 1993 von da Silva *et al.* publiziert. Es wird in Blutzellen gefunden, mit der Ausnahme von B-Lymphozyten und Erythrozyten. Dementsprechend findet sich ADAP-mRNA in Milz und Thymus. ADAP wird auch in Jurkat- und anderen leukämischen T-Zelllinien exprimiert.

Zu den phylogenetisch entferntesten Arten, die ein Proteinfragment mit Homologie zum menschlichen ADAP produzieren (identifiziert durch BLAST-Suche, s. Tab. 2.1.8.1), zählen Seeigel (*Strongylocentrotus purpuratus*), obwohl diese noch kein adaptives Immunsystem besitzen. Der bis jetzt sequenzierte Bereich beim Seeigel entspricht in etwa der hSH3^N-Domäne. Bereits das Haushuhn exprimiert jedoch ein homologes Protein mit großer Sequenzähnlichkeit und zwischen Säugetierarten ist die Sequenzübereinstimmung recht groß. Zwischen murinem und menschlichem Protein sind zum Beispiel 15 von 16 Tyrosinmotiven und alle weiteren bekannten funktionalen Eigenschaften identisch.

1.2.1 Biochemische Eigenschaften von ADAP

1.2.1.1 Primärstruktur

ADAP tritt in zwei Spleißvarianten auf. Die kürzere hat eine Länge von 783 (Accession NP_955367), die längere 819 Aminosäuren (NP_001456). Die längere Isoform wurde zuerst von Veale *et al.* (1999) beschrieben, der Sequenzunterschied resultiert aus einer Insertion eines 46-Aminosäuren-kodierenden Introns (in der Proteinsequenz nach Gly⁶³⁶). Die Expression der Spleißvarianten in verschiedenen Organismen, Geweben und Differenzierungsstadien der Zelle ist noch nicht hinreichend geklärt. In Jurkat-Zellen herrscht die kurze Form vor, in myeloiden Zellen die lange Form. Eine Funktion für die Insertion wurde bisher nicht demonstriert, jedoch sind Homologien zu verschiedenen Kernproteinen vorhanden (Veale *et al.*, 1999). Im Folgenden werden die Eigenschaften des menschlichen ADAP-Proteins mit 783 Aminosäuren beschrieben.

Abb. 1.5 zeigt einen schematischen Überblick der Primärstruktur mit den funktionellen Bereichen. Die Primärstruktur lässt sich in eine N-terminale und eine C-terminale Hälfte (ab As. 460) unterteilen. Die N-terminale Hälfte enthält keine bekannten Domänen und laut Vorhersagealgorithmen (PSIPRED, siehe 2.1.8.1, S. 58) sind mögliche Sekundärstrukturbereiche voneinander isoliert. Zwei Tyrosine sind in dieser Hälfte enthalten, über deren Phosphorylierung jedoch nichts bekannt ist. Auffällig ist die Häufung von prolinreichen Sequenzen mit bis zu fünf aufeinanderfolgenden Prolinresten. Darunter sind Motive, die für eine Bindung an verschiedene SH3-Domänen in Frage kommen (Scansite 2.0-Vorhersagen): Grb2^[14] um Pro⁶², Cbl-c^[15] an Pro¹³³, Itk an Pro²³⁷ und Pro³⁵⁷ sowie Src- und Crk^[16]-SH3 an Pro⁴¹⁷. Keine dieser vorhergesagten Interaktionen ist jedoch experimentell bestätigt. Homologe Proteine zu Cbl-c und Crk (Cbl-b bzw. Crkl) sind jedoch bereits in Komplexen mit ADAP gefunden worden (1.2.2.6, S. 30). Die nachgewiesene Interaktion mit SKAP55 beruht auf dem ADAP-Motiv um

^[14]*Growth factor receptor-bound protein 2*

^[15]*Signal transduction protein Casitas B-lineage lymphoma-c*

^[16]*Chicken retrovirus kinase*

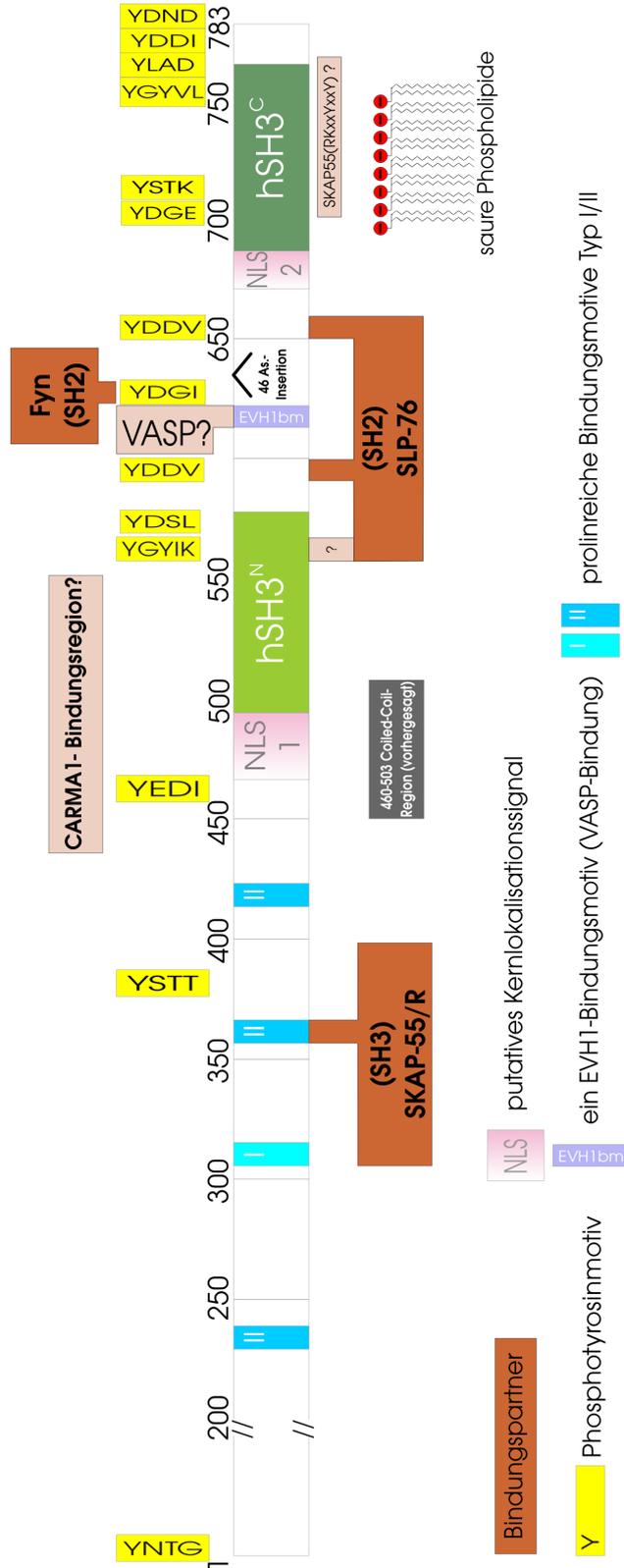


Abbildung 1.5: **Primärstrukturskizze von ADAP.** Mit Bindungspartnern und wichtigen Sequenzmerkmalen.

1 Einleitung

Pro³⁵⁷ (siehe 1.2.2.3). Im C-terminalen Teil findet sich ebenfalls ein funktionales Prolinmotiv bei As. 615-624: Über dieses EVH1-Bindungsmotiv kann z.B. VASP rekrutiert werden (siehe 1.2.2.4, S. 29).

Bereiche vor und in den Domänen sind sehr stark geladen (Anteil von Arginin, Lysin und Glutamat entspricht 80% im Abschnitt 469-507, ähnlich für 675-700), mit einem Überschuss an positiven Ladungen. Der isoelektrische Punkt des Gesamtproteins liegt bei 6,1.

NLS Die Bereiche 469-505 sowie 674-700 (nach da Silva *et al.*, 1997b) werden als zweiteilige nukleäre Lokalisationssequenzen vorhergesagt (Wolf PSORT, Horton *et al.*, 2007). Aufgrund der Tertiärstrukturen in diesen Bereichen werden die möglichen Sequenzen wohl As. 469-496 bzw. 674-688 nicht überschreiten. Die Funktion dieser Signale im physiologischen Umfeld ist jedoch nicht bestätigt. Raab *et al.* (1999) untersuchten die Lokalisation von überexprimiertem ADAP mit Immunfluoreszenzmikroskopie in COS-Zellen. ADAP war dort hauptsächlich perinukleär kolokalisiert mit Fyn oder SLP-76, teilweise in Puncta. Die Färbung im Kern war deutlich geringer, aber nicht vollkommen abwesend. In Maus-T-Zell-Hybridomzellen (DC27.10) zeigte sich ebenfalls ein punktuell Muster ohne besondere Kernlokalisierung (Veale *et al.*, 1999). Auch nach Aktivierung wurde ADAP nicht hauptsächlich im Kern, sondern an der Plasmamembran und insbesondere an der Kontaktstelle zwischen T- und antigenpräsentierender Zelle gefunden (Krause *et al.*, 2000). Im Gegensatz zur Plasmamembranlokalisation nach T-Zellaktivierung, die reproduzierbar demonstriert werden kann, ist die Kernlokalisation weder ausgeschlossen noch bewiesen.

1.2.1.2 Die hSH3-Domänen

ADAP verfügt über zwei Domänen, deren dreidimensionale Struktur aufgeklärt wurde (Heuer *et al.*, 2004; Zimmermann *et al.*, 2007). Beide weisen starke Homologien zueinander auf und zeigen den grundsätzlichen Aufbau von SH3-Domänen. Anders als diese, sind die ADAP-Domänen aber durch eine Helix am N-Terminus erweitert. Daraus resultierte die Bezeichnung als *helically extended SH3*- oder hSH3-Domänen. Die α -Helix liegt dabei der β -Faltblatt-Kernstruktur auf und geht zahlreiche Wechselwirkungen mit ihr ein. Die strukturellen Merkmale sind

Abb. 1.6 (S. 31) zu entnehmen. Ein weiterer Unterschied zu üblichen SH3-Domänen ist ihre Unfähigkeit, prolinreiche Sequenzen zu binden. Zumindest konnten keine solchen Bindungspartner mit Phage-Display, immobilisierten Peptid-Arrays oder Yeast-Two-Hybrid-Methoden identifiziert werden. Ein Grund hierfür liegt im Fehlen des charakteristischen und hochkonservierten Tryptophanrests, der zu den wichtigen Aminosäureresten bei der Interaktion mit prolinreichen Peptiden gehört (Heuer *et al.*, 2004; Musacchio *et al.*, 1992).

hSH3^N Der N-terminalen hSH3-Domäne (hSH3^N) geht ein vorhergesagter Coiled-Coil-Bereich voraus (As. 460-497), der somit auch die NLS-artige Sequenz umfasst. Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur (Zimmermann *et al.*, 2007) liegt aber nur für ein Konstrukt von As. 486-579 vor, weitere Strukturelemente sind daher nicht bestätigt. Der definierte Bereich der NMR-Struktur erstreckt sich von As. 497 bis 573. Eine Besonderheit dieser Domäne ist das Vorliegen von zwei Konformeren, die in Abhängigkeit des umgebenden Redoxpotenzials ineinander übergehen. Der Wechsel zwischen reduzierter und oxidierte Struktur ist reversibel und wird durch die Bildung einer Disulfidbindung der benachbarten Cysteine 519 und 520 ausgelöst. Daraus resultiert zwar keine Änderung der allgemeinen Faltung, aber es sind deutliche Verschiebungen einzelner Strukturelemente zu beobachten. Einzelne Peptidrückgrat-Atome werden um bis zu 6 Å versetzt, siehe Abb. 3.12 B. Das Redoxpotential konnte durch NMR-Spektroskopie bestimmt werden und beträgt -228 mV bei pH=7,4 (Piotukh *et al.*, 2007, dort $E^0 = -201$ mV bei pH=7,0). Der Einfluss der Redox-Sensitivität auf die Funktion der Domäne oder Gesamtproteins und der Redox-Zustand in der zellulären Umgebung sind unklar. Im Kontext der Phosphatase-Regulierung wurde jedoch eine Bedeutung des Redox-Potentials für die Integrin-Adhäsion demonstriert (Kwon *et al.*, 2005). Hierbei wurde SHP-2^[17] als H₂O₂-sensitive Tyrosinphosphatase identifiziert, die wahrscheinlich ADAP dephosphorylieren kann. Eine Proteinbindungsfunktion ist bis jetzt für die isolierte Domäne nicht gezeigt worden. Bei der Carma1-Interaktion von ADAP ist möglicherweise ein Teil der

^[17]SH2 containing protein tyrosine phosphatase 2 oder Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11

1 Einleitung

Domäne beteiligt (siehe 1.2.2.5 aus Seite 29).

hSH3^C Die dreidimensionale Struktur der C-terminalen Domäne (hSH3^C, As. 683-765) ähnelt der hSH3^N-Domäne, insbesondere der oxidierten Variante (Heuer *et al.*, 2004). Auch für hSH3^C ist kein Proteinbindungspartner bekannt. Einen ersten Hinweis auf eine Funktion der Domäne wurde in Mastzellen gefunden (Geng *et al.*, 2001). Die Überexpression eines ADAP-Konstrukts, dem die As. 708-783 fehlten, konnte im Gegensatz zum Wildtyp-Protein die Hexosaminidase-Ausschüttung nach Stimulation nicht erhöhen (siehe 1.2.5.3, S. 38). Hingegen waren die Adhäsionseigenschaften in Abwesenheit des C-terminalen Teils unverändert. Dieselbe Beobachtung konnten auch Heuer *et al.* (2006) für die Adhäsion von Jurkat-T-Lymphozyten auf Fibronectin und ICAM1 machen. Bei dem dort eingesetzten Konstrukt (As. 1-682) wurde auch die C-terminale Helix von hSH3^C eliminiert. Eine Verminderung der Adhäsion gegenüber dem Wildtyp war nicht erkennbar. Auch die Überexpression eines GST-hSH3^C-Konstrukts änderte die Adhäsion nicht. Der Phänotyp in Mastzellen könnte allerdings auch durch einen ADAP-Abschnitt hervorgerufen werden, der C-terminal von der Domäne liegt. Insbesondere finden sich dort Tyrosinphosphorylierungsmotive, die noch nicht funktionell charakterisiert sind (mit der Ausnahme von *poY*⁷⁷¹, siehe 1.2.5.2, S. 37).

1.2.1.3 Phosphorylierung

Die einzigen bekannten posttranslationalen Modifizierungen von ADAP sind Tyrosinphosphorylierungen. Biochemische Untersuchungen führten zur Beschreibung der Phosphorylierungsstellen Tyr⁵⁹⁵ und Tyr⁶⁵¹ (Bindung der SLP-76-SH2-Domäne, Geng *et al.*, 1999; Raab *et al.*, 1999) sowie Tyr⁶²⁵ für die Fyn-SH2-Bindung (Raab *et al.*, 1999). Die Tyrosine 595 und 651 sind gleichzeitig notwendig für einen Großteil des Phosphotyrosinsignals nach Inkubation mit Fyn (Geng *et al.*, 1999). Die Phosphorylierung von Tyr⁵⁵⁹ und deren Bedeutung für die SLP-76-Bindung wurde nicht abschließend geklärt (Boerth *et al.*, 2000a, siehe 1.2.2.2). *In vitro*-Kinase-Assays mit immunpräzipitierten Src-Kinasen demonstrieren, dass Fyn die wichtigste der untersuchten Tyrosinkinase für die ADAP-Phosphorylierung ist. Des Weiteren konnten die Lymphozyten-

spezifische Kinase Lck und die T-Zell-spezifische Kinase ZAP-70 bei Koexpressionsstudien keine bedeutsame ADAP-Phosphorylierung hervorrufen (Raab *et al.*, 1999). In Fyn-defizienten Zellen wird nur eine geringe Tyrosinphosphorylierung von ADAP detektiert. Ob weitere Tyrosinkinasen ADAP als physiologisches Substrat erkennen, ist unklar. Über die Phosphorylierung von Serin-, Threonin- oder Histidinresten lagen zum Beginn dieser Arbeit keine Informationen vor. Zur Identifizierung von Serinphosphorylierungsstellen siehe 3.1.3.2 auf Seite 102. Die Kinetik der Tyrosinphosphorylierung bei Jurkat-T-Zellen mit Stimulation über CD3 zeigt einen schnellen Verlauf: Sehr geringe basale Phosphorylierung steigt innerhalb von zwei Minuten stark an, erreicht ein Maximum bei ca. fünf Minuten, um bereits nach ca. zehn Minuten wieder deutlich zurückzugehen. Vorläufige Ergebnisse von Raab *et al.* (1999) weisen bei Betrachtung des SLP-76-ADAP-Komplexes zusätzlich auf eine wesentlich langsamere Kinetik (Maximum bei sechs Stunden). Als eine mögliche ADAP-Phosphatase, wurde SHP-2 identifiziert (Kwon *et al.*, 2005), wobei diese Aktivität Redox-reguliert sein kann (siehe 1.2.1.2). Die Bindung an SLP-76 wird durch die SHP-2-Aktivität aufgelöst.

1.2.1.4 Lipidbindung

Die Häufung von positiv geladenen Seitenketten in den ADAP-Domänen, insbesondere im Bereich der Helices führte zu der Hypothese, dass die Domänen negativ geladene Kopfgruppen von Membranlipiden binden könnten. Dies konnte durch zahlreiche Versuche für hSH3^C bestätigt werden (Heuer *et al.*, 2005, 2006). Die Spezifität von hSH3^C für bestimmte Lipide ist gering. Alle getesteten Kopfgruppen mit negativer Nettoladung werden gebunden. Es besteht jedoch eine Tendenz zu einer stärkeren Bindung, wenn die Dichte der negativen Ladungen hoch ist, wie bei Phosphatidylinositolphosphaten (PIP). Diese spielen trotz ihrer relativ geringen Anteile an Membranen eine große Rolle als Signale. Charakteristische Dissoziationskonstanten für hSH3^C an Lipidvesikeln liegen je nach Lipidzusammensetzung im Bereich von 22 μM (PC:PS:PI(4,5)P₂=54:44:2) bis 160 μM (74:44:2). Diese Affinitäten sind mit denen der meisten PH-Domänen vergleichbar (DiNitto *et al.*, 2003). Wenngleich diese Affinitäten keine eigenständige Membr-

1 Einleitung

anlokalisierung erwarten lassen, könnte die hSH3^C-Domäne ADAP an der Membran orientieren und somit die Ausbildung der notwendigen Protein-Proteininteraktionen erleichtern.

Die Vielfalt und Häufigkeit von Lipidbindungsdomänen kann vermutlich die Organisation komplexer Abläufe wie die Signalweiterleitung am T-Zellrezeptor erleichtern. Sie kann eine räumliche Trennung von Komponenten bewirken (zytoplasmatisch, vesikelgebunden, plasmamembrangebunden innerhalb / außerhalb von Lipid-Rafts). Diese Lokalisierung kann schnell durch Modifikation von Lipiden oder ihrer Bindungsproteine reguliert werden. Daher ist eine Charakterisierung der Lipidbindungseigenschaften für alle Komponenten eines Signalwegs erstrebenswert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Lipidbindungsverhalten der ADAP-hSH3^N-Domäne näher untersucht.

1.2.2 Protein-Bindungspartner in T-Lymphozyten

1.2.2.1 Fyn

Die Src-Familien-Kinase Fyn wurde ursprünglich als Mitglied einer Familie von Proteinen identifiziert, die dem viralen Onkogen v-Src ähnlich sind (Kawakami *et al.*, 1986; Semba *et al.*, 1986). Von den neun Mitgliedern der Src-Kinasen-Familie werden vornehmlich zwei in T-Lymphozyten exprimiert: Lck und Fyn (Isoform 2). Src selbst ist in T-Zellen nur in geringen Mengen vorhanden (Palacios & Weiss, 2004). Fyn enthält wie die verwandten Kinasen eine N-terminale unikale Domäne, gefolgt von einer Src-Homologie-Domäne 3 (SH3), SH2, der Tyrosinkinase-Domäne (SH1) und einer C-terminalen Region, die für die intramolekulare Inhibition bedeutsam ist. Am N-Terminus sind verschiedene Kombinationen von Acylierungen sowie Methylierungen detektiert worden (Liang *et al.*, 2004), die für die Membranlokalisierung von Fyn notwendig und hinreichend sind (Wolven *et al.*, 1997). Für den Signalweg vom T-Zellrezeptor ist von Belang, dass die Lokalisation von Lck und Fyn nicht identisch ist. Während Lck vor allem an der Plasmamembran in Lipid-Rafts lokalisiert ist (Filipp *et al.*, 2003), findet sich Fyn auch in zytoplasmatischen Kompartimenten wie dem Zentrosom (Ley *et al.*, 1994). Ein Grund für diese differentielle Lokalisation ist die Fähigkeit von Lck, durch eine „Zink-Klammer“ an die

zytoplasmatischen Sequenzen von CD4 und CD8 zu binden (Kim *et al.*, 2003). Auch die Funktionen und Interaktionen der Kinasen unterscheiden sich (Sugie *et al.*, 2004; Zamoyska *et al.*, 2003). Eine Interaktion von ADAP mit Lck oder Phosphorylierung durch Lck wurde bisher nicht demonstriert. Interessanterweise ist Fyn auch für den potenziellen ADAP-Bindungspartner WASP (siehe 1.2.2.4, S. 29) von Bedeutung (Badour *et al.*, 2004; Suetsugu *et al.*, 2002).

Die Regulation der Src-Familien-Kinasen ist intensiv untersucht worden. Das Hauptelement der Regulation ist die intramolekulare Bindung der SH2-Bindung an ein C-terminales „regulatives“ Phosphotyrosinpeptid. Hierdurch wird die Kinasedomäne in einer geschlossenen Konformation gehalten, die katalytisch inaktiv ist. Wird die intramolekulare Bindung aufgehoben, zum Beispiel durch eine Dephosphorylierung des C-terminalen Tyrosins, können Substrate vermutlich durch das Zusammenspiel von SH3-, SH2- und Kinase- Domänen erkannt und anschließend phosphoryliert werden. Eine interessante Alternative zur Aktivierung durch Dephosphorylierung ist die Kompetition der intramolekularen Bindung mit einer Bindung in trans. Die regulatorischen Phosphopeptide am C-Terminus von Lck und Fyn haben eine Affinität zur intramolekularen SH2-Domäne, die ca. zehnmal geringer ist, als die für spezifische SH2-Bindungspeptide (Ladbury *et al.*, 1995, 1996). Für die CD2-Fyn-SH3-Bindung wurde gezeigt, dass zumindest die Aufhebung eines inhibierenden Einflusses der Fyn-SH2-Domäne auf die Bindungseigenschaften der Fyn-SH3-Domäne durch die Gegenwart spezifischer SH2-bindender Phosphopeptide möglich ist (Lin *et al.*, 1998). Die Autoren hatten eine Verminderung der Bindung von CD2 an Fyn-SH3 beobachtet, wenn Fyn-Konstrukte eingesetzt wurden, die neben der SH3- auch die SH2-Domäne beinhalten. In Gegenwart von Phosphopeptiden, die Fyn-SH2 binden, wurde diese Inhibition aufgehoben. Es ist nicht geklärt, ob hierdurch auch eine Aktivierung der Kinase eintritt.

Ein Beispiel für eine Fyn-SH3-vermittelte Aufhebung der Autoinhibition liefert das Adapterprotein SAP^[18]. Es besteht aus einer SH3-Domäne, die ein Phosphotyrosinmotiv in SLAM bindet und gleichzeitig ein Bindungspartner von Fyn-SH3 ist (Chan *et al.*, 2003). Die Bindung der

^[18][*Signaling lymphocytic activation molecule*]-associated protein

1 Einleitung

Fyn-SH3-Domäne verringert die Ausbildung der autoinhibitorischen Konformation und führt so zu einer teilweisen Aktivierung. Zur vollen Aktivierung ist eine Autophosphorylierung in der Kinasedomäne notwendig.

Wahrscheinlich überwiegt der inhibitorische Effekt der intramolekularen Fyn-SH2-Domänen-Bindung gegenüber der Aktivierung der Kinasedomäne. Die genaue Regulation der autoinhibitorischen Phosphorylierung von Fyn ist nicht im Detail geklärt (Palacios & Weiss, 2004). CD45 (auch PTPRC^[19] genannt) kann als Phosphatase für das C-terminale Tyrosinmotiv dienen (Biffen *et al.*, 1994), aber mit PTP α ist möglicherweise eine weitere Transmembranphosphatase involviert (Bhandari *et al.*, 1998). Die Kinase für die inhibitorische Phosphorylierung am C-Terminus ist Csk^[20] (Cheng *et al.*, 1991), die wohl durch den Transmembranadapter PAG^[21] zu Fyn rekrutiert wird (Brdicka *et al.*, 2000; Yasuda *et al.*, 2002).

1.2.2.2 SLP-76

SLP-76 ist ein wichtiger Adapter in verschiedenen Immunrezeptorsignalwegen von Leukozyten. Zusammen mit der Tec-Kinase Itk als Bindungspartner bewirkt SLP-76 die Aktivierung von PLC γ . Dies führt zur Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration, sowie der Aktivierung von Ras und PKC (Yablonski *et al.*, 1998). Über Gads kann SLP-76 an LAT binden und somit nach TCR-Stimulation zur Plasmamembran rekrutiert werden (Wu & Koretzky, 2004). Außerdem interagiert der Adapter Nck mit SLP-76, der wie Vav eine Verbindung zum Actin-Zytoskelett herstellt.

In Makrophagen wird zusätzlich das SLP-76-homologe Protein BLNK (*B cell linker*, auch SLP-65) exprimiert. Die Suche nach weiteren Bindungspartnern führte zur Identifizierung von ADAP (als SLP-76-assoziiertes Protein SLAP-130, Musci *et al.*, 1997). Für die Bindung ist die SH2-Domäne von SLP-76 verantwortlich. Im Vergleich hierzu wurde keine

^[19]*Protein tyrosine phosphatase receptor type C*

^[20]*c-Src kinase*

^[21]*Phosphoprotein associated with glycosphingolipid enriched microdomains*

Interaktion mit den SH2-Domänen von Grb2^[22], p85^[23], PTPN6^[24] und SHP-2 beobachtet. SHP-2 kann jedoch die ADAP-Dephosphorylierung und Auflösung des SLP-76-ADAP-Komplexes bewirken (Kwon *et al.*, 2005).

Über die Tyrosinmotive in ADAP, die nach Phosphorylierung mit der SLP-76-SH2-Domäne interagieren, liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. Zunächst wurde von Boerth *et al.* (2000a) durch Verkürzungskonstrukte der ADAP-Bereich auf As. 460 bis 595 eingegrenzt. Konkurrenzexperimente mit Phosphopeptiden deuteten auf poY^{559} als entscheidenden Rest für die Interaktion. Eine Y559F-Mutante konnte SLP-76 nicht mehr aus Jurkat-Lysaten präzipitieren. Hingegen konnten Raab *et al.* (1999) zeigen, dass Konstrukte, die bei As. 585 enden weder Fyn noch SLP-76 binden können, die Region nach As. 670 jedoch hierfür entbehrlich ist. Die Differenzierung der eingegrenzten drei Tyrosinmotive mit immobilisierten (Phospho-)Peptiden führte zur allgemein akzeptierten Ansicht, dass die ED $poY^{595/651}$ DDV-Motive für die SLP-76-Bindung notwendig und hinreichend sind (Geng *et al.*, 1999), während poY^{625} die Fyn-SH2-Bindung vermittelt. Der Beitrag der ADAP-SLP-76-Bindung zur Aktivierung der IL-2-Expression wird in 1.2.4 erläutert.

1.2.2.3 SKAP55

Das Adapterprotein SKAP55 (*src kinase associated phosphoprotein of 55 kDa*) wurde als Bindungspartner der Src-Familien-Kinasen Src, Lyn, Fyn und Lck identifiziert (Marie-Cardine *et al.*, 1997). Es ist unter anderem im Zytoplasma von T-Lymphozyten und in der Hypophyse zu finden. Im Gegensatz dazu wird das homologe Protein SKAP55-HOM (auch SKAP55-R genannt) ubiquitär exprimiert. SKAP55 enthält eine PH-Domäne, deren Funktion unbekannt ist, sowie Tyrosinphosphorylierungsstellen und eine SH3-Domäne (siehe Abb. 1.4, S. 16). Das Phosphorylierungsmotiv um Tyr²⁷¹ ist notwendig für die Interaktion mit Fyn (Wu *et al.*, 2002). Diese Interaktion tritt auch in nicht stimulierten Zellen auf. SKAP55 wird außerdem im Komplex mit Grb2 und CD45 gefunden. Möglicherweise ist SKAP55 auch ein Substrat für CD45.

^[22]*Growth factor receptor bound protein 2*

^[23]*Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit α*

^[24]*Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6*

1 Einleitung

Für die ADAP-SKAP55-Bindung (Liu *et al.*, 1998; Marie-Cardine *et al.*, 1998) ist die SH3-Domäne von SKAP55 notwendig. Die Punktmutation SKAP55(W333R) verhindert die Interaktion mit einer prolinreichen Sequenz in ADAP (Huang *et al.*, 2005) um Pro³⁶⁰ (Kliche *et al.*, 2006). In ADAP-defizienten Zellen werden keine bedeutenden Mengen SKAP55- und SKAP55-HOM-Protein nachgewiesen, obwohl die mRNA vorhanden ist (Huang *et al.*, 2005; Kliche *et al.*, 2006). SKAP55 wird von ADAP über die SKAP55-SH3-Bindung stabilisiert, das heißt der SKAP55-Abbau wird verhindert. Die ADAP-knock-out-Maus ist somit auch SKAP55-defizient (Huang *et al.*, 2005; Kliche *et al.*, 2006). Die Interaktion beider Proteine ist notwendig für das Inside-Out-Signaling. Der N-terminale Teil, die Tyrosinmotive und die PH-Domäne sind hingegen für diese Funktion entbehrlich. Eine weitere Phosphatase wurde im Komplex mit SKAP55 und ADAP gefunden: SHPS-1^[25] benötigt ebenfalls die SKAP55-SH3-Domäne für die Komplexbildung, interagiert jedoch auch mit der W333R-Mutante (Timms *et al.*, 1999).

Die Möglichkeit einer sekundären ADAP-SKAP55-Bindungsstelle wird kontrovers diskutiert. Das SKAP55-Peptid R²⁸⁹RKDYASY²⁹⁸ wurde als Bindungsmodul für die Interaktion mit ADAP(695-762) beschrieben (Kang *et al.*, 2000). Die Phosphorylierung von Tyr²⁹⁴ führt in Plasmonresonanz-Versuchen zur Aufhebung der Bindung des Peptids an ADAP(695-762), jedoch nicht zur Auflösung der ADAP-SKAP55-Bindung (Duke-Cohan *et al.*, 2006). Bei dem stabilen und strukturell charakterisierten ADAP-hSH3^C-Konstrukt (As. 683-769) konnte hingegen in NMR- und Phage-Display-Studien keine Interaktion mit dem beschriebenen SKAP55-Peptid gefunden werden (AG Freund, unveröffentlichte Daten). Erste Hinweise auf eine mögliche physiologische Bedeutung des betreffenden SKAP55-Peptids sind durch Duke-Cohan *et al.* (2006) gefunden worden. Die Autoren beobachteten einen dominant-negativen Effekt einer SKAP55-Y294F-Mutante auf die ICAM-1-Adhäsion und die IL-2-Produktion von Jurkat-Zellen nach TCR-Stimulation. Belegt ist die Identifizierung von RIAM als Bindungspartner. Sie ermöglichte eine funktionelle Einordnung von SKAP55 (Menasche *et al.*, 2007). Die Stellung von SKAP55 im Inside-Out-Signaling wurde bereits in 1.1.5.1 (S. 12) besprochen.

^[25]SHP substrate 1

1.2.2.4 Ena/VASP und WASP

Unmittelbar nach der Klonierung wurde ADAP durch Niebuhr *et al.* (1997) als Protein identifiziert, dass an die EVH1^[26]-Domäne von Mena^[27] bindet. Daher existiert auch der Name *EVH1 domain binding protein* für ADAP. VASP (*Vasodilator-stimulated phosphoprotein*) enthält wie Mena eine EVH1-Domäne, die prolinreiche Sequenzen des Typs (F/Y/L/W)P₄X₀₋₃(D/E) erkennt. ADAP enthält in den Sequenzen 616-621 und 637-645 ein solches Motiv. ADAP-Konstrukte, die diese Motive enthalten interagieren im Blot-Overlay-Assay mit VASP und Mena (Krause *et al.*, 2000). Zudem wurde auch WASP^[28] in einem Komplex mit ADAP und Nck gefunden. Diese Beobachtungen legen eine Funktion in der Regulation des Actin-Zytoskeletts nahe. Eine drastische Veränderung der allgemeinen Actinpolymerisierung ist in Zellen ADAP-defizienter Mäuse jedoch nicht erkennbar, näheres hierzu siehe 1.2.4 auf Seite 34.

1.2.2.5 Carma1

Die Veränderung der Genexpression ist ein wichtiger Effekt der Antigenstimulation von Lymphozyten. Eine Bedeutung des Proteins Carma1^[29] in diesem Arm des T-Zell-Signalwegs konnte in verschiedenen Versuchen demonstriert werden. Die Proliferation und Zytokin-Produktion nach TCR-Stimulation ist ohne funktionelles Carma1 gestört (Hara *et al.*, 2003), was auf einen Defekt in der Rekrutierung von IKK^[30] zurückzuführen ist (Hara *et al.*, 2004). Dessen Rekrutierung ist für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB^[31] notwendig. Eine Funktion für ADAP in diesem Signalweg wurde durch Medeiros *et al.* (2007) demonstriert. In ADAP-defizienten murinen T-Zellen ist die IκBα^[32]-Phosphorylierung und Degradation nach TCR-Stimulation herabgesetzt und folglich die NFκB-Translokation in den Kern vermindert. Die

^[26]*Ena/Vasp homology*

^[27]*Mammalian Enabled*

^[28]*Wiskott-Aldrich syndrome protein*

^[29]*Caspase recruitment domain-containing MAGUK [membrane-associated guanylate kinase] homolog 1*

^[30]*Inhibitor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase*

^[31]*Nuclear factor κB*

^[32]*NFκB-Inhibitor α*

1 Einleitung

Autoren machten hierfür eine Beeinträchtigung des Carma1-Malt1^[33]-Bcl10^[34]-Komplexes verantwortlich und zeigten, dass ADAP Teil dieses Komplexes ist. Die Interaktion von Carma1 und Bcl10 ist von deren Card-Domänen abhängig. Die beiden Proteine wurden von Gaide *et al.* (2002) nach Aktivierung außerdem im Komplex mit dem T-Zellrezeptor gefunden. PKC θ übt in diesem Kontext die Aktivierung der Phosphorylierung von Carma1 aus und ermöglicht somit die Aktivierung von IKK- γ , die wiederum die Degradation des NF κ B-Inhibitors I κ B α ^[35] auslöst. Einen schematischen Überblick zu diesem Aktivierungsweg ist in Abb. 1.7 zu finden.

In Abwesenheit von ADAP wird Carma1 weiterhin aktivierungsabhängig an die Membran lokalisiert, Bcl-10 und Malt1 werden dort aber ohne ADAP nicht detektiert (Medeiros *et al.*, 2007). Carma-defiziente Zellen produzieren kein IL-2, während ADAP-defiziente Zellen dies in vermindertem Umfang tun können. Eine Bindung zwischen ADAP und Malt1 oder Bcl10 wird nicht beobachtet. Carma1 wurde mit ADAP koimmunopräzipitiert, wobei der C-terminale Bereich von Carma1 für die Komplexbildung notwendig ist. Seitens ADAP wurde der Bereich As. 427-541 (murines Protein, entspricht der humanen Sequenz 439-553) als notwendig eingegrenzt, wobei Konstrukte, denen entweder der Teilbereich 427-481 oder 482-541 fehlte verminderte Bindung zeigten. Der humane Sequenzbereich As. 439-553 umfasst einen Bereich mit vorhergesagter Coiled-coil-Struktur, die putative NLS und die erste Hälfte der hSH3^N-Domäne. Die Carma1-ADAP-Bindung ist der erste Anhaltspunkt für eine Beteiligung der hSH3^N-Domäne an einer ADAP-Funktion. Die Unmittelbarkeit der Interaktion ist jedoch nur unzureichend demonstriert worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bindung zwischen ADAP und Carma1 daher näher untersucht.

1.2.2.6 Cbl

Eine Überexpression von ADAP erhöht die Migrationsrate von T-Zellen nach Stimulation mit dem Chemokin SDF-1 α (CXCL12, Hunter *et al.*, 2000). Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung,

^[33]*Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1*

^[34]*B-cell lymphoma/leukemia 10*

^[35]*Inhibitor of κ light chain gene enhancer in B cells α*

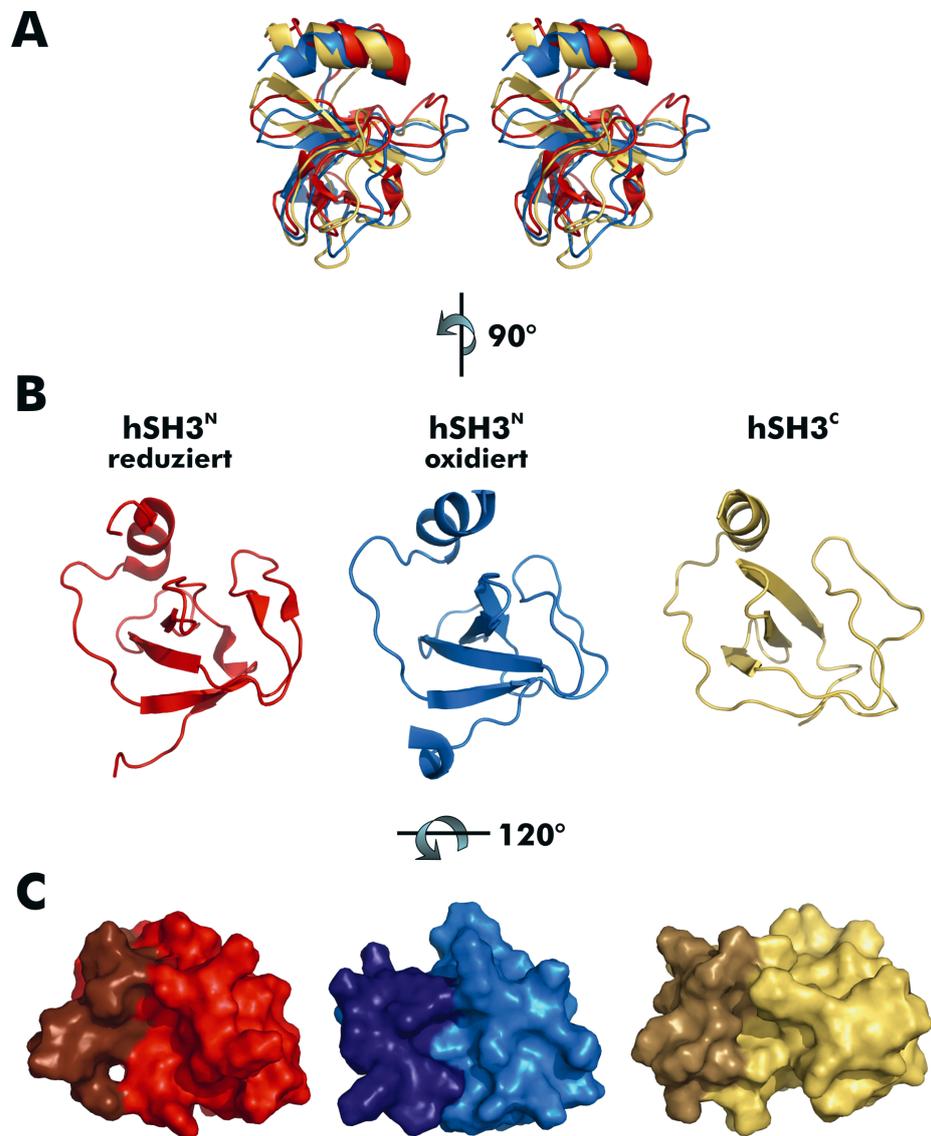


Abbildung 1.6: Vergleich der räumlichen Strukturen der ADAP-hSH3-Domänen. **A** Stereoprojektion. Überlagerung der Sekundärstrukturskizzen von hSH3^N im reduzierten Zustand (rot), im oxidierten Zustand (blau) und von hSH3^C (gold). **B** Die gleichen Skizzen wie in **A** einzeln, nach Drehung um 90° um die Y-Achse. **C** Oberflächenrepräsentation der Domänen. Zur besseren Sichtbarkeit der Helices wurden die Strukturen um 120° um die X-Achse gedreht und die Helix-Oberflächen dunkel schattiert.

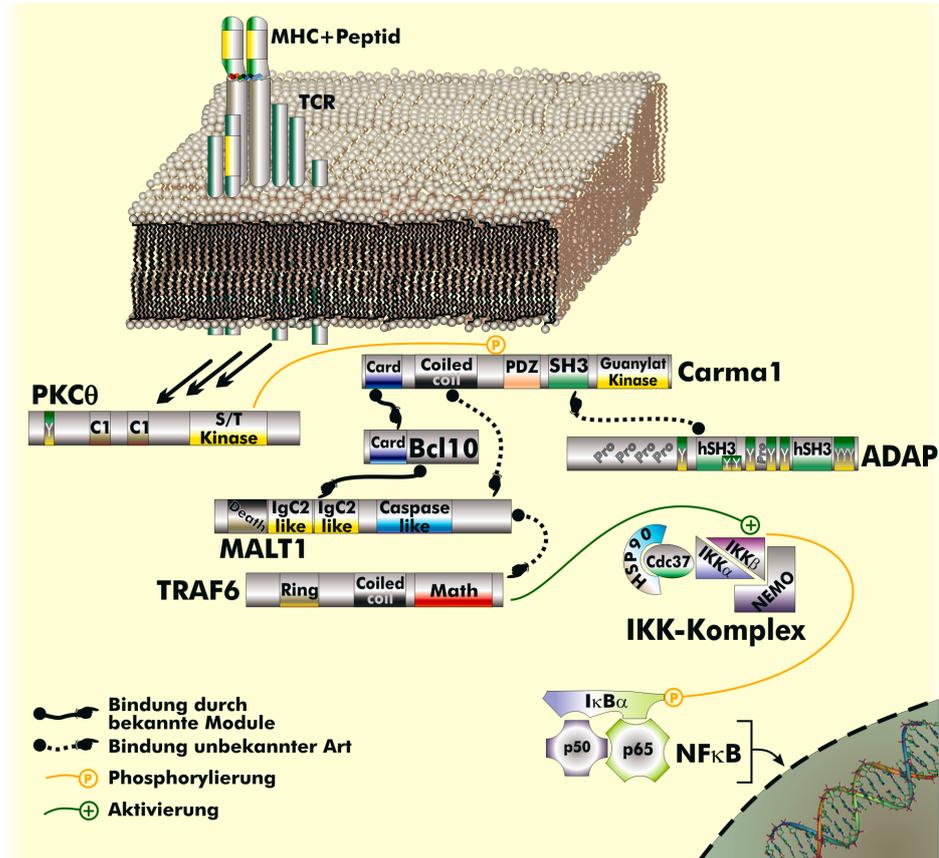


Abbildung 1.7: Schematische Übersicht zum NFκB-Signalweg in T-Lymphozyten. Ausgewählte Komponenten. Insbesondere wird die Aktivierung von PKCθ nach TCR-Ligation nicht im Detail gezeigt. DNA-Skizze bearbeitet nach Michael Ströck (2006), Wikipedia.

dass ADAP in einem Komplex mit Cbl und Cbl-b vorliegt (Okabe *et al.*, 2006). Cbl ist eine E3-Ubiquitin-Ligase, die Ubiquitin auf Substrate transferiert, um sie für die Degradation zu markieren (Duan *et al.*, 2004). Es zielt unter anderem auf hämatopoetische Rezeptoren und sorgt somit für das Abschalten von Signalen. Der ADAP-Cbl-Komplex wird SDF-stimulationsabhängig gebildet und enthält zumindest Nck, Fyn, PLC- γ , ZAP-70 und CRKL^[36]. Eine direkte Interaktion zwischen ADAP und Cbl ist bis jetzt jedoch nicht gezeigt worden. Eine genauere Einordnung von ADAP in dem SDF-1 α -Rezeptorsignalweg steht somit noch aus.

1.2.3 ADAP in der Hämatopoese

Die Charakterisierung von ADAP in murinen Lymphozytenpopulationen wurde von Dluzniewska *et al.* (2007) durchgeführt. Die ADAP-Expression halbiert sich demnach während der Lymphozytenreifung vom doppelt-negativen (CD4⁻CD8⁻) zum doppelt-positiven Stadium (CD4⁺CD8⁺). Danach findet eine Rückkehr zur ursprünglichen Expression im einfach-positiven CD4⁺ oder CD8⁺-Lymphozyten statt. Während der Selektion liegen somit geringe ADAP-Niveaus vor, was den Expressionsmustern der Bindungspartner Fyn und SLP-76 entspricht. Für optimale positive Selektion ist ADAP jedoch notwendig (Wu *et al.*, 2006). Abweichend von anderen Migrationsprozessen ist ADAP für die Migration von T-Zellvorläufern zum Thymus hingegen entbehrlich.

Die unkonventionellen Thymozyten-Populationen NK-T-Zellen, CD8 $\alpha\alpha$ und $\gamma\delta$ -Antigenrezeptor-positive T-Zellen zeigen keine signifikante Verminderung in ADAP-defizienten Mäusen. Die Stimulation von CD4⁺-Zellen mit Antikörpern oder Antigen-gepulsten APC resultierte in einer deutlichen Erhöhung (70%) der ADAP-Expression. Vermutlich findet die Regulation auf Transkriptions- und Translations-Ebene statt. Interessanterweise wird ADAP auch in Prä-BCR-Zellen und in der Erythropoese exprimiert. Eine Funktion für ADAP ist in diesem Zusammenhang nicht bekannt. In Erythrozyten und reifen B-Lymphozyten findet sich jedoch kein ADAP (Dluzniewska *et al.*, 2007).

^[36]*chicken retrovirus kinase like*

1.2.4 Weitere biologische Funktionen

Wie in 1.1.5.1 bereits beschrieben, ist ADAPs prominenteste Rolle in Integrin-Signalwegen zu finden. Darüber hinaus, sind weitere zelluläre Effekte von ADAP-Überexpression, -Mutanten und -Deletion beschrieben worden. So wurde die Rolle von ADAP in der Produktion von IL-2 kontrovers diskutiert. Raab *et al.* (1999) und Geng *et al.* (1999) beobachteten einen Anstieg der Transkription eines Reportergens unter Kontrolle des IL-2-Promotors, wenn ADAP überexprimiert wurde. Hierbei war eine Kooperativität mit der SLP-76-Überexpression zu beobachten. Boerth *et al.* (2000a) beschrieben einen entgegengesetzten Effekt, die Versuchsaufbauten unterschieden sich jedoch. Beide Gruppen konnten schließlich in parallelen Publikationen mit Daten von ADAP-defizienten primären Mauszellen die Frage der IL-2-Produktion beantworten. ADAP ist demnach ein positiver Regulator der IL-2-Produktion und Proliferation in T-Zellen (Griffiths *et al.*, 2001; Peterson *et al.*, 2001). Dies wurde auch durch Tian *et al.* (2007) bestätigt (siehe unten).

Obwohl für ADAP eine Bindung an Regulatoren des Actin-Zytoskeletts beschrieben wurde, konnte in Zellen von ADAP-knock-out-Mäusen keine generelle Verminderung der Actin-Polymerisierung beobachtet werden. Ein Effekt auf die lokal begrenzte Actin-Dynamik wurde aber nicht ausgeschlossen. In diesem Zusammenhang wurde keine Beeinträchtigung der TCR-Clusterbildung nach Aktivierung in Abwesenheit von ADAP beobachtet. Hingegen war eine deutliche Reduktion der Clusterbildung des Integrins LFA-1 nach TCR-Stimulation in ADAP-defizienten Zellen auffällig.

Ein Defekt in der Zentrosomen-Translokation in ADAP-defizienten Jurkat-Zellen stellt eine interessante Verbindung zwischen ADAP und dem Tubulin-Zytoskelett her (Combs *et al.*, 2006). In wildtyp-Zellen wird nach Stimulation eine Verschiebung des Zentromers in Richtung immunologischer Synapse beobachtet. Mikrotubuli erstrecken sich vom Zentrosom zu ADAP, das ringförmig am peripheren SMAC verteilt ist. Das Mikrotubulin-Motorprotein Dynein befindet sich in einem Komplex mit ADAP. In Abwesenheit von ADAP wird keine Translokation des Zentromers beobachtet. Dies führte zur Hypothese, dass ADAP über Dynein das Zentromer rekrutieren kann.

Mueller *et al.* (2007) führten einen immunologischen Vergleich von ADAP-wildtyp- und ADAP-defizienten Blutzellen durch. Die Charakterisierung der Oberflächenantigene, Zytokinproduktion und Proliferation brachte Hinweise auf eine Bedeutung von ADAP in der Aktivierung von T-Lymphozyten in Gegenwart von geringen Mengen Antigen oder niedrige klonale Häufigkeit des kognaten Antigens. Dies äußert sich unter anderem in geringerer (aber nicht abwesender) Konjugatbildung mit antigenpräsentierenden Zellen. Des Weiteren soll die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl- X_L vermindert sein, was die geringere Proliferation erklären könnte.

Eine medizinische Bedeutung für ADAP könnte sich aus den Beobachtungen von Tian *et al.* (2007) ergeben. Sie konnten zeigen, dass die Abstoßung von transplantierten Herzen bei ADAP-defizienten Mäusen deutlich verzögert ist. Die Abstoßung von Hauttransplantaten hingegen war normal und auch die zytotoxischen T-Lymphozyten zeigten normale Funktion. Aufgrund der begrenzten Expression von ADAP in T-Lymphozyten und myeloiden Zellen, ist eine pharmakologische Modulation der ADAP-Funktion bei Organtransplantationen denkbar. In einem weiteren Maus-Modell konnte das Fehlen der ADAP-Expression mit einer verstärkten Neigung zu Autoimmun-Diabetes korreliert werden (Zou *et al.*, 2008). Die Autoren führten dies auf die auffällig verminderte Zahl CD4-positiver Lymphozyten zurück, während CD8⁺- und regulatorische T-Zellen mit normaler Häufigkeit auftraten.

1.2.5 ADAP in anderen Zelltypen

Die meisten Untersuchungen zur Funktion von ADAP wurden in T-Zellen durchgeführt. In natürlichen Killerzellen, die ebenfalls zur lymphoiden Linie gehören, konnte kein Phänotyp beim Fehlen von ADAP gefunden werden (Fostel *et al.*, 2006). Mittlerweile liegen aber vielfältige Befunde aus myeloiden Zellen vor, die im Folgenden zusammengefasst werden.

1 Einleitung

1.2.5.1 Thrombozyten

ADAP wurde bereits durch Krause *et al.* (2000) als Thrombozytenprotein im Zusammenhang mit WASP identifiziert (siehe 1.2.2.4, S. 29). ADAP wird Tyrosin-phosphoryliert, wenn Thrombozyten an von-Willebrand-Faktor (VWF) adhären (Kasirer-Friede *et al.*, 2004). Die funktionelle Bedeutung bei der Regulation der Adhäsion dieser Zellen wurde schließlich von Kasirer-Friede *et al.* (2006) demonstriert. Die Thrombozyten-Adhäsion auf einer Fibronectin/VWF-Mischmatrix ist in ADAP^{-/-}-Zellen deutlich unterdrückt. Die Autoren erklären den Mechanismus dieses Outside-In-Signalwegs nicht, vermuten aber unter anderem eine Rolle von ADAP als PI(4,5)P₂-bindendes Protein zur möglichen Regulation des Talin-Integrin-Komplexes.

1.2.5.2 Makrophagen

Zytoskelett-Assoziation In murinen Makrophagen-Zelllinien wurde die Interaktion von ADAP mit mABP1^[37] oder HIP55^[38] gezeigt (Yuan *et al.*, 2005a). Die Interaktion ist direkt und wird über den prolinreichen N-terminalen Abschnitt von ADAP an die SH3-Domäne von mABP1 vermittelt. Diese Interaktion ist von besonderer Bedeutung, da sie über HPK1 eine Verbindung zum MAPK-Signalweg herstellt. Außerdem wurde hier erneut eine Verknüpfung zu Zytoskelett-Regulationsproteinen demonstriert. Eine Funktion für die ADAP-mABP-Interaktion wurde jedoch nicht gezeigt.

ADAP ist außerdem in Bereichen um phagozytäre Invaginationen zu finden, jedoch nicht mehr an geschlossenen Phagosomen (Coppolino *et al.*, 2001). Es kolokalisiert an phagozytären Invaginationen mit Actin, Nck, Vasp, Vav und SLP-76. Dies entspricht den Beobachtungen, die die Autoren in T-Zellen gemacht haben (Krause *et al.*, 2000, siehe 1.2.2.4, S. 29). Die genaue Rolle, die ADAP hier spielt, ist noch unklar, zumal SLP-76- (Nichols *et al.*, 2004) oder ADAP-defiziente Makrophagen zu Phagozytose fähig sind (unveröffentlichte Daten von B. Judd, P. Myung, E. Peterson, H. Goldfine und G. Koretzky laut Peterson, 2003).

^[37]Mammalian actin binding protein 1

^[38]HPK[Hematopoietic progenitor kinase]1-interacting protein of 55 kDa

YopH-Interaktion Interessanterweise sind ADAP und mABP1 beide als Substrate der *Yersinia*-Phosphatase YopH^[39] identifiziert worden (Black *et al.*, 2000; Hamid *et al.*, 1999). Verschiedene *Yersinia*-Spezies sind pathogen, zum Beispiel als Erreger der Pest (*Y. pestis*). Sie können sich extrazellulär in lymphoiden Geweben vermehren und entgehen hierbei der Zerstörung durch Phagozyten. Der Mechanismus der Phagozytose-Vermeidung hängt unter anderem von der Phosphatase YopH ab, die von Makrophagen aufgenommen wird und dort zusammen mit anderen bakteriellen Faktoren die normale Phagozytose blockiert. In nicht infizierten Makrophagen ist ADAP größtenteils nicht phosphoryliert. Beim Zusammentreffen mit *Yersinia* wird eine Erhöhung der Tyrosinphosphorylierung von ADAP und anderen Komponenten des β 1-Integrin Outside-In-Signalwegs beobachtet (Hamid *et al.*, 1999), sofern die Bakterien eine katalytisch inaktive Mutante von YopH enthalten. Phosphoryliertes ADAP ist Bindungspartner von YopH (Yuan *et al.*, 2005b). Der N-terminale Substratbindungsbereich von YopH (As. 1-130) war ausreichend, um ADAP (341-598) und (548-783) direkt zu binden, sofern diese phosphoryliert waren. Außerdem ist auch eine phosphorylierungsunabhängige Interaktion des YopH-Konstrukts voller Länge mit den C-terminalen ADAP-Konstrukten gezeigt worden. Die Interaktion von ADAP (und dem Crk-assoziierten Substrat Cas) mit YopH ist ein wichtiger Faktor für die Virulenz von *Yersinia* (Deleuil *et al.*, 2003). Ist YopH aktiv, werden ADAP und andere Proteine wie Cas und SKAP-55-HOM dephosphoryliert und die Eliminierung der Bakterien durch Phagozytose unterbunden.

Src Eine weitere Funktion für ADAP in murinen Makrophagen wurde für die Osteoclastogenese beschrieben (Koga *et al.*, 2005). Osteoclasten sind Zellen, die mineralisierte Gewebe resorbieren können und somit für die Knochen-Homöostase wichtig sind. Dieser Prozess ist NF κ B-vermittelt. Bei Verminderung der ADAP- oder Src-Expression (nicht jedoch anderer Src-Familien-Kinasen) ist die Differenzierung von Makrophagen in mehrkernige Zellen gestört. Das ADAP-Tyrosinmotiv um Tyr⁷⁷¹ (humane Sequenz) wurde als Src-Substrat und Src-Bindungsmotiv identifiziert. Hierbei sind andere Motive als Phosphorylierungsziel

^[39]*Yersinia outer protein H*

1 Einleitung

aber nicht ausgeschlossen und auch andere Kinasen können das beschriebene Motiv phosphorylieren. Siehe hierzu 1.2.3 auf Seite 33.

Des Weiteren ist auch in Makrophagen eine Outside-In-Signalfunktion von ADAP/SKAP55 vorhanden (Timms *et al.*, 1999). Dabei tritt die Phosphatase SHPS-1 im Komplex mit ADAP und SKAP55 auf. SHPS-1 ist ein Bindungspartner der Tyrosinphosphatase SHP-1. Siehe 1.2.2.3 (S. 27).

1.2.5.3 Mastzellen

Auch in Mastzelllinien führt ADAP-Überexpression zu verstärkter Integrin-vermittelter Adhäsion. Zusätzlich wird die Ausschüttung von Hexosaminidase durch überexprimiertes ADAP erhöht, sofern der C-terminale Abschnitt (As. 708-783) Teil des Überexpressionskonstrukts ist (Geng *et al.*, 2001).

Eine Komponente des ADAP-Komplexes in Ratten-Mastzellen ist MIST^[40] (Fujii *et al.*, 2003). Es ist den Adaptern SLP-76 und -65 ähnlich. Die Phosphorylierung der Adapter MIST, ADAP und SKAP55 kann in Mastzellen durch die Src-Familien-Kinase Lyn erfolgen. MIST kann mit seiner SH2-Domäne phosphorylierungsabhängig ADAP binden. Lyn-SH2 hingegen zeigt eine deutlich geringere Affinität zu ADAP im Vergleich mit Fyn-SH2 (und Lck-SH2). Eine direkte Bindung zwischen Lyn und ADAP wurde nicht beobachtet. Nur in Anwesenheit von Lyn, SKAP55 und ADAP brachte eine MIST-Immunpräzipitation eine Kosedimentation von Lyn. Fujii *et al.* (2003) fehlinterpretieren das Ausbleiben der Komplexbildung von MIST, SKAP55 und Lyn in Abwesenheit von ADAP jedoch, da sie den stabilisierenden Effekt von ADAP auf SKAP55 ignorieren (später detailliert beschrieben durch Huang *et al.*, 2005). Stattdessen interagiert der konstitutive ADAP-SKAP55-Komplex vermutlich doppelt mit MIST: phosphorylierungsabhängig zwischen ADAP und MIST-SH2, sowie phosphorylierungsunabhängig zwischen SKAP55 und MIST. Zudem ist eine Bindung zwischen Lyn und SKAP55 wahrscheinlich.

Die Überexpressions- und Präzipitationsstudien in Mastzellen suggerierten eine funktionelle Notwendigkeit. Die Abwesenheit von ADAP

^[40]*Mast cell immunoreceptor signal transducer*

hat jedoch weder einen Einfluss auf die Adhäsion, noch auf die Hexosaminidase- oder IL-6-Ausschüttung. Im Gegensatz dazu zeigen SLP-76-knock-out-Zellen bei diesen Funktionen Defizite (Wu *et al.*, 2004). SLP-76-Mutanten, deren SH2-Domäne nicht mehr bindungskompetent ist (ADAP und HTK1-Bindungsregion), haben wesentlich geringere Funktionseinschränkungen, als Mutationen in den N-terminalen Tyrosinen oder der prolinreichen Region.

1.2.5.4 Granulozyten

Eine interessante Beobachtung konnten Pazdrak *et al.* (2008) bei der Aktivierung von eosinophilen Granulozyten mit GM-CSF^[41] machen. ADAP konnte danach in einem Komplex mit dem Rezeptor, SLP-76, SHP-2 und ICAM-1 detektiert werden. Ein immobilisiertes Phosphopeptid von ICAM-1 (As. 480-489) konnte insbesondere nach längerer Stimulation der Zellen ADAP präzipitieren. Die Expression von SLP-76 wird erst nach Stimulation detektiert. Möglicherweise wird somit ein später Outside-In-Signalkomplex geschaffen, der dann die Sensitivität des Granulozyten gegenüber der extrazellulären Matrix oder anderen Zellen moduliert.

1.2.6 ADAP-Homolog PRAM-1

Das einzige bekannte Protein mit nennenswerter Homologie zu ADAP ist PRAM-1^[42] (Moog-Lutz *et al.*, 2001). Die homologen Bereiche liegen dabei hauptsächlich in der hSH3^C-Domäne und bei einigen prolinreichen Motiven in der N-terminalen Hälfte. PRAM-1 wird wie ADAP in myeloiden Zellen exprimiert, jedoch nur in geringem Maße in Lymphozyten. Es kann an SKAP55-HOM und induzierbar an SLP-76 binden. Daher wird vermutet, dass PRAM-1 die Funktion von ADAP teilweise übernehmen kann. In murinen neutrophilen Granulozyten, die kein PRAM-1 exprimieren, sind die Fc γ -Rezeptor-abhängigen Signalwege unbeeinflusst. Einige Integrin-abhängige Effekte, wie die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und Degranulation sind ohne PRAM-1

^[41]Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

^[42]Promyelocytic leukemia -Retinoic Acid receptor α target gene encoding an Adaptor Molecule

1 Einleitung

hingegen gestört. Eine genauere funktionelle Charakterisierung von menschlichem PRAM-1 steht aus. Ein weiterer interessanter Unterschied zwischen ADAP und PRAM liegt in der Lipidspezifität der hSH3-Domänen. Im Gegensatz zu ADAP-hSH3^C zeigt die PRAM-hSH3-Domäne eine Präferenz für PI(4)P gegenüber anderen Phosphoinositiden (Heuer *et al.*, 2006). Ob dies auch zu einer veränderten Lokalisation führt ist nicht bekannt.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist eine Charakterisierung des Immunadapters ADAP mit biochemischen Methoden. Hierbei werden zwei Teilprojekte entwickelt: Erstens die Identifizierung von Phosphorylierungsstellen jenseits des charakterisierten Bereichs und zweitens die Untersuchung von bekannten und potenziellen Bindungspartnern.

Zu Beginn dieser Arbeit war die Phosphorylierung und Funktion der Fyn- und SLP-76-Bindungsstellen bereits eingehend analysiert worden (u.a. da Silva *et al.*, 1992, 1997b; Geng *et al.*, 1999; Musci *et al.*, 1997; Raab *et al.*, 1999). Die Eignung der weiteren 13 Tyrosinmotive für eine Phosphorylierung war hingegen nicht systematisch untersucht worden. Im Hinblick auf die hohe Vorhersagewahrscheinlichkeit weiterer Tyrosinmotive als Substrate für Fyn und anderer Kinasen ist eine *in vitro*-Charakterisierung dieser Motive notwendig. Dies sollte als Grundlage für die Untersuchung des zellulären Proteins dienen. Die Daten aus der Phosphorylierungsanalyse dienen wiederum als Grundlage zur Herstellung von Mutanten, die anschließend funktionell charakterisiert werden sollen. Die Untersuchung der Modifikationen soll mit dem sich entwickelnden Wissen um die dreidimensionalen Strukturen kombiniert werden, um sich der Funktionsbestimmung der hSH3-Domänen anzunähern.

Die Besonderheit der Bindung der Fyn-Kinase an ihr Substrat ADAP unter Berücksichtigung der Regulation der Src-Familien-Kinasen erfordert die genauere Beschreibung der kinetischen Parameter in diesem Enzym-Substrat-System. Es soll geklärt werden, ob *in vitro*-Phosphorylierungsexperimente als Grundlage für einen mathematischen Modellierungsansatz dienen können und ob durch das Hinzufügen von regulativen Elementen (Fyn-modifizierender Phosphatase und Kinase) eine Modulation des Systems möglich ist.

Alle Interaktionen von ADAP waren zu Beginn dieser Arbeit für Bereiche außerhalb der Domänen beschrieben gewesen. Die strukturellen und biochemischen Besonderheiten der Domänen, wie die N-terminale helikale Verlängerung gegenüber der SH3-Faltung und die Redox-Sensitivität der hSH3^N-Domäne sollen bei der Beschreibung der biochemischen Eigenschaften besonders berücksichtigt werden. Auch die

1 Einleitung

von Heuer *et al.* (2005) beschriebene Lipidbindung der hSH3^C-Domäne wird bei der Auswahl der Parameter für die Charakterisierung berücksichtigt. Daraufhin ist die Untersuchung der wechselseitigen Abhängigkeiten von Phosphorylierung, Lipidbindung und Redox-Sensitivität geboten. In einem explorativen Ansatz soll zudem die Möglichkeit der Proteinbindung durch hSH3^N untersucht und die Carma1-ADAP-Komplexbildung (Medeiros *et al.*, 2007) genauer eingegrenzt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Allgemeine Chemikalien

Die eingesetzten Chemikalien sind, soweit nicht anders angegeben, von Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe oder Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze. Die Reinheit der Substanzen ist $\geq 99\%$.

2.1.2 Enzyme

2.1.2.1 Restriktionsendonucleasen

Typ II ortsspezifische Deoxyribonucleasen (EC 3.1.21.4) stellen eine große Gruppe von Enzymen dar, die die Hydrolyse doppelsträngiger DNA an spezifischen Sequenzen katalysieren. Meist werden palindromische Sequenzen von vier bis sechs Basenpaaren erkannt. Als Reaktionsprodukte entstehen entweder „glatte“ Schnittstellen oder Überhänge ungepaarter Basen entweder am 3'- oder 5'-Ende. Am 5'-Ende befindet sich nach der Reaktion immer ein Phosphatrest, am 3'Ende eine Hydroxygruppe. Die eingesetzten Enzyme werden von New England Biolabs GmbH (NEB), Frankfurt am Main oder Fermentas GmbH, St. Leon-Rot bezogen.

2.1.2.2 Phosphatase

Alkalische Phosphatase „Alkalische Phosphatase“ (EC 3.1.3.1) bezeichnet eine Gruppe von Phosphatasen mit basischem pH-Optimum. Eingesetzt wird eine Kälberdarm-Phosphatase (NEB).

Thermolabile Phosphatase Die „Antarctic Phosphatase“ hat ein Aktivitätsmaximum bei saurem pH-Wert und soll laut Hersteller (NEB)

2 Material und Methoden

durch Erhitzen auf 65°C für 5 Minuten vollständig inaktivierbar sein.

2.1.2.3 DNA-Polymerase

DNA-abhängige DNA-Polymerase (EC 2.7.7.7) katalysiert die Bildung eines DNA-Doppelstranges als Kopie der vorhandenen DNA. Für analytische Arbeiten, bei denen keine 3'→5' Fehlerkorrektur notwendig ist, wird die DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*-YT-1 eingesetzt (NEB). Für Plasmid-Konstruktionen wird die *Thermococcus kodakaraensis*-Polymerase („KOD“) verwendet (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt). Diese kann eine 3'→5'-Fehlerkorrektur durchführen. Um unspezifische Aktivität bei Raumtemperatur zu verhindern, liegt die Enzympräparation mit Antikörpern gegen die 3'→5'-Nuclease-Untereinheit vor. Zur Aktivierung der Polymerase wird vor dem ersten Elongationszyklus eine Inkubation für 2 min bei 94°C durchgeführt. Alternativ zu KOD wird Pfu-Polymerase der Stratagene corporation, La Jolla, USA eingesetzt.

2.1.2.4 Ligase

Die T4 DNA Ligase (NEB) katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxy-Termini doppelsträngiger DNA. Hierbei können Überhänge von einigen ungepaarten Basen mit komplementären DNA-Enden verbunden werden („sticky end ligation“). Im Gegensatz zur *E.coli*-DNA Ligase können auch Enden ohne Überhänge verbunden werden („blunt end ligation“).

2.1.2.5 c-Src kinase (Csk)

Diese Kinase phosphoryliert das C-terminale autoinhibitorische Tyrosinmotiv von Src-Familien-Kinasen. Hergestellt von Upstate, Millipore GmbH, Schwalbach, als rekombinantes Protein in *E. coli* (Reinheit 89%).

2.1.3 Vektoren

2.1.3.1 pEGFP

Die pEGFP-Vektorfamilie (Becton Dickinson and Company Biosciences Clontech, Palo Alto, Kalifornien, USA) kodiert eine Variante des grün fluoreszierenden Proteins, die gegenüber dem Wildtyp eine höhere Fluoreszenzintensität und ein rotverschobenes Absorptionsmaximum zeigt. Der Vektor wird hier eingesetzt zur Konstruktion von Genen, die Fusionsproteine mit EGFP kodieren. Dabei folgt der EGFP-Teil dem C- oder N-Terminus des angefügten Proteins. Die Expression kann in *E. coli*- oder Säugetierzellen erfolgen. Zum Einsatz kommen pEGFP-C3 (GenBank-Accession-Nr. U57607) und -N1 (U55762), sowie die gelb fluoreszierendes Protein kodierende Variante pEYFP-C1.

2.1.3.2 pGex

Vektoren der pGex-Familie ermöglichen die prokaryotische Expression von Proteinen, die an ihrem N-Terminus mit der Glutathion-S-Transferase (GST, aus *Shistosoma japonicum*) fusioniert sind. Dieses 218 Aminosäuren große Enzym bindet mit hoher Affinität an sein *in vivo*-Substrat Glutathion (GSH). Diese Bindungseigenschaft bleibt meist auch im Fusionsprotein erhalten. Somit können Fusionsproteine an einer GSH-präsentierenden Matrix gebunden werden. Dies kann der Aufreinigung des rekombinanten Proteins dienen oder zusätzlich zur Affinitätschromatographie eingesetzt werden. Die enzymatischen Eigenschaften der GST sind intakt, hier aber ohne Bedeutung. Dieser Vektor wurde konstruiert von Guan und Dixon (Guan & Dixon, 1991). Die Variante pGex-4T1 kodiert für eine Thrombin-Substratsequenz zwischen GST und inseriertem Protein. pGex-5X2 kodiert eine Faktor-Xa-, pGex-6P1 eine „PreScission™ Protease“-Substratsequenz.

2.1.3.3 pET

Die eingesetzten Expressionsvektoren der pET-Familie (Novagen-Merck KGaA, Darmstadt) kodieren N- oder C-terminale His₆-Sequenzen, die als Isolierungs- und Detektionssequenz eingesetzt werden. Die resultierenden Proteine binden an Metallchelate-Matrices mit zweiwertigen

2 Material und Methoden

Kationen und können durch Konkurrenz mit dem Histidin-Analog Imidazol eluiert werden. Zum Einsatz kamen pET21a, 24d und 28a, die sich durch die Antibiotikaresistenzen und die Lage der His₆-Sequenz unterscheiden.

2.1.4 Oligonukleotide und DNA-Sequenzierungen

DNA-Sequenzierungen werden von der Firma Invitex, Gesellschaft für Biotechnik & Biodesign mbH, Berlin oder der Firma SeqLab Sequence Laboratories, Göttingen GmbH durchgeführt. Dabei wird mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden mit der Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) gearbeitet. Oligonukleotide zur präparativen PCR oder für Sequenzierungen werden von Operon Biotechnologies GmbH, Köln oder BioTeZ GmbH, Berlin-Buch synthetisiert.

2.1.5 DNA-Konstrukte

2.1.5.1 Eigene Konstrukte

Konstrukte, die für diese Arbeit hergestellt wurden sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Protein	As. Start	As. Ende	Vektor	Konstruktname	Bemerkung	5' Oligonukleotid	3' Oligonukleotid
ADAP	660	703	pGEX-5X2 mit EGFP	PNLS1	Ausgangsvektor von U. Vinkemeier	GCG GGA TCC CTG TTT CAT CAG CAG AGA TG	GCG GAA TTC CAT CAT ATT TAA ATT TTT TCC TGA AG
ADAP	660	768	pGEX-5X2 mit EGFP	PNLS2	Ausgangsvektor von U. Vinkemeier	GCG GGA TCC CTG TTT CAT CAG CAG AGA TG	GCG GAA TTC CAT CAT TGT CCG CTA GGT AAC
ADAP	485	768	pGEX-5X2 mit EGFP	PNLS3	Ausgangsvektor von U. Vinkemeier	GCG GGA TCC TGG AGA AAA AGG AAC AGA AAG AG	GCG GAA TTC CAT CAT TGT CCG CTA GGT AAC
ADAP	diverse	diverse	diverse	C2S2-Mutation hSH3 ^N	Mutagene Primer	TTG CAA AAG CTT CTT CTG ATG TCA AAG GA	TCC TTT GAC ATC AGA AGA AGC TTT TGC AA
ADAP	486	579	pET24d	His-hSH3 ^N -C2S2	Cystein2-Serin2-Mutante	GCG AAT TCG CGA GAA AAA GGA ACA GAA	GCG TCG ACG TCT TTT TTC AGT TTC AA
ADAP	486	579	pEGFP-C3	GFP-hSH3 ^N -C2S2	Cystein2-Serin2-Mutante	GCG AAT TCG CGA GAA AAA GGA ACA GAA	GCG TCG ACG TCT TTT TTC AGT TTC AA
ADAP	486	579	pEGFP-C3	GFP-hSH3 ^N	wildtyp	GCG AAT TCG CGA GAA AAA GGA ACA GAA	GCG TCG ACG TCT TTT TTC AGT TTC AA
ADAP	486	783	pET24d	His-dbl-C2S2	Cystein2-Serin2-Mutante	GCG AAT TCG CGA GAA AAA GGA ACA GAA	GCG TCG ACG TCA TTG TCA TAG AIG CA
ADAP	486	783	pEGFP-C3	GFP-dbl-C2S2	Cystein2-Serin2-Mutante	GCG AAT TCG CGA GAA AAA GGA ACA GAA	GCG TCG ACG TCA TTG TCA TAG AIG CA

2 Material und Methoden

Protein	As. Start	As. Ende	Vektor	Konstruktname	Bemerkung	5' Oligonukleotid	3' Oligonukleotid
ADAP	1	783	pEGFP-C3	YFP-ADAP-C2S2	Cystein2-Serin2-Mutante, Quick-Change	TCT TGC AAA AGC TTC TTC TGA TGT CAA AGG AGG A	CTC CTT TGA CAT CAG AAG AAG CTT TTG CAA GAT G
ADAP	1	783	pEFBOS	Flag-ADAP-C2S2	Cystein2-Serin2-Mutante, Quick-Change, Ausgangsvektor von S. Kliche	TCT TGC AAA AGC TTC TTC TGA TGT CAA AGG AGG A	CTC CTT TGA CAT CAG AAG AAG CTT TTG CAA GAT G
ADAP	1	783	pEFBOS	Flag-ADAP- Δ hSH3 ^N	hSH3 ^N -Deletion mit Assembly-PCR	TTG AAG GGG CAC CAA GAG ATT TCT TTT CTT TCT CTT TCT	TCT CTT GGT GCC CCT TCA A
HT014	1	210	pGEX-4T1	GST-HT014	Matrize IRAU ^{p969D0951D6}	TGG AAT TCA TGT CGC ACG GTC ACA GC	ACT GGT CGA CCT AGG AAA TAA AGT GTG TC
HT014	1	210	pET24d	His-HT014	Matrize IRAU ^{p969D0951D6}	ATC GAA TTC TTA TGT CGC ACG GTC ACA GCC A	ACT GGT CGA CGG AAA TAA AGT GTG TCT GTG
HT014	1	210	pEGFP-C3	GFP-HT014	Matrize IRAU ^{p969D0951D6}	ATC GAA TTC TTA TGT CGC ACG GTC ACA GCC A	ACT GGT CGA CGG AAA TAA AGT GTG TCT GTG
HT014	1	210	pGADT7	Prey-HT014	Matrize IRAU ^{p969D0951D6}	ACT GCA TAT GTC GCA CGG TCA CAG CCA CGG	CTG CTC GAG TTA GGA AAT AAA GTG TGT CTG TGG

Protein	As. Start	As. Ende	Vektor	Konstruktname	Bemerkung	5' Oligonukleotid	3' Oligonukleotid
ADAP	426	579	pET28-mod/pGEX-4T1	His-/GST-XCESn	Klonierung von K. Thiemke durchgeföhrt	ACT GGG ATC CCC TCC GTT TGA CCT A	ACT GGG ATC CCC TCC GTT TGA CCT A
ADAP	460	579	pET28-mod/pGEX-4T1	His-/GST-CESn	Klonierung von K. Thiemke durchgeföhrt	ACT GGG ATC CGA AAC ATA TGA AGA C	ACT GGG ATC CCC TCC GTT TGA CCT A
ADAP	426	783	pET28-mod/pGEX-4T1	His-/GST-X-ct	Klonierung von K. Thiemke durchgeföhrt	ACT GGG ATC CCC TCC GTT TGA CCT A	ACT GCT CGA GTT AGT CAT TGT CAT AGA TGC AGC CAT
ADAP	460	783	pET28-mod/pGEX-4T1	His-/GST-C-ct	Klonierung von K. Thiemke durchgeföhrt	ACT GGG ATC CGA AAC ATA TGA AGA C	ACT GCT CGA GTT AGT CAT TGT CAT AGA TGC AGC CAT
ADAP	460	541	pET28-mod/pGEX-4T1	His-/GST-CESn-2	Klonierung von K. Thiemke durchgeföhrt	ACT GGG ATC CGA AAC ATA TGA AGA C	ACT GCT CGA GTT AGC GGA TGA TTT CAA TTT GCT CTC
ADAP	426	541	pET28-mod/pGEX-4T1	His-/GST-XCESn-2	Klonierung von K. Thiemke durchgeföhrt	ACT GGG ATC CCC TCC GTT TGA CCT A	ACT GCT CGA GTT AGC GGA TGA TTT CAA TTT GCT CTC
Carma1	651	760	pET28-mod/pGEX-4T1	His-/GST-P	Klonierung von K. Thiemke durchgeföhrt	ACT GGG ATC CCA CGT GCG GGG CCC AG	ACT GCT CGA GTT AGT CCT CCA TGT CCT TCA CCA GC

2 Material und Methoden

Protein	As. Start	As. Ende	Vektor	Konstruktname	Bemerkung	5' Oligonukleotid	3' Oligonukleotid
Carma1	749	1147	pET28-mod/pGEX-4T1	His-/GST-SG	Klonierung von K. Thiemke durchgeföhrt	ACT GGG ATC CGA AGG GTA CCG GAA G	ACT GCT CGA GTT ACA GCT GGT CCT CGT C
Carma1	651	1147	pET28-mod/pGEX-4T1	His-/GST-PSG	Klonierung von K. Thiemke durchgeföhrt	ACT GGG ATC CCA CGT GCG GGG CCC AG	ACT GCT CGA GTT ACA GCT GGT CCT CGT C
Carma1	651	911	pET28-mod/pGEX-4T1	His-/GST-PS	Klonierung von K. Thiemke durchgeföhrt	ACT GGG ATC CCA CGT GCG GGG CCC AG	ACT GCT CGA GTT ACC GCT CGT TGC TGT TCA TCC
ADAP	486	783	pBTM117	Bait-ADAP-dbl	Kinase-Hefe-2-Hybrid-Assay, Ausgangsvektor U. Stelzl	GCG GTC GAC CAT GGA GAA AAA GGA ACA GAA A	CGC TGC GGC CGC TAG TCA TTG TCA TAG
Fyn	142	256	pACT4-1b	Prey-Fyn-SH2	Kinase-Hefe-2-Hybrid-Assay, Ausgangsvektor U. Stelzl	GCG GAA TTC CAT GGA CTC TAT CCA GGC	GCG GAT CCC TAC AGA TCG GTA AGC C
SLP-76	1	533	pACT4-1b	Prey-SLP-76	Kinase-Hefe-2-Hybrid-Assay, Ausgangsvektor U. Stelzl	GCG GTC GAC CAT GGC ACT GAG GAA T	GCG GAT CCC TAT GGG TAC CCT GCA
VASP	1	115	pACT4-1b	Prey-VASP-EVH1	Kinase-Hefe-2-Hybrid-Assay, Ausgangsvektor U. Stelzl	GCG GAA TTC CAT GAG CGA GAC GGT C	GCG GGA TCC CTA TCC TTC CAA CGC

Protein	As. Start	As. Ende	Vektor	Konstruktname	Bemerkung	5' Oligonukleotid	3' Oligonukleotid
Fyn	251	520	p41K-cyc	Kinase-Fyn	Kinase-Hefe-2-Hybrid-Assay, Ausgangsvektor U. Stelzl	TGC GGC CGC TCA CAG GAA GCT CTG CAA GTA	AGC GTC GAC GCC AAG GCT TAC CGA TCT GT
Fyn	251	520	p42K-tef	Kinase-Fyn	Kinase-Hefe-2-Hybrid-Assay, Ausgangsvektor U. Stelzl	TGC GGC CGC TCA CAG GAA GCT CTG CAA GTA	AGC GTC GAC GCC AAG GCT TAC CGA TCT GT
Fyn	251	520	p41K-cyc	Kinase-Fyn	Kinase-Hefe-2-Hybrid-Assay, Ausgangsvektor U. Stelzl	TGC GGC CGC TCA CAG GAA GCT CTG CAA GTA	AGC GTC GAC GCC AAG GCT TAC CGA TCT GT
Fyn	251	520	p42K-tef	Kinase-Fyn	Kinase-Hefe-2-Hybrid-Assay, Ausgangsvektor U. Stelzl	TGC GGC CGC TCA CAG GAA GCT CTG CAA GTA	AGC GTC GAC GCC AAG GCT TAC CGA TCT GT

Tabelle 2.1: Übersicht der eingesetzten DNA-Konstrukte

2 Material und Methoden

2.1.5.2 Konstrukte aus weiteren Quellen

Protein	As. Start	As. Ende	Vektor	Konstruktname	Quelle
GST-EGFP	1	239	pGEX-5X2	PNLS0	Uwe Vinkemeier
ADAP	486	579	pET24d / pG-ex4T1	His-/GST-hSH3 ^N	Christian Freund
ADAP	486	579	pTFT7 / pG-ex4T1	His-/GST-hSH3 ^C	Christian Freund
ADAP	486	783	pET24d / pG-ex4T1	His-/GST-dbl	Christian Freund
ADAP	486	768	pET24d / pG-ex4T1	His-/GST-dbs	Christian Freund
His-Tag			pET28-mod		pET-28a-Vektor modifiziert von M. Kofler
Carma1	1	623	pGex6P1+PKA-Motiv	GST-CARD-CC	Andrea Oeckinghaus, Daniel Krappmann
Carma1	600	773	pGex6P1+PKA-Motiv	GST-PDZ	Oeckinghaus, Krappmann
Carma1	760	946	pGex6P1+PKA-Motiv	GST-SH3	Oeckinghaus, Krappmann
Carma1	932	1147	pGex6P1+PKA-Motiv	GST-Guk	Oeckinghaus, Krappmann
Carma1	600	946	pGex6P1+PKA-Motiv	GST-PDZ-SH3	Oeckinghaus, Krappmann
Carma1	760	1147	pGex6P1+PKA-Motiv	GST-SH3-Guk	Oeckinghaus, Krappmann
Carma1	600	1147	pGex6P1+PKA-Motiv	GST-PDZ-SH3-Guk	Oeckinghaus, Krappmann
Carma1	1	150	pGex6P1+PKA-Motiv	GST-CARD	Oeckinghaus, Krappmann
EGFP	1	239	pmaxGFP		Amara AG, Köln

Tabelle 2.2: Übersicht der eingesetzten DNA-Konstrukte, die nicht im Rahmen dieser Arbeit angefertigt wurden.

Oligonukleotide zur Sequenzierung:

Protein	Startposition (bp)	Sequenzier-Richtung	Sequenz 5'→3'
ADAP	484	5'→3'	TCA GAA AAT GAA CAG AAG CAA (K. Thiemke)
ADAP	764	5'→3'	CAA GTT TGC CCT TTC CTG GAG
ADAP	1030	5'→3'	CAG AAG CCA TTG CCT CCC TTG (K. Thiemke)
ADAP	1439	5'→3'	AGA AGA GGT TAG AGC TGG A
ADAP	1754	5'→3'	CAA GAC CTA TTG AAG ATG ACC
ADAP	1809	3'→5'	ATC ATC CTG CTC TGC AAC AT
ADAP	1905	5'→3'	TGG TTT CCC TGC TCC TCC TAA A
SLP-76	503	5'→3'	AAC TCC AAC TCC ATG TAC ATC GA
SLP-76	1021	5'→3'	ACT TTC CCT TCA AGA TCT ACT A

2.1.6 Bakterienstämme

E.coli BL21(DE3) zur Expression von GST-Fusionsproteinen.

Genotyp: $F^- ompT gal [dcm] [lon] hsd S_B (r_B^- m_B^-)$ mit λ -Prophage DE3 (trägt T7 RNA-Polymerase Gen)

E.coli XL1-Blue für alle molekularbiologischen Methoden.

Genotyp: $F'::Tn 10 proA^+ B^+ lacI^q \Delta(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r)$
 $thi hsdR17 (r_k^- m_k^+) glnV44 relA1 lac$

Für beide Stämme Lieferant: Stratagene corporation, La Jolla, Kalifornien, USA

BL21-RIL Die Häufigkeit der Verwendung bestimmter Kodone im *E.coli*-Genom unterscheidet sich deutlich von der Häufigkeit in menschlichen Genen. Um eine Einschränkung Synthese menschlicher Gene in *E.coli* aufgrund der Knappheit dieser Aminoacyl-tRNAs zu vermeiden, enthält dieser Stamm ein Plasmid, das für die raren tRNAs kodiert.

2.1.7 Antikörper

Antigen	Wirt	Quelle
ADAP(486-579)	Kaninchen	AG Freund
ADAP(673-783)	Maus	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
ADAP(755-768)	Kaninchen	Upstate (Millipore GmbH, Schwalbach)
ADAP(GST-ADAP[1-340])	Ziege	Stefanie Kliche von Gary Koretzky
Carma1 (Peptid um T175)	Kaninchen	Cell Signaling Technology Inc. (CST), Danvers, USA
Carma1(1-221)	Kaninchen	Kamiya Biomedical Company, Seattle, USA
Carma1(1131-1147)	Ziege	Abcam plc, Cambridge, Vereinigtes Königreich
CD3 („ICO-90“)	Maus	Santa Cruz Biotechnology (S.C.), Inc., Santa Cruz, USA
phospho-Erk (Peptid um pY204)	Maus	S.C.
Erk2 (Peptid am C-Terminus)	Kaninchen	S.C.
Flag-Tag	Maus	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Fyn(85-206)	Maus	S.C.
Fyn(22-35)	Kaninchen	Biosource-Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
phospho-Fyn (Peptid um Hck pY522[ähnlich Fyn pY530])	Kaninchen	Biosource
phospho-Fyn (Peptid um Src pY419[identisch mit Fyn pY420])	Kaninchen	Biosource
Grb2 (Peptid am C-Terminus)	Kaninchen	S.C.
GST	Kaninchen	S.C.

Antigen	Wirt	Quelle
His ₆	Maus	CST
His ₆	Kaninchen	CST
His ₆	Kaninchen	Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, USA
His ₆	Kaninchen	S.C.
His ₆	Maus	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
IgG (Ziege), IRDye [®] 800- konjugiert	Esel	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
IgG (Maus), AlexaFluor [®] 680	Ziege	Invitrogen
IgG (Maus), IRDye680- konjugiert	Esel	LI-COR
IgG (Maus), Peroxidase- konjugiert	Kaninchen	Rockland Immuno- chemicals Inc., Gilberts- ville, USA
IgG (Kaninchen), IRDye800- konjugiert	Ziege	Rockland
IgG (Kaninchen), IRDye800- konjugiert	Esel	LI-COR
IgG (Kaninchen), Peroxidase- konjugiert	Ziege	Rockland
I κ B α	Kaninchen	CST
phospho-I κ B α Peptid um pS32,pS36	Maus	CST
Phosphotyrosin (Klon pTyr-100)	Maus	CST
Phosphotyrosin (Klon 4610 „Platinum“, inkl. PY20)	Maus	Upstate
PKD (=PKC μ) (Peptid am C-Terminus)	Kaninchen	S.C.
phospho-PKD (Peptid um pS916 [murin])	Kaninchen	CST
Vav1 (Peptid aus As. 550-600)	Kaninchen	S.C.
SKAP55	Kaninchen	S.C.

Tabelle 2.3: Antikörper

2.1.8 Geräte

Art des Gerätes	Name	Hersteller
Chromatographie-systeme	ÄKTA™-Purifier	GE Healthcare, München
	FPLC	Pharmacia-Amersham
	Profinia	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
Chromatographische Säulen	HiLoad 16/60 Superdex 75	GE Healthcare
	HiLoad 16/60 Superdex 200	GE Healthcare
	GSTrap 4B	GE Healthcare
	HiTrap HP	GE Healthcare
Durchflusszytometer	FACScalibur	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Elektroporationsgerät	<i>Gene Pulser Xcell™</i>	Bio-Rad
	Nucleofector I	Amaxa AG, Köln
Elektrophoresesystem für Agarosegele		Owl Separation Systems, Portsmouth, USA
Elektrophoresesystem für SDS-PAGE	Mini-Protean II	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
	XCell	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
	SureLock™Mini-Cell	
Elektrophoresesystem für Western-Transfer	TransBlot SD	Bio-Rad
Flüssigkulturen-schüttler	Multitron II	Infors AG, Battningen, Schweiz
Fluorimeter	LS50B	Perkin Elmer Inc., Waltham, USA
Heiz- und Kühlblöcke	Thermomixer comfort	Eppendorf GmbH, Hamburg

Art des Gerätes	Name	Hersteller
	Block Heater	Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Vereinigtes Königreich
	CHB-202	Bioflux-Bioer, Tokyo, Japan
Thermozyklator	Epgradient S	Eppendorf
pH-Meter	Seven Easy	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
pH-Meter	pH-Meter 766	Knick Elektronische Mess- geräte GmbH & Co. KG, Berlin
Spannungsquellen	PowerPac 300 E802	Bio-Rad Consort
Spektralphotometer	Ultrospec [®] NanoDrop [®] ND- 1000	Amersham NanoDrop Technologies LLC, Wilmington, USA
Ultraschallquelle	Sonifier W250D	Branson Ultrasonics Corp., Danbury, USA
Videoanlage	für Gele	Intas GmbH, Göttingen
Vortex-Schüttler	Vortex Genie 2	Bender & Hobein GmbH, Zürich, Schweiz
Waagen	TP-214	Denver Instrument, Den- ver, USA
	EW 1500	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Wasseraufbereitung	arium [®]	Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne Cedex, Frankreich
Zentrifugen	Avanti J-25	Beckman Coulter, Fuller- ton, Kalifornien, USA
	TLX Ultracentrifuge	Eppendorf-Netheler Hinz GmbH,
	Centrifuge 5415R/D	Hamburg
	Centrifuge 5804R	
	Centrifuge 5810R	
	MC6	Sarstedt AG & Co., Nüm- brecht

Tabelle 2.4: Verwendete Geräte

2 Material und Methoden

2.1.8.1 Software

Die folgende Software war für diese Arbeit wissenschaftlich relevant:

Verwendung	Name der Software	Hersteller / Referenz
<i>In silico</i> -Analyse von DNA- und Proteinsequenzen (auch Alignment, Annotation, Optimierung von PCR-Primern)	VectorNTI Advance™	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Molekulargewichtsberechnung	Compute pI/Mw tool	Bjellqvist <i>et al.</i> (1993); http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html
Sequenzvergleiche	Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	Altschul <i>et al.</i> (1990); http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Primärstrukturanalyse	Scansite 2.0	Obenauer <i>et al.</i> (2003); http://scansite.mit.edu/
Sekundärstrukturvorhersage	PSIPRED	McGuffin <i>et al.</i> (2000)
Vorhersage subzellulärer Lokalisation	Wolf PSORT	Horton <i>et al.</i> (2007); http://wolfpsort.org/
Kinasevorhersage	GPS2.0	Xue <i>et al.</i> (2008); http://bioinformatics.lcd-ustc.org/gps2/down.php
SH2-Bindungs- vorhersage	SMALI	Li <i>et al.</i> (2008); http://lilab.uwo.ca/SMALI.htm
Bildverarbeitung	Gerätesoftware des Odyssey®Infrarot-Scanners	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA

Verwendung	Name der Software	Hersteller / Referenz
Bildbearbeitung	CorelDraw®	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
Molekülvisualisierung	PyMol	DeLano (2002)
Prozessierung von NMR-Daten	XWINNMR und TopSpin	Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten
Auswertung von NMR-Spektren	Sparky 3	Goddard & Kneller (2001)
Nicht-lineare Kurvenanpassung und Datenvisualisierung	Origin®7.5	OriginLab Corporation, Northampton, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

PCR-basierte Klonierung Zur Herstellung von Vektoren, die ein gewünschtes Protein oder Proteinfragment kodieren wird zunächst mittels PCR-Amplifikation ein gewünschter Abschnitt durch eine PCR-Reaktion mit einem cDNA-enthaltenden Plasmid als Matrize amplifiziert. Die DNA-Fragmente aus der PCR werden in Agarosegelen aufgetrennt, isoliert und anschließend aus der Agarose extrahiert. Mittels Restriktionsendonukleasen werden die Enden sequenzspezifisch hydrolysiert und somit bindungskompatibel zum Vektor. Der Vektor wird mit kompatiblen Nucleasen behandelt und zur Minimierung von Religationen dephosphoryliert. Die proteinkodierende DNA wird durch Ligation in den vorbehandelten Plasmid-Vektor integriert und durch Elektroporation in kompetente *E.coli*-Zellen eingebracht.

Nach Kultivierung der Zellen auf Selektivmedium werden monoklonale Kolonien ausgewählt und in größerem Maßstab weiter kultiviert. Die Plasmid-DNA wird isoliert und ein Aliquot mit Restriktionsendonukleasen zur Analyse inkubiert.

Alternativ wird die Gegenwart der eingefügten DNA direkt durch analytische PCR mit Zellmaterial durchgeführt („Kolonie-PCR“). Nach der

2 Material und Methoden

Identifizierung von Klonen, die das gewünschte DNA-Fragment in der richtigen Orientierung in dem Plasmidvektor enthalten, wird die DNA sequenziert. Präparationen, bei denen die DNA fehlerfrei in den Vektor integriert ist, werden für die weiteren Experimente ausgewählt.

2.2.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Reaktionsansätze enthalten

- je 50 ng der Oligonukleotide als Primer
- je 1 mM dNTPs
- 30 bis 60 ng Template-DNA
- 2,5 U DNA-Polymerase

Die Reaktion wird in 30 bis 35 Zyklen ausgeführt.

2.2.1.2 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Gemische zu analytischen oder aufreinigenden Zwecken aufgetrennt. Hierbei wird je nach Größe der erwarteten DNA-Moleküle eine Agarosekonzentration von 0,7 bis 2,0% eingesetzt. Die Agarose wird in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) gelöst: $4,8 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris Base, 0,11 % Essigsäure, 10 mM EDTA, pH=8,0.

Nach dem Aufkochen der Agarose in Puffer wird die Lösung unter leichtem Schütteln abgekühlt und mit Ethidiumbromid (Endkonzentration $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) versetzt. Ethidiumbromid ist ein fluoreszierender Farbstoff, der mit dem DNA-Doppelstrang interkaliert und somit die Detektion von DNA-Banden im UV-Licht (254 nm) ermöglicht.

Die DNA-Proben werden vor der Elektrophorese mit einem Viertel des Probenvolumens Probenpuffer versetzt. Dieser enthält ca. 0,15% Bromphenolblau und 60% (m/v) Ficoll oder Saccharose. Die Elektrophorese wird bei konstanter Spannung von 100 bis 200 V durchgeführt. Das Gel ist dabei von TAE-Puffer umgeben. Nach Beendigung der Auftrennung werden in einem UV-Imager die Nukleinsäurebanden sichtbar gemacht und mit einer CCD-Kamera fotografiert. Als Molekulargewichtsstandard dienen 100bp- oder 1000bp-Leitern oder HindIII-verdaute λ -DNA (NEB)

2.2.1.3 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wird die gewünschten Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Mit dem *Gel Extraction-Kit* der Firma Qiagen GmbH, Hilden wird das Gelstück zunächst aufgelöst und dann die DNA reversibel an eine Ionenaustauschermatrix gebunden. Die Elution von dieser Matrix erfolgt mit Wasser oder einem alkalischen Puffer.

2.2.1.4 Restriktionsverdau von DNA

Zur Charakterisierung einer DNA oder zur Vorbereitung einer DNA für die Verknüpfung mit anderen Fragmenten werden Restriktionsendonukleasen eingesetzt (siehe hierzu 2.1.2.1). Hierbei werden folgende Reaktionsansätze (Volumen 20 bis 100 μ l) angesetzt:

- 0,5 bis 10 μ g DNA
- 1/10 des Reaktionsvolumens 10x Puffer des Enzymherstellers
- 1-2 U des Restriktionsenzym / der Restriktionsenzyme
- je nach Enzym 1/100 des Reaktionsvolumens 100x BSA-Lösung

Die Reaktion wird für 2 Stunden bei der für das Enzym optimalen Temperatur Heizblock im oder im Wasserbad durchgeführt.

2.2.1.5 Ligation

Zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten werden diese mit T4-DNA-Ligase (siehe 2.1.2.4) in dem entsprechenden Puffer des Enzymlieferanten bei 16°C für 2-20 h inkubiert. Die DNA-Fragmente sind dabei durch Restriktionsverdau so vorbereitet, dass entweder glatte Enden oder passende überhängende Enden der DNAs kovalent verbunden werden können.

Zum Ringschluss von Vektoren mit Inserts wird folgendes molares Verhältnis von Vektor zu Insert eingesetzt:

Überhängende Enden: Vektor:Insert=1:5

Glatte Enden: Vektor:Insert=1:1 bis 1:3

2 Material und Methoden

2.2.1.6 Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen

LB-Medium:

- 1,0% Tryptone Peptone (tryptischer Verdau von Casein)
- 0,5% Hefeextrakt
- 1,0% NaCl
- 100 mg·l⁻¹ Ampicillin oder 30 mg·l⁻¹ Kanamycin
- (für LB-Platten: zusätzlich 1,5% Agar)

Plasmid-DNA wird durch Elektroporation in *E.coli*-Zellen eingebracht. Hierzu werden 50 μ l elektrokompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1-100 ng einer Plasmidlösung (in 1-2 μ l) oder 1-2 μ l eines Ligationsansatzes für 1 min. auf Eis inkubiert. Daraufhin wird das Gemisch in eine gekühlte Elektroporationsküvette (1 mm Elektrodenabstand) überführt und mit einem 1,8 kV-Puls elektroporiert. Die Zeitkonstante beträgt dabei ca. 5 ms.

Anschließend werden die Zellen sofort in 1 ml LB-Medium suspendiert und für 30 min. bei 37°C geschüttelt. Während dieser Zeit sollen sich die Zellen regenerieren und die Möglichkeit erhalten, Resistenzgene (bei darauffolgender Selektion mit Antibiotika) zu exprimieren.

Die Zellen werden dann sedimentiert (2,5 min., 2500g_{max}), und in ca. 100 μ l des Überstandes resuspendiert. Die Suspension wird auf vorgewärmte LB-Agar-Platten ausplattiert, die einen Selektionsfaktor (Ampicillin oder Kanamycin) enthalten. Transformierte Klone, die das entsprechende Resistenzgen tragen, wachsen innerhalb von 10-20 h bei 37°C im Brutschrank zu sichtbaren Kolonien.

2.2.1.7 Präparation hochreiner Plasmid-DNA aus *E.coli*

Zur Analyse von Plasmiden einzelner Klone nach Transformation wird etwas Zellmaterial einer Kolonie mit einer Einwegpipettenspitze aufgenommen und in 2-4 ml LB-Medium (inkl. entsprechendem Antibiotikum) fallen gelassen. Nach 10-18 h Inkubation bei 37°C und 300 U·min⁻¹ werden 1,5 ml der Kultur in Eppendorf-Reaktionsgefäßen 1 min. bei 13.000g_{max} zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und verworfen. Zur Präparation von Plasmid-DNA, die rein genug zur Sequenzierung ist und zur Herstellung großer Mengen von Plasmid-DNA, werden

die „Mini-“, „Midi-“ oder „Maxi-Prep-“Protokolle und Materialien der Qiagen GmbH, Hilden oder der Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA eingesetzt. Prinzipiell ist der Ablauf wie folgt:

- Alkalische Lyse der Zellen
- Fällung und Entfernung von Proteinen
- Bindung der gelösten DNA an eine Ionenaustauschermatrix
- Entfernen weiterer Verunreinigungen (Kohlenhydrate etc.) durch Waschschrte
- Elution der DNA
- Reinigung der DNA durch 2-Propanol-Fällung („Midi-“ und „Maxi-“-Präparationen)

Als DNA-Puffer wird 10 mM Tris·HCl pH=8,0 eingesetzt.

2.2.1.8 Die Präparation von Endotoxin-freier DNA

Zur Transfektion eukaryotischer Zellen wird das „NucleoBond PC 500 EF“-Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) durchgeführt. Hierbei werden Endotoxin-freie Reagenzien und ein Reagenz eingesetzt, das Endotoxine zerstört.

2.2.1.9 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA-Präparationen wird deren Absorption von UV-Licht gemessen. Das Absorptionsmaximum von Basen in Nukleinsäuren liegt im Bereich von 260 nm. Die photometrische Bestimmung der Absorption steht in folgendem Zusammenhang mit der Konzentration doppelsträngiger DNA:

$$c(\text{dsDNA}) = A_{260} \cdot 50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.2.1.10 Mutagenese

Ortsgerichtete Mutagenese von DNA-Konstrukten wird durch PCR mit mutierten Oligonukleotiden erreicht. Hierzu werden entweder einzelne Fragmente mit PCR amplifiziert, assembliert und schließlich durch

2 Material und Methoden

Restriktionsverdau und Ligation in den Zielvektor eingeführt. Alternativ wird ein Protokoll analog zu QuikChange[®] (Stratagene) eingesetzt. Hierbei wird der vollständige Vektor mittels PCR amplifiziert. Komplementäre Oligonukleotide, die mittig die gewünschte Mutation tragen dienen als Primer. Nach der Amplifikation wird die methylierte Wildtyp-DNA mit DpnI verdaut und kompetente *E.coli*-Zellen mit den mutierten komplementären Einzelsträngen transformiert. Die Kontrolle der Mutagenese erfolgt durch Sequenzierung der betreffenden Region. Die Deletion der hSH3^N-Domäne-kodierenden DNA aus ADAP-cDNA wird durch Assembly-PCR erreicht. Hierbei werden zunächst zwei Fragmente amplifiziert. Fragment 1 erstreckt sich vom 5'-Terminus der cDNA bis zum gewünschten Beginn der Deletion. Zusätzlich enthält das 3'-Oligonukleotid 25 Nukleotide, die dem Beginn des Bereichs nach der Deletion homolog sind. Fragment 2 deckt den Bereich nach der Deletion bis zum 3'-Ende des Konstrukts ab. In einem zweiten Schritt werden die gereinigten Fragmente 1 und 2 als Matrizen eingesetzt und mit Oligonukleotiden der 5'- und 3'-Enden amplifiziert. Hierbei lagert sich das ein Teil des hybriden Fragments 1 an die komplementäre Sequenz von Fragment 2. Das Deletionskonstrukt wird durch Sequenzierung überprüft.

2.2.2 Präparation und Analyse von Proteinen

2.2.2.1 Expression und Reinigung von Epitop-markierten Fusionsproteinen

Tris-Base gepufferte Saline (TBS) mit DTT:

- 20 mM Tris-HCl (pH=7,2 bis 8,5 bei 8°C)
- 140 mM NaCl
- filtriert, entgast, anschließend Zugabe von 1 mM DTT

Induktion der Genexpression mit IPTG Zur Überexpression und Aufreinigung von GST- oder His₆-Fusionsproteinen werden *E.coli*-Bakterien des Stamms BL21(DE3) eingesetzt. Falls die Kodon-Häufigkeit des exprimierten Gens es erfordert, wird der Stamm BL21-RIL eingesetzt. Bakterien werden mit dem Expressionsplasmid transformiert und auf

Selektionsplatten ausgestrichen werden. Am nächsten Tag wird Zellmaterial einer isolierten Kolonie in 100 ml LB-Selektionsmedium mit $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Ampicillin oder $35 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Kanamycin überführt. Nach 14-18 h Schütteln bei 37°C wird die Vorkultur in 1 l LB-Selektionsmedium überführt und für weitere 1-4 h bei 37°C geschüttelt. Die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) sollte vor dem nächsten Schritt bei 0,4-0,75 liegen. Für Proteine, die bei 37°C in die unlösliche Fraktion von *E.coli* gelangen, wird die Kultur auf $18\text{-}20^\circ\text{C}$ abgekühlt. Daraufhin wird 1 ml 0,1 M IPTG hinzugefügt (Endkonzentration 1 mM) und für 4-6 h bei 37°C oder ü.N. bei $18\text{-}20^\circ\text{C}$ geschüttelt.

Autoinduktion der Genexpression mit Lactose Alternativ zur Induktion durch IPTG-Zugabe wird ein Phosphat-gepuffertes autoinduzierendes Medium eingesetzt (Studier, 2005). In Gegenwart von Glycerin, Glucose und Lactose wird während des exponentiellen Wachstums zunächst Glycerin und Glucose konsumiert. Sinkt dessen Konzentration unter einen kritischen Wert, wird Lactose in die Bakterienzellen transportiert und kann dort die Lactose-abhängige Genexpression initiieren. Hiermit werden typischerweise hohe Zelldichten (8-10 OD_{600}) erreicht, sofern die Sauerstoffversorgung ausreichend ist. Außerdem kann die Expression bei niedrigen Temperaturen unbeaufsichtigt für 20-40 h erfolgen. Die Kanamycin-Konzentration wird im Autoinduktionsmedium auf $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ erhöht, da sonst der Selektionsdruck nicht hoch genug ist.

Autoinduzierendes Medium:

- 1,0% Tryptone Peptone (tryptischer Verdau von Casein)
- 0,5% Hefeextrakt
- 25 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 50 mM KH_2PO_4
- 50 mM Na_2HPO_4
- 0,5% Glycerin
- 0,05% Glucose
- 0,2% α -Lactose
- 1 mM MgSO_4

Die Zellen werden für 20 min. bei $3.000g_{\text{max}}$ sedimentiert und der Überstand entfernt. Sofern die Zellen nicht umgehend weiterverarbeitet

2 Material und Methoden

werden, wird das Bakterienpellet bei -20°C gelagert. Die weiteren Arbeitsschritte finden auf Eis und in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren statt, um Proteindegradation zu minimieren.

Zunächst werden die Bakterien in 10 ml TBS (gekühlt) resuspendiert. Zugesezt werden (Endkonzentrationen in Klammern):

- Lysozym ($0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$)
- EDTA (5 mM)
- Proteaseinhibitor-Mischung (1 Tablette)

Der pH-Wert richtet sich hierbei nach dem pI des zu isolierenden Proteins. Er wird so gewählt, dass der pH-Wert bei 8°C mindestens 0,5 Einheiten vom pI entfernt ist. Bei Proteinen, die einen pH-Wert um 7 erfordern, wird als Puffersubstanz Hepes [2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure] statt Tris eingesetzt. Zum Aufschließen der Zellen wird (zusätzlich zur Lysozym-Wirkung) mit Ultraschall behandelt. Eine Schalleistung von 170 W wird für 10-30 s appliziert. Dann wird die Suspension für 45-90 s abgekühlt. Dieser Zyklus wird viermal durchlaufen. Das Lysat wird für 40 min. mit $50.000g_{\text{max}}$ (4°C) zentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wird mit einer Pipette vorsichtig entfernt. Das Lysat wird mit $0,45 \mu\text{m}$ und $0,2 \mu\text{m}$ -Spritzenfiltern von größeren Partikeln befreit.

Affinitätschromatographie zur Reinigung von GST-Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine werden an einer Glutathion-Sepharose[®]-Matrix immobilisiert. Hierzu wird die GSTrap[®]4B-Säule zunächst mit dem Grundpuffer äquilibriert, der zusätzlich 1 mM EDTA enthält. Das filtrierte *E.coli*-Lysat wird dann auf die Matrix gepumpt. Nach dem Entfernen nicht bindender Proteine durch Waschschrirte wird gebundenes Protein mit einer linear steigenden GSH-Konzentration (0-20 mM) eluiert.

Affinitätschromatographie zur Reinigung von His₆-Fusionsproteinen

Proteine mit Hexahistidin-Peptid werden an Ni^{2+} oder Co^{2+} -beladener Nitrilotriessigsäure-Agarose immobilisiert. Co^{2+} zeigte tendenziell höhere Spezifität für die gewünschten Proteine als Ni^{2+} . Bei Äquilibrierung und Waschen der Matrix werden 10 mM Imidazol eingesetzt.

Die Elution des Fusionsproteins erfolgt mit einem linearen Imidazol-Gradienten bis 400 mM. Der Elutionspuffer wird hierzu mit Salzsäure auf den gewünschten pH-Wert eingestellt.

2.2.2.2 Proteinexpression in Insektenzellen

Die Expression großer humaner Proteine, die posttranslationale Modifikationen enthalten, ist in *E.coli* in der Regel nicht effizient. Zur Herstellung aktiver Fyn-Kinase wird daher ein Insektenzellen-Expressionssystem eingesetzt. Eine Ovarienzelllinie von *Spodoptera frugiperda* wird hierzu mit einem Baculovirus infiziert, der das gewünschte Expressionskonstrukt enthält. Auch ADAP-Protein voller Länge wurde in diesem System hergestellt (zur Verfügung gestellt von Nele Alder-Baerens).

Sf9-Medium:

- 1 l Grace's Grundmedium
- 0,35 g NaHCO₃, pH=6,0 mit NaOH, sterilfiltrieren
- 100 ml fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert)
- 1 ml Pluronic® (Netzmittel)
- 1 ml Yeastolate (lösliches Hefeautolysat)
- 100 U Penicillin G
- 100 µg Streptomycinsulfat
- 10 ml Patricin (Fungizid)

Die Zellen werden bei einer Dichte von $0,5-3,0 \cdot 10^6$ /ml unter sterilen Bedingungen kultiviert. Die Infektion mit 30 ml Baculovirus pro 1 l (hergestellt von Katarina Thiemke) findet bei einer Dichte von $1,0-1,5 \cdot 10^6$ /ml statt. Die Ernte erfolgte 72 h nach Infektion mit $1000g_{max}$, 20 min. (4°C). Zum Aufschließen wird Ultraschall eingesetzt (siehe oben).

2.2.2.3 Isolierung von zellulärem ADAP

Die Untersuchung von posttranslationalen Modifikationen von ADAP macht die Isolierung aus Jurkat-T-Zellen notwendig. Da die phosphorylierte Fraktion von ADAP analysiert werden soll, wird die Anreicherung durch Bindung an ein immobilisiertes GST-Fyn-SH2-Fusionskonstrukt herbeigeführt. Die Domäne zeigt eine starke Selektivität für das phosphorylierte ADAP-Motiv um *poY*⁶²⁵ (1.2.2.1, S. 24). Zur Kultivierung

2 Material und Methoden

und Manipulation von Jurkat-Zellen siehe 2.2.5.1 (S. 82).

$9,8 \cdot 10^8$ Jurkat-Zellen werden mit $10 \mu\text{M}$ Pervanadat für 15 min. bei 37°C stimuliert. Alle folgenden Schritte finden bei $4\text{--}8^\circ\text{C}$ statt. Die sedimentierten Zellen ($300g_{\text{max}}$, 8 min.) werden mit TBS gewaschen und in 20 ml Lysepuffer suspendiert:

- TBS, pH=7,5
- 1% Triton[®]X-100
- 5 mM EDTA
- 5 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (Pyrophosphat)
- 50 mM NaF
- 1 mM Na_3VO_4
- Proteaseinhibitor-Mischung (1 Tablette pro 10 ml, Roche Applied Science, Mannheim)

Während der Lyse (20 min.) wird mehrmals resuspendiert (Vortexer). Die unlöslichen Bestandteile werden durch Zentrifugation entfernt (20 min., $55.000g_{\text{max}}$). Das Lysat wird mit $300 \mu\text{l}$ GSH-Sepharose-Beads für 3 h rotierend inkubiert. Hierdurch sollen unspezifische Wechselwirkungen mit der GSH-Matrix minimiert werden. Die GST-Fyn-SH2-Präparation wird zentrifugiert, um Präzipitat zu entfernen (5 min., $16.000g_{\text{max}}$). 2,6 mg Protein werden mit $300 \mu\text{l}$ Beads 1 h rotierend inkubiert.

Nach der Bindung des GST-Fusionsproteins an GSH-Matrix werden die Beads sedimentiert und viermal mit TBS gewaschen (5 min., $700g_{\text{max}}$). Die GST-Fyn-SH2-Beads werden mit Lysat über Nacht rotierend in Gegenwart von 1 mM DTT inkubiert. Abschließend wird die Matrix mit gebundenen Proteinen dreimal mit 25 ml TBS gewaschen (20 min., $800g_{\text{max}}$). Die Beads werden mit $270 \mu\text{l}$ 1x LDS-Probenpuffer (Invitrogen, verdünnt mit TBS, mit 25 mM DTT) 10 min. bei 70°C eluiert.

2.2.2.4 Redox-abhängige Affinitätschromatographie an His₆-hSH3^N

Zur Identifizierung von Bindungspartnern von ADAP-hSH3^N, die an die reduzierte und/oder oxidierte Domäne binden, wurde eine Säulenbasierte Affinitätschromatographie mit Jurkat-Zellysaten an einer Ni²⁺-NTA-Matrix durchgeführt.

Grundpuffer (P1):

- 50 mM Phosphat-Puffer, pH=7,5
- 150 mM NaCl
- 1% Triton[®]X-100
- Proteaseinhibitorcocktail (1 Tablette pro 10 ml)

Äquilibrierungs-, Bindungs- und Waschpuffer (P2-red / P2-ox):

- 100 ml P1
- 10 mM Imidazol (Phosphat-gepuffert)
- 2,5 mM 2-Mercaptoethanol (P2-red) *oder*
- 5,0 mM H₂O₂ (P2-ox)

Elutionspuffer NaCl (P3): P1 + 1 M NaCl (pH=7,1)

Elutionspuffer EDTA (P4): P1 + 100 mM EDTA (pH=6,4 eingestellt mit Na₂HPO₄)

Jurkat-Zellen werden gezählt, $1,2 \cdot 10^9$ Zellen pelletiert und in P1 resuspendiert ($25 \cdot 10^6$ / ml). Die Lyse erfolgt auf Eis (40 min.) mit mehrmaligem resuspendieren (Vortexer). Abtrennung unlöslicher Bestandteile bei $50.000g_{\max}$. Die Metallchelate-Matrix (Ni-NTA) wird fünfmal mit einem Überschuss von P1 gewaschen ($1000g_{\max}$, 3 min.). Jurkat-Lysat wird mit $250 \mu\text{l}$ Bead-Volumen Ni-NTA über Nacht rotierend inkubiert (4°C), um unspezifische Bindungen an die Matrix zu minimieren. Die Beads werden durch Zentrifugation entfernt ($1000g_{\max}$, 5 min.). Das vorgeklärte Lysat wird durch einen $0,2 \mu\text{m}$ -Spritzenfilter gedrückt und mit 16 mM gepuffertem Imidazol versetzt.

Jeweils $40 \mu\text{g}$ der gereinigten His₆-hSH3^N-Domäne werden mit $110 \mu\text{l}$ P2-red- oder P2-ox-äquibrierter Ni-NTA-Matrix inkubiert (über Nacht, 4°C, rotierend). Die Beads werden anschließend dreimal mit P2 (red/ox) und zweimal mit P3 gewaschen und in ein Säulen-Gehäuse übergeführt. Mit 1 ml P2 (red/ox) wird das Protein äquilibriert und die Bindung des Proteins mittels SDS-PAGE eines Aliquots überprüft.

Zur Chromatographie werden jeweils 10 ml des Lysats auf die Säule gegeben und der Durchfluss erneut aufgetragen. Anschließend wird fünfmal mit 1 ml P2 (red/ox) gewaschen. Eluiert wird zunächst mit dreimal $100 \mu\text{l}$ P3, dann dreimal $100 \mu\text{l}$ P4. Die verbleibende Matrix wird in $100 \mu\text{l}$ P1 suspendiert und wie alle vorherigen Proben mit SDS-Probenpuffer aufgekocht.

2 Material und Methoden

2.2.2.5 Immunpräzipitation

Zur Isolierung von zellulären Protein-Komplexen wird eine spezifische Wechselwirkung eines Proteins mit einem Antikörper genutzt. Hierzu werden zunächst Protein A- oder G-präsentierende Beads (Sigma) mit einem Bindungspuffer (TBS mit 0,1% Tween-20) äquilibriert. Das Zelllysate ($1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) wird mit dem Antikörper ($0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) inkubiert ($\geq 2 \text{ h}$, rotierend, 8°C). Anschließend wird dem Immunkomplex Protein-A/G-Beads zugesetzt und erneut inkubiert ($\geq 1 \text{ h}$). Die Matrix wird zweimal mit Tween-20-haltigem TBS und einmal nur mit TBS gewaschen. Sedimentierte Beads werden in SDS-Probenpuffer aufgekocht. Die Proteine können dann mit SDS-PAGE aufgetrennt werden. Die spezifische Analyse erfolgt mit Antikörpern nach Western-Blot.

2.2.2.6 Diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) werden Proteine nach ihrem scheinbaren Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Durch die Anlagerung von negativ geladenen SDS-Molekülen an ein Protein, wird dessen Eigenladung überdeckt. Außerdem denaturiert SDS als Detergenz das Protein, sodass der Einfluss der Proteinform auf das Wanderungsverhalten aufgehoben wird. Dies wird durch die Zugabe von Dithiothreitol (DTT) komplettiert, da dieses Disulfidbrücken durch Reduktion spaltet. Hierdurch werden auch Proteinkomplexe, die über Disulfidbrücken verknüpft in Monomere überführt. Die Polyacrylamid-Matrix wirkt als Molekularsieb, durch das sich Proteine abhängig von ihrer Masse mit unterschiedlicher Geschwindigkeit bewegen. Die Dichte des Polymers steigt mit der Konzentration des Monomers und des Quervernetzers Acrylamid/*N,N'*-methylen-bis-acrylamid (AMBA). Je größer die Massen der aufgetrennten Proteine, desto größer sollten die Poren des Gels sein.

Bei der diskontinuierlichen PAGE wird die Proteinmischung zunächst in einem Sammelgel mit niedriger Dichte und geringem pH-Wert fokussiert. Die Proteine befinden sich dann beim Eintritt in das Trenngel in einem kleinen Bereich zwischen den Ionen des Sammelgels und denen des Trenngels. Hierdurch wird die Schärfe der Trennung erhöht.

Trenngel:

- 7,5% bis 17% AMBA 37,5:1 (m/v)
- 375 mM Tris·HCl
- 0,1% SDS (m/v)
- 0,1% TEMED (v/v)
- 0,0375% APS (m/v)
- pH=8,8

Sammelgel:

- 5% AMBA 37,5:1 (m/v)
- 125 mM Tris·HCl
- 0,1% SDS (m/v)
- 0,1% TEMED (v/v)
- 0,0375% APS (m/v)
- pH=6,8

Laufpuffer:

- 25 mM Tris
- 19 mM Glycin
- 0,1% SDS (m/v)
- pH=8,8

Probenpuffer (3x):

- 170 mM Tris·HCl
- 3 mM EDTA
- 0,2% Bromphenolblau (m/v)
- 10% SDS (m/v)
- 30% Glycerin
- 150 mM DTT
- pH=6,8

Für Polyacrylamidgele, die native Proteine auftrennen sollen, wird in allen Puffern SDS weggelassen.

2 Material und Methoden

Gele mit einheitlicher Acrylamidkonzentration im Trenngel Zur Herstellung eines Gels mit einheitlicher AMBA-Konzentration werden zunächst die Komponenten der Gelkassette zusammengesetzt. Die Glasplatten werden mit H₂O (demin.) gereinigt. Die Bestandteile des Trenngels werden gemischt und in eine Bio-Rad-Mini-Protean II-Gelkassette gegossen. Die Lösung wird sofort mit Propanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren des Gels wird das Propanol dekantiert. Die Sammelgellösung wird gemischt und auf das Trenngel gegossen. Ein Gelkamm wird blasenfrei in die unpolymersierte Lösung gesetzt.

Nach dem Polymerisieren des Sammelgels wird der Gelkamm entfernt. Die Gelkassette wird in die Elektrodenhalterung gespannt und in einen Tank mit Laufpuffer gehängt. Der Kathodenraum wird ebenfalls mit Laufpuffer gefüllt.

Den Proben wird die Hälfte ihres Volumens an 3x Probenpuffer zugeetzt und entweder für 5 min. gekocht oder für 10 min. auf 70°C erhitzt. Die Proben werden mit einer Hamilton-Spritze in die Taschen gefüllt. Für quantitative Arbeiten werden 10 µl-Pipetten mit Gelladespitzen eingesetzt. Die Elektrophorese wird bei konstanter Spannung von zunächst 150 V, nach Fokussierung bei 200 V durchgeführt. Zur Bestimmung der ungefähren Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine wird einer der folgenden Molekulargewichtsmarker als Standard mitgeführt:

- „Bench-Mark™“ (Invitrogen)
- „Mark12™“ (Invitrogen)
- „SeeBlue®“ und „SeeBlue® Plus2“ vorgefärbte Standards (Invitrogen)
- „Prestained Broad-Range“ vorgefärbter Standard (NEB)
- „PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus“ vorgefärbter Standard (Fermentas)

Acrylamid-Konzentrationsgradientengele Zur Auftrennung komplexer Proteingemische oder mehrerer Proteine mit stark unterschiedlichen Molekulargewichten werden vorgefertigte Acrylamid-Konzentrationsgradientengele (4-12% Acrylamid) eingesetzt (Novex® System, Invitrogen). Hierbei wird ein Bis-Tris (Bis(2-hydroxyethyl)imino-tris(hydroxymethyl)methan-HCl)-Puffersystem in den Gelen eingesetzt. Die Auftrennung erfolgt bei 200 bis 250 V. Der Laufpuffer ist:

- 50 mM 2-(N-morpholino)ethansulfonsäure (MES)
- 50 mM Tris-Base
- 0,1% SDS (m/v)
- 1 mM EDTA
- pH=7,3

System vorgefertigter PAGE-Komponenten Proteine mit hohem Molekulargewicht werden in einem Tris-Acetat-Puffersystem deutlich besser aufgelöst, als in Tris-Glycin-Puffern. Außerdem entspricht das Laufverhalten einiger Proteine in diesem System eher dem tatsächlichen Molekulargewicht. Zum Einsatz kommen vorgefertigte Tris-Acetat-Gele mit 7% Acrylamid. Die Elektrophorese wird mit 150 V durchgeführt. Der Laufpuffer setzt sich wie folgt zusammen:

- 50 mM 2-[1,3-Dihydroxy-2-(hydroxymethyl) propan-2-ylamino]-essigsäure (Tricin)
- 50 mM Tris-Base
- 0,1% SDS (m/v)
- pH=8,2

2.2.2.7 Coomassie[®]-Färbung von Polyacrylamidgelen

Coomassie[®] brilliant blue R250 und G250 sind Farbstoffe, die mit Proteinen Komplexe bilden. So können Proteinbanden in Gelen nach Elektrophorese sichtbar gemacht werden. Typisch sind Nachweisgrenzen von 50 ng. Die Gele werden dazu für 30 min. in Gelfärbelösung geschwenkt oder kurz in einem Mikrowellenherd aufgeköcht:

- 0,25% Coomassie[®] brilliant blue R250
- 10% Essigsäure
- 40% Methanol
- Lösung wird nach dem Ansetzen filtriert.

Zum Entfärben des Polyacrylamids wird 1 h bis über Nacht in Entfärbelösung geschwenkt: 10% Essigsäure, 30% Methanol. Die Entfärbelösung wird dabei ein- oder mehrmals ausgetauscht. Alternativ wird in das Gel mit der Entfärbelösung in einem Mikrowellenherd bis zur gewünschten Entfärbung aufgeköcht.

2 Material und Methoden

2.2.2.8 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen durch Western-Blotting

Zur weiteren Analyse von Proteinen, die mit SDS-PAGE aufgetrennt wurden, können die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden (Towbin *et al.*, 1979).

Blotpuffer:

- 48 mM Tris
- 38 mM Glycin
- 20% Methanol (v/v)
- 1,3 mM SDS

Ponceau S-Lösung:

- 2% Essigsäure (v/v)
- 0,2% Ponceau S (m/v)
- filtriert

Phosphatgepufferte Saline (PBS)

- 137 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 5,4 mM Na₂HPO₄
- 1,8 mM KH₂PO₄
- pH=7,4

Eine Nitrozellulosemembran und Filterpapiere in Größe des Gels werden in Blotpuffer äquilibriert. Zwei Lagen Filterpapier, Membran, Gel und zwei weitere Filterpapiere werden luftblasenfrei übereinandergeschichtet. Dabei zeigt die Membran zur Anode, das Gel zur Kathode. Der Elektrotransfer wird je nach Mobilität des Proteins für 50 min. bei 18 V bis 70 min. bei 23 V durchgeführt. Nach Beendigung des Elektrottransfers können die Proteine auf der Membran mit Ponceau S reversibel gefärbt werden. Hierzu wird das Gel von der Membran entfernt und diese kurz in der Färbelösung (0,1% Ponceau S in 5% Essigsäure, filtriert) geschwenkt. Die Färbelösung wird dekantiert und überschüssiger Farbstoff mit H₂O (bidest.) entfernt. Die Proteinbanden werden sichtbar. Nach Dokumentation und Markierung der Protein-Standard-Banden kann der Farbstoff durch Waschen mit phosphatgepuffertter Saline (PBS) entfärbt werden.

2.2.2.9 Immundetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Zum Nachweis eines immobilisierten Proteins auf einer Membran wird eine indirekte Markierung mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Dabei wird zunächst mit einem primären Antikörper inkubiert, der ein Epitop des gesuchten Proteins bindet. Nach Bindung des Primärantikörpers wird mit dem Sekundärantikörper inkubiert, der Spezies-spezifisch gegen den F_c-Teil des Primärantikörpers gerichtet ist. Der Sekundärantikörper ist entweder mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) oder mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt. Peroxidase-katalysierte Detektion wird mit dem Chemilumineszenz-System („enhanced chemiluminescence“ - ECL[®], GE Healthcare) oder einem analogen System (Western Lightning[®] Plus-ECL, Perkin Elmer) durchgeführt.

Alle Schritte finden bei Raumtemperatur statt. Die Volumen der Puffer sind so gewählt, dass die Membran vollständig bedeckt wird. Die Membran wird stets langsam in Puffer geschwenkt. Nach dem Transfer von Proteinen auf die Membran wird diese 30 min. in TBS mit Blockierungsreagenz geschwenkt. Hierzu werden je nach Primärantikörper entweder 5% Milchpulver, 4% BSA (Puffer A) oder eine kommerzielle Lösung ohne Säugetier-Proteine eingesetzt (Odyssey[®] Blocking Buffer, LI-COR). Puffer A wird mit 0,1% Tween-20 (v/v) gemischt (Puffer B). In dieser Lösung wird der Erstantikörper verdünnt und für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 8°C inkubiert. Anschließend wird viermal 5 min. mit Puffer B gewaschen. In den Puffer wird dann der Sekundärantikörper gegeben und für weitere 45-60 min. inkubiert. Zum Entfernen des Sekundärantikörpers wird viermal 5 min. mit TBS gewaschen.

Für ECL-Detektion werden die beiden Komponenten zu gleichen Teilen gemischt und so auf die Membran gegeben, dass diese vollständig benetzt ist. Nach 1 min. wird überschüssiges Reagenz durch Abfließen entfernt. Eine Klarsichtfolie (Kopierfolie) wird blasenfrei auf die Membran gelegt. In einem Lumineszenz-Imager (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein) wird die Chemilumineszenz mit einer CCD-Kamera dokumentiert.

Fluoreszenz-Detektion erfolgt mit dem Odyssey[®]Infrarot-Scanner (LI-

2 Material und Methoden

COR). Hierzu wird der Blot mit Lasern im nahen Infrarot-Bereich abgetastet. Die Auswertung erfolgt an der Gerätesoftware.

2.2.2.10 Entfernen von Antikörpern von Nitrozellulose-Membranen („Stripping“)

Nach einer Immundetektion kann der gebundene Primär- (und damit auch Sekundär-)antikörper wieder entfernt werden. Hierzu wird die Membran für 10 min. bei 50°C in Strip-Puffer äquilibriert: 2% SDS, Tris·HCl pH=7,0. Daraufhin werden 0,7% 2-Mercaptoethanol zugesetzt und für 20-60 min. bei 50°C geschüttelt. Die Lösung wird dann dekantiert und 2-Mercaptoethanol durch mehrmaliges Waschen (4-6-mal, jeweils 5 min.) mit TBS entfernt. Der Verlauf des Strippens kann in Gegenwart von Fluoreszenzantikörpern mit dem Imager verfolgt werden. Danach kann eine erneute Immundetektion mit anderen Antikörpern durchgeführt werden.

2.2.2.11 Anreicherung von Phosphoproteinen mit Affinitätschromatographie

Zur Anreicherung von Proteinen, die *in vitro*-phosphoryliert wurden, kommt eine Affinitätsmatrix zum Einsatz, die selektiv Phosphat-modifizierte Aminosäurereste bindet. Die genaue Beschaffenheit der eingesetzten Säulenmatrix und der Puffer aus dem *Phosphoprotein Purification Kit* (Qiagen) ist nicht bekannt. Mit Ausnahme der Pufferpräparation werden die Anweisungen des Herstellers befolgt. Insbesondere wird die Proteinlösung zunächst verdünnt ($0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) und die beladene Säule mit 6 ml Puffer ($\text{pH}\leq 7,0$) gewaschen. Die Elution gebundener Phosphoproteine kann kompetitiv mit hohen Phosphatkonzentrationen erfolgen ($5\times 500 \mu\text{l}$).

Elutionspuffer:

- 20 mM PO_4^{3-}
- 500 mM NaCl
- $\text{pH}\geq 7,3$

2.2.2.12 Massenspektrometrie

Die eindeutige Identifizierung von Proteinen und die Analyse post-translationaler Modifikationen wird von der Arbeitsgruppe Massenspektrometrie (Eberhard Krause), insbesondere von Clementine Klemm (derzeit ETH, Zürich), Heidemarie Lerch, Heike Stephanowitz und Michael Schümamm durchgeführt. Weitere Phosphorylierungsanalysen werden von Andreas Schlosser durchgeführt (Charité, Berlin, derzeit ZBSA, Freiburg).

Die Analyse erfolgt dabei in der Regel aus Proteinproben, die mit SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend Coomassie-gefärbt werden. Proteinbanden werden mit sauberen Skalpellenschnitten, mit Acetonitril/Ammoniumbicarbonat gewaschen und in Acetonitril geschrumpft. Nach Trocknung der Gelstücke werden Cystine mit DTT reduziert und mit Iodacetamid alkyliert. Die Proteine werden danach im Gel proteolytisch gespalten. Hierzu wird in der Regel Trypsin, falls erforderlich alternativ GluC (*Staphylococcus aureus*-Protease V8) oder AspN (Flavastacin) eingesetzt. Eluierte Peptide werden getrocknet und in wässrigem Puffer aufgenommen. Die Messung findet an einem Flüssigchromatographiegekoppelten Quadrupol-*Time of Flight*-Massenspektrometer statt, das im positiven-Ionen-Modus arbeitet. Die MS/MS-Spektren werden mit den theoretischen Fragmentionen-Massen verglichen.

Bei der Analyse durch Andreas Schlosser wird vor der SDS-PAGE reduziert und alkyliert (durchgeführt im Rahmen dieser Arbeit). Hierzu wird die Proteinprobe mit dem 1,25-fachen Volumen des Reduktionspuffers versetzt:

- 120 mM Tris-HCl
- 4,8 mM EDTA
- 2,4% (m/v) SDS
- 24% (v/v) Glycerin
- $\text{pH} \geq 6,8$
- 10 mM TCEP (3-[bis(2-carboxyethyl)phosphanyl]propansäure)

Innerhalb von 10 min. bei 95°C werden die Proteine denaturiert und reduziert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Probe 50 mM Iodacetamid zugesetzt und für 20 min. bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Die alkylierte Probe wird dann nach Versetzen mit

2 Material und Methoden

Bromphenolblau mit SDS-PAGE aufgetrennt. Die Phosphopeptide werden vor der LC-MS/MS an einer TiO₂-Matrix angereichert.

2.2.3 Methoden zur Untersuchung von Proteinfunktionen in vitro

2.2.3.1 Kinase-Assay

Zur Tyrosinphosphorylierung von Proteinen wird die gereinigte Fyn-Kinase aus Insektenzellen eingesetzt. Die Inkubation findet bei Temperaturen von 16-37°C statt. Das Kinase:Substrat-Verhältnis beträgt 2:1 bis 1:20, wobei die Fyn-Konzentration im niedrigen mikromolaren Bereich liegt. Genaue Parameter sind den jeweiligen Experimenten zu entnehmen. ATP wird stets im deutlichen Überschuss eingesetzt (Standard: 2 mM). Bei Inkubationen von mehr als 90 min. wird ATP zwischenzeitlich supplementiert. Als selektiver Src-Kinasen-Inhibitor dient PP2 (1-tert-butyl-3-(4-chlorophenyl)pyrazolo[4,5-e]pyrimidin-4-amin eingesetzt, AXXORA Deutschland GmbH, Lörrach).

Standard-Kinasepuffer:

- 50 mM Tris·HCl, pH=7,5
- 10 mM MgCl₂
- 0,5 mM EGTA
- 0,1 mM Natriumorthovanadat (Na₃VO₄)
- 150 mM NaCl
- 2 mM Dithiothreitol (DTT)

Die Komponenten ohne ATP werden auf Eis gemischt und anschließend im Thermoblock auf die gewünschte Temperatur äquilibriert. Zum Startzeitpunkt wird ATP zugesetzt und kurz gemischt (Vortexer) sowie sehr kurz zentrifugiert. Zu definierten Zeitpunkten wird ein Aliquot der Reaktion entnommen, mit dem halben Volumen 3xSDS-Probenpuffer gemischt und 5 min. auf 95°C erhitzt. Durch das enthaltene EDTA, sowie Denaturierung wird die Reaktion gestoppt. Die Tyrosinphosphorylierung wird nach SDS-PAGE und Transfer auf Nitrozellulosemembran mit anti-Phosphotyrosinantikörpern detektiert.

ATP-Verbrauchsassay Alternativ zur Analyse der Phosphorylierung durch Immundetektion wird ein Mikrotiterplatten-basierter Assay evaluiert, der die Reaktion indirekt über die Detektion der ATP-Konzentration verfolgt. Dieser Assay wurde von Sabine Geithner optimiert und nutzt einen abgewandelten Reaktionspuffer:

- 50 mM HEPES-KOH, pH=7,4
- 10 mM MnCl₂
- 0,5 mM EGTA
- 100 mM NaCl

Nach definierten Zeitpunkten werden je 5 μ l der Kinase-Verdünnung (1 μ M Endkonzentration) und Substrat-ATP-Lösung ([Substratprotein]=5 μ M, [ATP]=50 μ M) gemischt und bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Ende der Inkubation wird zeitgleich allen Proben 6 μ l Lumineszenz-Reagenz (Kinase-Glo[®] Plus, Promega GmbH, Mannheim) zugesetzt. Hierdurch wird die Phosphorylierungsreaktion gestoppt und die ATP-abhängige Chemilumineszenz nach einem proprietären Mechanismus ausgelöst. Die Detektion erfolgt mit einem Luminometer (GENios Pro, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz).

2.2.3.2 Lipidvesikel-Kosedimentation

Zur Untersuchung der Lipidbindungseigenschaften von Proteinen wird ein Lipid-Kosedimentationsassay eingesetzt. Für Vorversuche werden große multilamellare Vesikel eingesetzt (MLVs, Durchmesser 200–2000 nm). Zur Bestimmung von Affinitäten und zur Verminderung des Materialverbrauchs werden Bindungsversuche mit großen unilamellaren Vesikeln (*large unilamellar vesicles* - LUVs, Durchmesser 100-400 nm) durchgeführt.

Herstellung von Vesikeln Es werden Lipide von Echelon Biosciences Inc., Salt Lake City, USA (synthetische Phosphoinositide) oder von Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA (weitere Phosphoinositide und sonstige Lipide) eingesetzt. Die Lipide liegen gelöst in Chloroform, bei stärker geladenen Lipiden auch mit Methanol und Wasser vor. Die Lipide werden kalt mit einer Direktverdrängerpipette oder einer

2 Material und Methoden

Hamilton-Spritze abgemessen und in einem Reagenzglas gemischt. Die Lösungsmittel werden im Stickstoff-Strom verdampft und / oder für 1 h in einem Rotationsverdampfer getrocknet. Bei größeren Volumina wird ein Ultrahochvakuum über Nacht angelegt. Multilamellare Vesikel werden durch Triturieren mit wässrigen Puffern hergestellt. MLV-Puffer:

- 10 mM 3-Morpholinopropan-1-sulfonsäure (MOPS)
- 100 mM NaCl
- pH=7,2

Zur Erhöhung der Dichte von LUVs wird unter Erhaltung der Osmolarität Saccharose statt NaCl eingesetzt (LUV-Puffer):

- 10 mM MOPS
- 176 mM Saccharose
- pH=7,2

MLVs werden sofort zu LUVs weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert. Wenn eine Integration kleiner Moleküle in das Lumen der Vesikel gewünscht ist, werden die Vesikel in fünf Zyklen schockgefroren (N₂(l)) und aufgetaut (Raumtemperatur Wasserbad).

Zur Herstellung von LUVs werden MLV-Suspensionen mit einem Hand-Extruder (Avanti) 24x durch eine 100 nm-Filtermembranen gepresst. Die resultierende Größenverteilung kann exemplarisch durch Lichtstreuung überprüft werden. Der Median liegt bei 110 nm. Sofern die Transitionstemperatur der Lipidmischung oberhalb der Raumtemperatur liegt, wird der Extruder auf einem Heizblock entsprechend erwärmt. Die Vesikel werden sedimentiert (1 h, 90.000g_{max}, 8°C) und der Überstand verworfen. LUVs werden mit MLV-Puffer auf die gewünschte Konzentration verdünnt, wobei der Volumenverlust aus der Extrusion berücksichtigt wird.

Sedimentationsassay Vesikelsuspensionen werden mit einer Proteinlösung und MLV-Puffer gemischt und 30 min. bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Vesikel und lipidgebundene Proteine werden durch Zentrifugation abgetrennt (MLVs: 10 min., 16.000g_{max}, LUVs: 1 h, 90.000g_{max}, 8°C oder über Transitionstemperatur). Der Überstand wird in Protein-LoBind-Gefäßen (Eppendorf AG, Hamburg) übergeführt. Zur Analyse der Proteinkonzentrationen in der gebundenen und

ungebundenen Proteinfraction werden Aliquots mit SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Die ungebundene Fraktion aus LUV-Sedimentationen wird zur genaueren Bestimmung durch Messung der Tryptophan-Fluoreszenz ($\lambda_{ex}=280$, $\lambda_{em}=350$) analysiert.

2.2.4 NMR

Zur Aufnahme von $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren werden Proteine in definiertem Minimalmedium mit ^{15}N H_4Cl exprimiert (durchgeführt von Katharina Thiemke). Die Proben sind in Phosphatpuffern mit niedrigem Salzgehalt gelöst und werden mit 10% D_2O versetzt. Der pH-Wert wird mit einer pH-Elektrode kontrolliert. Die Rohdaten werden mit XWINNMR prozessiert und mit Sparky 3 (Goddard & Kneller, 2001) visualisiert und ausgewertet.

Für Titrationsexperimente werden charakteristische und zugeordnete Resonanzen im zweidimensionalen Spektrum ausgewählt und deren Position in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration verfolgt. Aus Positionsveränderung wird ein Verschiebungsindex wie folgt abgeleitet:

$$\text{Verschiebungsindex} = \sqrt{\Delta^2\omega_{^{15}\text{N}} + 0,1\Delta^2\omega_{^1\text{H}}}$$

Die Verschiebungen entlang der ^1H -Achse wird gemäß dem gyromagnetischen Verhältnis von ^{15}N -Kernen und Protonen mit einem empirischen Korrekturfaktor von 0,1 multipliziert (Smith *et al.*, 1991).

2.2.5 Zellkulturmethoden

Alle eingesetzten Lösungen und Verbrauchsmaterialien sind steril. Dies wird entweder durch Autoklavieren für 15 min. bei 2 bar und 120°C oder durch Sterilfiltration ($0,2\ \mu\text{m}$ Porengröße) erreicht. Einweg-Plastikmaterial ist vom Hersteller durch hochenergetische Strahlung oder andere geeignete Methoden sterilisiert worden. Die Versuche werden an einer Sterilwerkbank unter Einhaltung der üblichen Regeln zum sterilen Arbeiten durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.2.5.1 Jurkat-Zellkultur

Die Jurkat-T-Zelllinie stammt aus dem Jahr 1976 von einem Patienten, der an akuter lymphoblastischer Leukämie erkrankt war. Ein Klon wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig bezogen (DSMZ, Nr. ACC282). Für Adhäsions-Assays und teilweise auch zur Lysat-Gewinnung wird der Subklon E6-1 eingesetzt (zur Verfügung gestellt von Stefanie Kliche, Arbeitsgruppe Burkhardt Schraven, Magdeburg). Für Migrationsassays ist der Subklon Kab14 einzusetzen (Quelle wie E6-1). Über die zellulären Unterschiede der Subklone liegen keine detaillierten Daten vor.

Die Kultivierung findet in RPMI1640-Medium mit $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaHCO_3 statt (Cambrex Corporation, New Jersey, USA, Nr. 12-167) mit zuge-setztem Glutamin (2 mM als Ala-Gln-Dipeptid) oder als Fertigmedium mit acetyliertem Ala-Gln (Biochrom AG, Berlin, Nr. FG1415 „very low endotoxin“). Es wird mit fötalem Kälberserum (FBS) supplementiert (9%, Biochrom, ohne Hitzebehandlung). Nur bei vermuteter bakterieller Kontamination wird Penicillin/Streptomycin zugesetzt (siehe 2.2.2.2, S. 67). Die Inkubation findet in einem Brutschrank bei 37°C und einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO_2 statt.

Zellen, die in $\text{N}_2(\text{l})$ gelagert wurden, werden zügig bei 37°C aufgetaut, dreimal mit Medium gewaschen (5 min., $500 \text{ g}_{\text{max}}$, Raumtemperatur), gezählt und mit einer Zieldichte von $0,12 \cdot 10^6 / \text{ml}$ (E6-1) oder $0,18 \cdot 10^6 / \text{ml}$ (Kab14) kultiviert. Diese Dichte wird täglich durch Verdünnen mit Medium wiederhergestellt. Während der Standardkultivierung wird eine Dichte von $0,02$ - $0,30 \cdot 10^6 / \text{ml}$ aufrecht erhalten. Um hohe Zellausbeuten zu erhalten wird eine finale Dichte von maximal $0,6 \cdot 10^6 / \text{ml}$ zugelassen. Das Zählen der Zellen erfolgt in einer *improved* Neubauer-Zählkammer (LO-Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf) durch Zählen von 4 Großquadraten. Die Zellen werden dazu zuvor mit 0,18% Trypanblau für 5 min. inkubiert, um tote Zellen zu identifizieren. Die typische Vitalität ist 95-100%, die Generationszeit ist ≤ 24 h.

Zum Einfrieren von Zellvorräten werden Zellen pelletiert und 10^7 -Aliquots in 1 ml FBS mit 10% DMSO resuspendiert. In einem Vial-Halter, der 2-Propanol-enthält werden die Aliquots platziert und bei -80°C Umgebungstemperatur mit einer Abkühlrate von 1 K/ min. eingefroren.

Zur dauerhaften Lagerung werden die Aliquots in einen N₂(l)-Tank überführt.

Mykoplasmen-Detektion und -Behandlung Zur Detektion von parasitären Bakterien der Gattung *Mycoplasma* wird das Kulturmedium einer analytischen PCR unterzogen. Hierzu werden Oligonukleotide, sowie DNA für die Positiv- und Negativkontrolle dem Venor[®]GeM-Mykoplasmen-Detektionskit (Minerva Biolabs GmbH, Berlin) entnommen. Die Durchführung orientiert sich an den Vorgaben des Herstellers. Bei Nachweis von Mykoplasmen, werden die Kulturen mit der Antibiotika-Kombination BM-Cyclin (Roche Applied Science, Mannheim) behandelt. Hierzu werden BM-Cyclin 1 (10 mg·l⁻¹) für vier Tage und BM-Cyclin 2 (5 mg·l⁻¹) für drei Tage im Wechsel über zwei Wochen angewendet. Der Erfolg der Behandlung wird mit der PCR-basierten Detektion überprüft.

2.2.5.2 Jurkat-Transfektion

Plasmid-DNA wird durch Elektroporation in Jurkat-Zellen eingebracht. Protokolle auf der Grundlage des Amaxa-Nucleofector-Systems (Amaxa AG, Köln) oder unter Einsatz des Bio-Rad *Gene Pulser Xcell*[™]-Elektroporators kommen zum Einsatz.

Transfektion mit Bio-Rad-Elektroporator 20·10⁶ Zellen pro Transfektion werden pelletiert. 25 ml des Überstands werden für die spätere Kultivierung in eine neue Kulturflasche vorgelegt und mit 25 ml frischem Medium gemischt. Pelletierte Zellen werden mit PBS-CM (PBS mit 0,1 g·l⁻¹ CaCl₂ und 0,1 g·l⁻¹ MgCl₂, Biochrom L1815) gewaschen und in 350 µl PBS-CM pro Transfektion resuspendiert. 350 µl Suspension werden in eine Elektroporationsküvette (4 mm Spaltbreite, BTX-Harvard Apparatus, Inc. Holliston, USA) übergeführt und mit 30 µg DNA versetzt. Nach dem Mischen und Entfernen von Luftblasen wird ein Impuls mit 230 V und 950 µF ausgelöst (Schaltkreis mit hoher Kapazität). 1 ml warmes Medium wird hinzugegeben und der DNA-Schleim mit einer sterilen Einmalpipette entfernt. Die Zellen werden quantitativ in das vorbereitete Medium transferiert und vor der Analyse für 24 h inkubiert.

2 Material und Methoden

Transfektion mit Amaxa-Elektroporator Die elektrischen Pulsparameter und Rezepte des Amaxa-Nukleofektions-Systems sind nicht öffentlich zugänglich. Die Durchführung orientiert sich an den Vorgaben der Amaxa AG, modifiziert für eine erhöhte Zellzahl:

$12 \cdot 10^6$ Zellen werden pelletiert. 12,5 ml des Überstands werden mit dem gleichen Volumen frischen Mediums gemischt für die spätere Kultivierung. Das Zellpellet wird in 100-200 μ l supplementierter Amaxa Solution V pro Transfektion suspendiert. 20 μ g DNA (nach Amaxa-Angaben 1-3 μ g) werden mit den Zellen gemischt und in die Amaxa-Küvette übergeführt. Zur Elektroporation wird das Programm T14 oder S18 eingesetzt. Anschließend werden die Zellen mit einer sterilen Einmalpipette in das vorgelegte Medium transferiert und für 24 h inkubiert.

2.2.5.3 Durchflusszytometrie

Die Transfektionsrate und Vitalität von Jurkat-Zellen kann mit Durchflusszytometrie überprüft werden. Hierzu wird ein Aliquot der Zellen mit PBS gewaschen. Anhand der starken seitlichen Streuung werden tote Zellen identifiziert. Der Anteil der lebenden Zellen mit deutlichem GFP-Fluoreszenzsignal dient als Maß für die Transfektionseffizienz.

2.2.5.4 Mikroinjektion und Fluoreszenzmikroskopie

Zum Transfer von rekombinanten Proteinen in Zellen werden HeLa S3-Zellen (Arbeitsgruppe Vinkemeier) auf poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen bis zur 75%igen Konfluenz kultiviert. Das Protein wird auf eine Konzentration von $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ verdünnt mit Mikroinjektionspuffer:

- 20 mM Hepes
- 110 mM Kaliumacetat
- 0,5 mM EDTA
- 5 mM DTT
- pH=7,5

Der Lösung wird $1/9$ des Volumens TRITC-BSA^[1] zugesetzt (Endkonzentration $20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation entfernt (15 min., $16.000g_{\text{max}}$, 4°C). Die Lösung wird in eine

^[1]Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat-markiertes bovines Serumalbumin, Sigma

2.2 Methoden

Kapillare eines Mikroinjektors (Transjector 5246, Eppendorf) gefüllt. Ca. 30 Zellen wird Proteinlösung mit einem Druck von 40-70 Pa für ≤ 1 s injiziert. Nach der Inkubation im Brutschrank für 1 h werden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wird mit Formaldehyd-Lösung (4% in PBS) für ≥ 15 min. bei 4°C im Dunklen fixiert. Nuclei werden mit Hoechst 33258-Farbstoff markiert ($5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Die Zellen werden dreimal mit PBS und einmal mit Wasser gewaschen, anschließend werden die Zellen mit Dako-Fluoreszenz-Mounting-Medium (Dako A/S, Glostrup, Dänemark) für die Mikroskopie vorbereitet. Die Zellen werden mit einem konventionellen Fluoreszenz-Mikroskop (Axioplan 2, Carl Zeiss AG, Oberkochen) betrachtet und fotografisch dokumentiert.

3 Ergebnisse

3.1 Phosphorylierung

Im Mittelpunkt der biochemischen Charakterisierung des Proteins ADAP stand die Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung. Die Zahl der theoretisch vorhergesagten Phosphorylierungsstellen geht deutlich über die drei identifizierten hinaus (Geng *et al.*, 1999; Raab *et al.*, 1999). Ein Vergleich der Vorhersagewerte mit verschiedenen Algorithmen und Betrachtungsgruppen findet sich in Abb. 3.1. Die Möglichkeit der *in vitro*-Phosphorylierung mit rekombinanter, gereinigter Kinase und Substraten wurde erkundet, um eine detaillierte Analyse der modifizierten Aminosäuren per Massenspektrometrie durchzuführen. Das Bindungsverhalten von ADAP und die Regulation der eingesetzten Kinase motivierten zudem eine nähere Betrachtung der zugrunde liegenden Kinetik der Phosphorylierung. Hierbei wurde auch auf ein mögliches Wechselspiel zwischen Phosphorylierung und Lipidbindung eingegangen. Schließlich wurden Vorbereitungen getroffen, die Bedeutung der Tyrosinphosphorylierung für die Funktion des Adapters zu untersuchen.

3.1.1 In vitro-Phosphorylierungssystem

3.1.1.1 Kinase-Präparation

Zur Herstellung einer aktiven Kinase wurde ein Baculovirus-basiertes Expressionssystem in *Sf9*-Zellen eingesetzt (siehe 2.2.2.2, S. 67). Zur Feststellung von Reinheit, Stabilität und Aktivität wurde Protein aus insgesamt vier Expressionen aufgereinigt, von denen drei Präparationen eingesetzt wurden. Die Chargen wurden mit Ganzzelllysaten von Jurkat-T-Zellen, Enolase als Phosphotyrosin-Standardsubstrat oder gereinigtem ADAP(486-768) auf Aktivität überprüft. Exemplarisch ist in Abb. 3.2

3 Ergebnisse

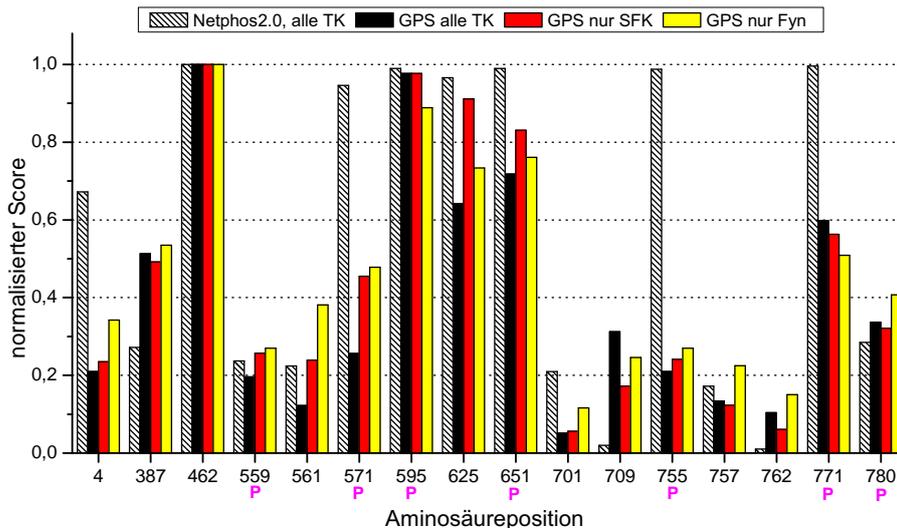


Abbildung 3.1: **Vergleich der Vorhersagewerte verschiedener Algorithmen für Tyrosinreste in ADAP.** Für jede Tyrosin-Position wurden die normalisierten Scores aus den Algorithmen NetPhos2.0 (schraffiert) oder GPS aufgetragen. Für GPS wurden die Gruppe aller Tyrosinkinassen („alle TK“, schwarz), aller Src-Familien-Kinasen („alle SFK“, rot) oder nur für Fyn (gelb) betrachtet. Normiert wurde am höchsten Wert (Tyr⁴⁶² für alle Algorithmen). „P“ markiert Tyrosine, die im Rahmen dieser Arbeit als phosphoryliert identifiziert wurden. (siehe 3.1.3.1)

eine entsprechende Detektion der Phosphorylierung nach Inkubation mit verschiedenen Fyn-Präparationen gezeigt. Eine Phosphorylierung von Fyn war nach Reinigung aus Sf9-Zellen nicht detektierbar bei den eingesetzten Mengen (Spur 1 und 2). Auch das Substrat ADAP(486-768) war vor der Inkubation mit Fyn nicht phosphoryliert (Spur 3). In Anwesenheit von Kinase, Substrat, ATP und dem Src-Kinaseninhibitor PP2 (10 μ M) wurde hier noch eine Kinaseaktivität festgestellt. Dies kann auf die hohe Substrat- und Kinasekonzentration zurückzuführen sein (2,5 bzw. 1,2 μ M). Beide Fyn-Präparation behielten bei 4°C ihre Aktivität und zeigen eine konzentrationsabhängige Geschwindigkeit der Phosphorylierung (Unterschied 4 oder 40 μ l - Spuren 6 und 7, bzw. 1 oder 10 μ l- Spuren 10 und 11). Auch eine zwischenzeitliche Lagerung bei -20°C verminderte die Aktivität nicht sehr stark (Spuren 8 und 9).

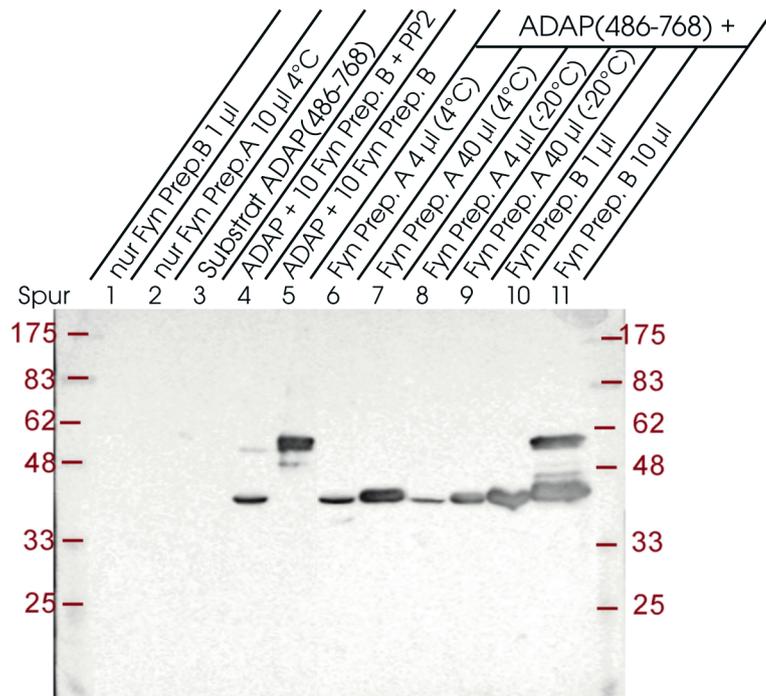


Abbildung 3.2: **Tyrosinphosphorylierung verschiedener Substrate durch verschiedene Fyn-Präparationen.** Immundetektion mit Antiphosphotyrosin-Antikörpern. Angegeben sind: eingesetzte Fyn-Menge in μl , Lagertemperatur der Kinase und Einsatz eines Inhibitors (PP2, $10 \mu\text{M}$). Phosphorylierungsreaktion bei 30°C für 15 min. Fyn:Substratverhältnisse=1:2 oder 1:20.

3.1.1.2 Vorversuche

Die bekannten und Phosphorylierungsstellen von ADAP liegen in der Linker-Region (As. 580-688, siehe 1.2.1.3 auf S. 22 und 3.1 auf S. 88). Um die Möglichkeit einer Phosphorylierung in den SH3-ähnlichen Domänen zu untersuchen, wurde diese mit Fyn inkubiert und mit der Phosphorylierung des Konstrukts verglichen, das mit der hSH3^N-Domäne beginnt und nach der hSH3^C-Domäne endet. Dieses Konstrukt (As. 486-768, erwartetes Molekulargewicht von 33323 Da) beinhaltet zwölf von 16 Tyrosinen des Gesamtproteins.

Abb. 3.3 zeigt ein typisches Ergebnis der Phosphotyrosindetektion nach Inkubation von ADAP-Fragmenten mit Fyn in Gegenwart von ATP und Mg^{2+} . ADAP(486-768) wurde in einen Phosphatpuffer inkubiert,

3 Ergebnisse

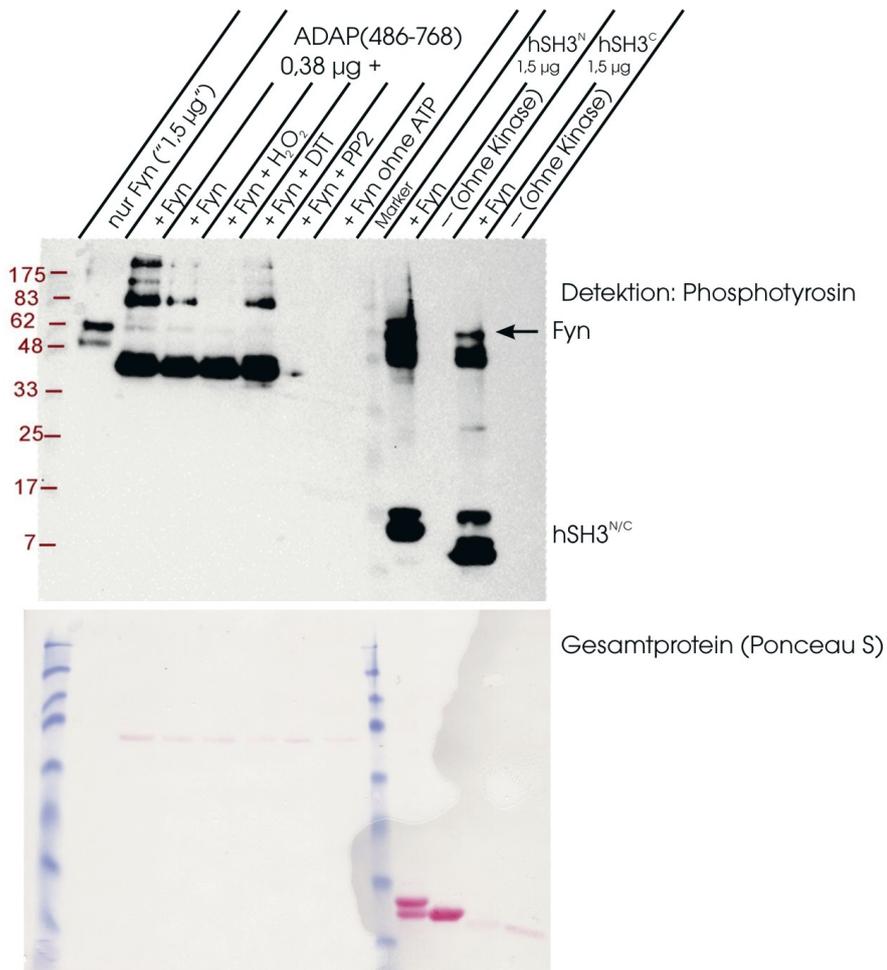


Abbildung 3.3: **Tyrosinphosphorylierung von ADAP-Fragmenten durch Fyn.** *Oben:* Immundetektion von Phosphotyrosin nach Inkubation mit Fyn (11,5 h bei 32°C, Fyn-Substrat-Verhältnis 1:50 (1:25 für hSH3^N und hSH3^C), SDS-PAGE und Western Blotting. *Unten:* Derselbe Blot, Gesamtprotein gefärbt mit Ponceau S vor Immundetektion

während hSH3^N und hSH3^C in Kinasepuffer inkubiert wurden (siehe 2.2.3.1, S. 78). Fyn phosphorylierte sich selbst, wenn kein geeignetes Substrat vorhanden ist. In Gegenwart von ADAP(486-768) fand Autophosphorylierung kaum statt. Das Substrat (0,38 μ g Auftragung) hingegen zeigte ein starkes Signal. Die Zugabe von DTT als Reduktionsmittel oder H₂O₂ (je 2,5 mM) als Oxidationsmittel zeigte keine Auswirkungen auf die Phosphorylierungen, mit der Ausnahme, dass keine Signale bei ca. 80 kDa auftraten. Dies könnte daraufhin deuten, dass die Reduktion der Probe im Probenpuffer ohne zusätzliches DTT nicht vollständig war und Oligomere des Substrats sichtbar vorhanden waren. Der Src-Familien-spezifische Kinaseinhibitor PP2 (36 μ M) führte zu einer kompletten Verhinderung der Phosphorylierung. Als Kontrolle wurde ATP weggelassen und auch hier war kein Phosphorylierungssignal erkennbar. Das Substrat war somit vor Beginn der Phosphorylierungsreaktion nicht phosphoryliert (unter der Annahme, dass keine Phosphatase zugegen war). Auch die Kinase war offenbar zumindest nicht stark phosphoryliert vor der Inkubation.

Da die Domänen in Vorversuchen ein deutlich schwächeres Phosphorylierungssignal gezeigt hatten, wurden in diesem Experiment größere Mengen eingesetzt und aufgetragen (1,5 μ g). Die erwarteten Molekulargewichte sind 12144 Da (¹⁵N-hSH3^N) bzw. 12024 Da (¹⁵N-hSH3^C). Durch die lange Inkubation und das veränderte Enzym-Substrat-Verhältnis (1:25) war auch hier eine starke Phosphorylierung erkennbar. Auch die Kinase selbst wurde hier deutlich phosphoryliert. Die Domänen scheinen somit kein optimales Substrat für Fyn zu sein. Die aufgetragenen Mengen von hSH3^N und hSH3^C unterschieden sich in der Ponceaufärbung deutlich. Dies könnte auf einen Fehler bei der Proteinkonzentrationsbestimmung hindeuten. Trotz der geringeren Menge von hSH3^C war das Phosphorylierungssignal jedoch stark. Ohne Fyn trat jeweils keine Phosphorylierung auf. Auffällig war nach Phosphorylierung das Auftreten einer Bande von hSH3^N oberhalb des unphosphorylierten Proteins. Eine grobe Abschätzung deutete auf einen überwiegenden Verschiebung zu dieser Bande mit höherem apparenten Molekulargewicht. Hierbei handelte sich offenbar um eine mehrfach phosphorylierte Spezies, da auch ein starkes Phosphorylierungssignal für die untere Bande detektiert wurde. Bei hSH3^C ist kein solcher Shift

3 Ergebnisse

im Gesamtprotein erkennbar gewesen. Die Immundetektion hingegen ließ auch hier das Vorhandensein mehrerer Phosphorylierungsspezies vermuten. Außerdem fanden sich für keine der Proteine Degradationsbanden, was für eine hohe Stabilität angesichts der langen Inkubation bei recht hoher Temperatur spricht.

3.1.1.3 Optimierung

Um die Bedingungen der Phosphorylierung einzugrenzen, insbesondere um eine möglichst schnelle Reaktion bei geringem Kinase-Verbrauch zu erhalten, wurden die zeitlichen Verläufe der Reaktion beobachtet. Hierzu wurden zu bestimmten Zeitpunkten Aliquots der Reaktion entnommen und in dreifach konzentriertem Probenpuffer gestoppt. Das darin enthaltene EDTA komplexiert den notwendigen Kofaktor Mg^{2+} . Für hSH3^N war kein Phosphorylierungssignal detektierbar (Abb. 3.4). Dies war nicht auf eine inaktive Kinase zurückzuführen, da die Autophosphorylierung stattfand. Vielmehr waren die eingesetzten Mengen und der Inkubationszeitraum (maximal 60 min.) geringer als in 3.3. Dadurch kann die Detektionsgrenze unterschritten worden sein. In der Ponceau-Färbung war eine deutliche Bande bei erwarteter Höhe sichtbar (nicht gezeigt). hSH3^C wurde deutlich phosphoryliert, wobei zu beachten ist, dass die Zeitpunkte anders gewählt wurden als bei hSH3^N. Bei einem fünffachen Substratüberschuss war aber bereits nach 20 Minuten ein deutliches Signal erkennbar. Die Autophosphorylierung ist auch hier signifikant.

ADAP(486-768) hingegen war das bessere Substrat und ließ die Autophosphorylierung dem Anschein nach nicht zu. Auch bei fünfzigfachem Substratüberschuss war nach 10 min. ein Phosphosignal vorhanden. In der Spur, in der die Reaktion mit PP2 aufgetragen wurde (Verhältnis 1:5, 120 min.), tauchte ein vergleichbares Signal auf wie nach 10 min. (Verhältnis 1:50). Möglicherweise war dies aber auch auf ein Überlaufen bei der Auftragung zurückzuführen.

3.1 Phosphorylierung

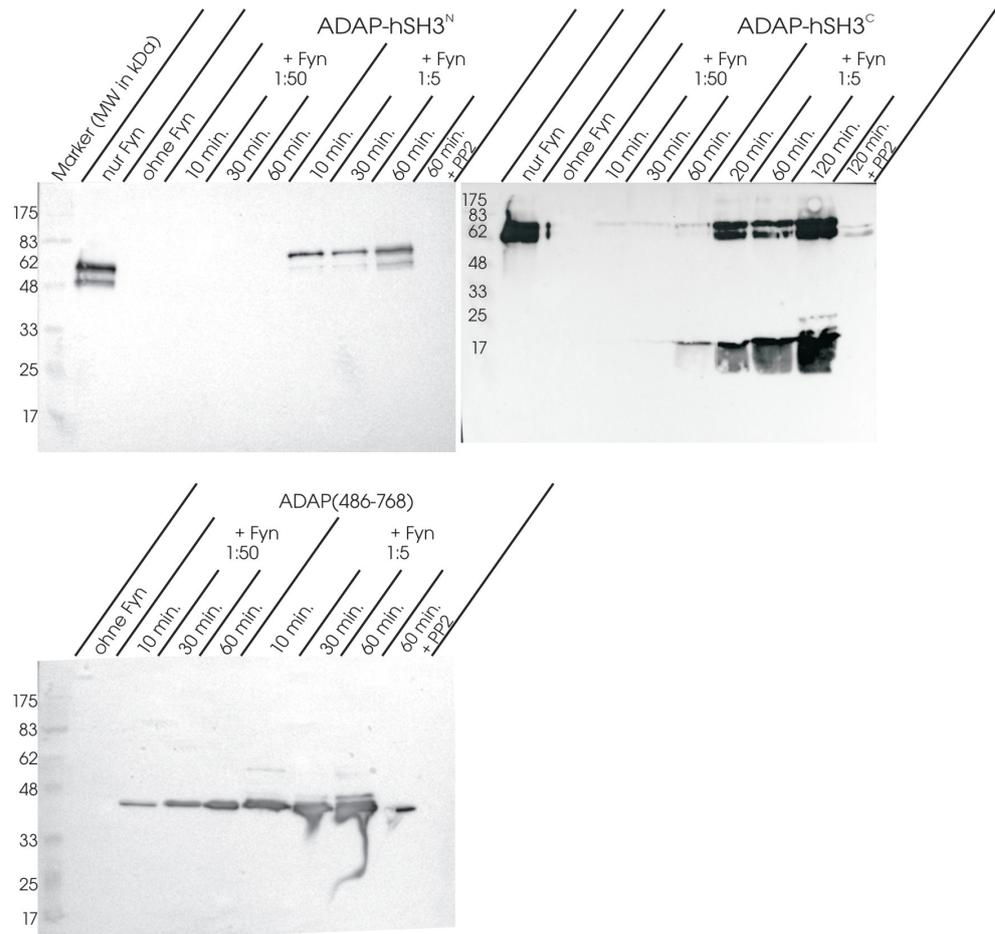


Abbildung 3.4: **Tyrosinphosphorylierung von ADAP-Fragmenten durch Fyn.** Immundetektion von Phosphotyrosin nach Inkubation mit Fyn mit Substrat-Verhältnissen 1:50 und 1:5 für die angegebenen Zeiten.

3.1.1.4 Anreicherung von Phosphoproteinen

Die *in vitro*-Phosphorylierungsreaktionen konnten aus Gründen der Proteinstabilität nicht grundsätzlich bis zur vollständigen Phosphorylierung durchgeführt werden. Insbesondere bei der Phosphorylierung der Domänen blieb nach Abschätzung des Signals aus der Immundetektion ein erheblicher Anteil des Substrats unphosphoryliert. Eine Quantifizierung dieser nicht phosphorylierten Fraktion konnte im Rahmen dieser Experimente nicht durchgeführt werden. Für Folgeexperimente mit phosphorylierten Proteinen, wie dem NMR-Fingerprint oder Lipidbindungsassays musste daher die Anreicherung von Phos-

3 Ergebnisse

phoproteinen durchgeführt werden. Hierzu wurde ein kommerziell erhältliches Säulenmaterial eingesetzt (*Phosphoprotein Purification Kit*, Qiagen), das eine hohe Affinität gegenüber phosphorylierten Aminosäuren besitzt. Die genaue Beschaffenheit des Säulenmaterials ist nicht bekannt. Die Elution erfolgte dann mit hohen Phosphatkonzentrationen (s. 2.2.2.11). Abb. 3.5 zeigt exemplarisch eine Anreicherung von phosphoryliertem ADAP(486-768) nach Phosphorylierung mit Fyn-Kinase *in vitro*. Phosphoprotein fand sich hier nicht in Durchlauf oder Waschfraktion. In anderen Experimenten wurde mit dem Waschen der Säule auch phosphoryliertes Protein entfernt, was eine insgesamt schwache Proteinbindung suggeriert. In diesem Fall wurde unphosphoryliertes Protein in der Waschfraktion gefunden. In den Eluaten sind deutliche Signale zu erkennen. Das geringe anti-ADAP-Signal in den Eluaten 3 und 4 kann auf die geringe Menge des verbleibenden Proteins nach der Stripping-Prozedur zurückgeführt werden. Da die Immundetektion nur die Anwesenheit von phosphoryliertem aber nicht die Abwesenheit von unphosphoryliertem Protein nachweist, konnte hier noch keine Aussage über die Verhältnisse der beiden Spezies gemacht werden. Bei der massenspektrometrischen Untersuchung von pTyr-hSH3^C (3.1.3.1) wurden jedoch keine Signale für das korrespondierende unphosphorylierte Peptid gefunden. Daher wird der Anteil des nicht-phosphorylierten Proteins auf unter 10% geschätzt.

3.1.2 Strukturelle Änderungen in phospho-hSH3^C

Die Detektion der Phosphorylierung der isolierten Domäne hSH3^C per Immundetektion führte zur Frage, ob die Struktur der Domäne dadurch beeinflusst wird. Die Struktur der unphosphorylierten Domäne war von Mitgliedern des Labors bereits mittels NMR aufgeklärt worden (Heuer *et al.*, 2004). Daher war die Möglichkeit gegeben, Unterschiede zwischen unphosphorylierter und phosphorylierter Form in Fingerprint-Spektren (¹H¹⁵N-HSQC) zu detektieren und einzelnen Aminosäuren zuzuordnen. Die direkte Ursache einer Peak-Verschiebung ist hierbei nicht notwendigerweise die Phosphorylierung der zugehörigen Aminosäure. Vielmehr können alle größeren Veränderungen in der dreidimensionalen Struktur des Peptidrückgrats Verschiebungen der Peaks auslösen. Somit sind auch indirekte Effekte zugänglich.

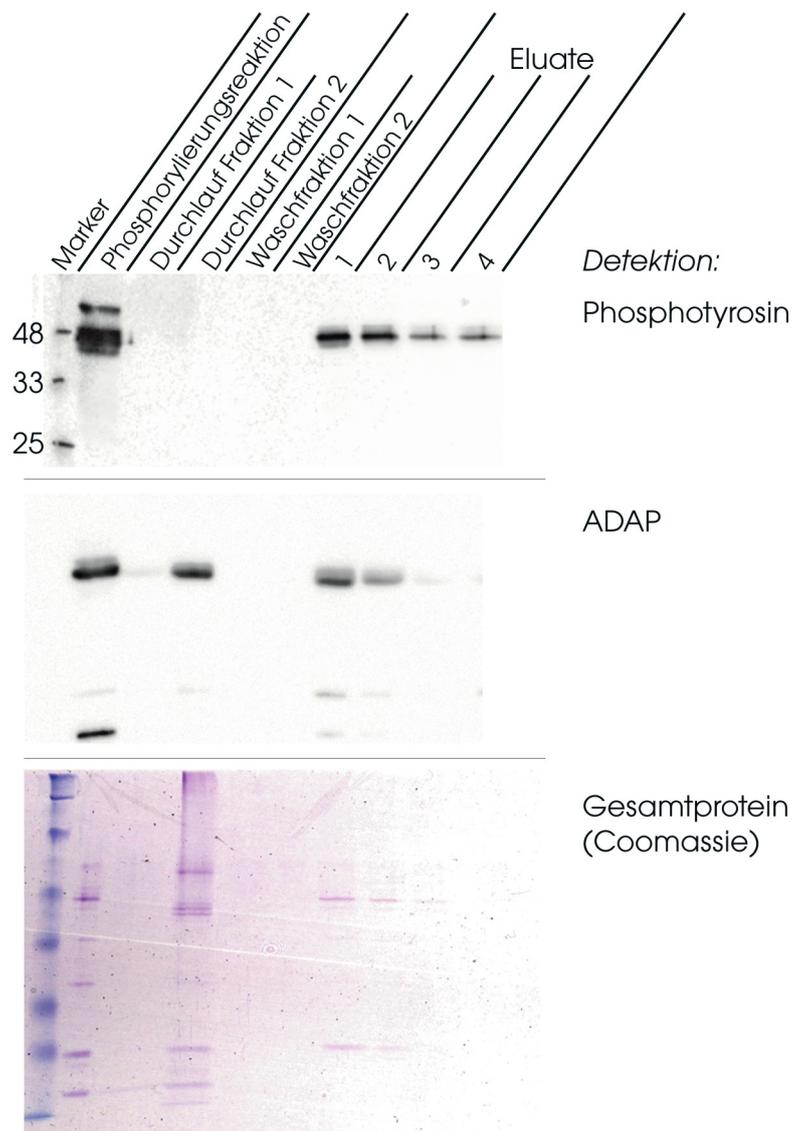


Abbildung 3.5: **Anreicherung von phosphoryliertem ADAP(486-768) mit Affinitätschromatographie.** Immundetektion von Phosphotyrosin (oben) oder Gesamt-ADAP (Mitte) verschiedener Fraktionen aus der Phosphoprotein-Anreicherung (je 10 μ l). Unten: Coomassie gefärbtes PA-Gel.

3 Ergebnisse

Für die Messung wurden drei Ansätze bei 31°C inkubiert: 450 μl ^{15}N -markiertes hSH3^C (200 μM) mit Fyn im molaren Verhältnis 1:20 (Kina-se:Substrat) und hSH3^C ohne Fyn (Proben 1 und 2). Diese wurden ohne weitere Behandlung im Spektrometer gemessen. Der dritte Ansatz von 2,4 mg hSH3^C wurde nach Inkubation per Affinitätschromatographie (s. 2.2.2.11) angereichert und anschließend konzentriert (Probe 3). Außerdem wurde auch ein Spektrum einer Probe aufgenommen, die nicht bei 31°C inkubiert worden war (Probe 4). Die Spektren der Proben 1 und 2 (nicht gezeigt) waren von geringer Qualität, da Glycerin in den Proben das Signal/Rausch-Verhältnis stark verschlechterte. Zudem konnten keine signifikanten Veränderungen der Spektren beobachtet werden.

Der Anteil von Phosphoprotein in Probe 3 und die insgesamt höhere Proteinkonzentration ohne störendes Glycerin in der Probe 4 führte zu einer deutlichen Verbesserung der Signalintensität (s. Abb. 3.6 A). Das Spektrum von Probe 4 (unphosphoryliert) konnte innerhalb von 20 min. aufgenommen werden, Probe 3 wurde über Nacht gemessen, da dort die Proteinkonzentration trotz der hohen Menge im Phosphorylierungsansatz niedrig war. Der Großteil des Proteins passierte die Affinitäts-säule ohne zu binden. Dies ist vermutlich nicht auf eine unvollständige Phosphorylierung zurückzuführen, da die extremen Inkubationsbedingungen zu einer starken Phosphorylierung geführt haben (Immundecktion der Anreicherungsfraktionen hier nicht gezeigt). Vielmehr ist die Säulenkapazität bei der Anreicherung offenbar überschritten worden. Aufgrund der unbekanntens Zusammensetzung des Elutionspuffers aus dem Anreicherungs-Kit waren Verschiebungen von Peaks aufgrund von Pufferbedingungen nicht vollkommen auszuschließen. Die pH-Werte waren sehr ähnlich (pH=7,2 unphosphoryliert, pH=7,4 phosphoryliert) und die Spektren wurden so überlagert, dass die meisten Peaks übereinander liegen. Es ergab sich keine weitere Möglichkeit einer sinnvollen Überlagerung, sodass die abgebildete Variante mit hoher Wahrscheinlichkeit die tatsächlichen Verschiebungen widerspiegelt. Auch Proben 3 und 4 waren offenbar in ihrer grundsätzlichen Faltung und den meisten Anordnungen im Peptid-Rückgrat identisch. Anders als bei Probe 1 waren aber deutliche Abweichungen bei einzelnen Peaks augenfällig (Shift \geq 0,1). Arg²⁴, Lys⁴⁸, Gln⁴⁶ und Tyr⁸⁹-Resonanzen

waren verschoben. Zudem wurden Verschiebungen der Seitenketten-Resonanzen von Gln⁴⁶ beobachtet. Tyr¹⁹ (Tyr⁷⁰¹ im Gesamtprotein) und Tyr⁸⁰ (Tyr⁷⁶²) konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Beide zeigen aber keine starke Verschiebung. Zudem ist die Veränderung der Resonanzen von Thr³⁶ oder Tyr⁷³ (Tyr⁷⁵⁵) so groß, dass die Zuordnung nicht zweifelsfrei möglich ist (siehe unterbrochene grüne Markierungen in Abb. 3.6). Da der Tyrosinrest möglicherweise phosphoryliert vorliegt, ist hierdurch jedoch eine große Verschiebung zu erwarten. Daher erscheint die gewählte Zuordnung plausibel. Die Auflistung aller eindeutig zuzuordnenden Peaks mit den gewichteten geometrischen Verschiebungen findet sich in Abb. 3.7. Zur Definition des Indexes siehe 2.2.4. Hierbei ist zu beachten, dass die Verschiebungen entlang der ¹H-Achse mit 10 multipliziert werden. Diese Korrektur ist empirisch begründet und wird von den gyromagnetischen Verhältnissen der beiden Atomkerne abgeleitet. Es trägt der Beobachtung Rechnung, dass der relative Bereich über den sich die chemischen Verschiebungen erstrecken auf der Protonen-Achse deutlich kleiner als auf der ¹⁵N-Achse ist. Trotzdem führen leichte Veränderungen auf der ¹⁵N-Achse zu größeren Änderungen des Verschiebungsindexes.

Unterschiede der chemischen Verschiebung $hSH3^C \leftrightarrow pTyr-hSH3^C$

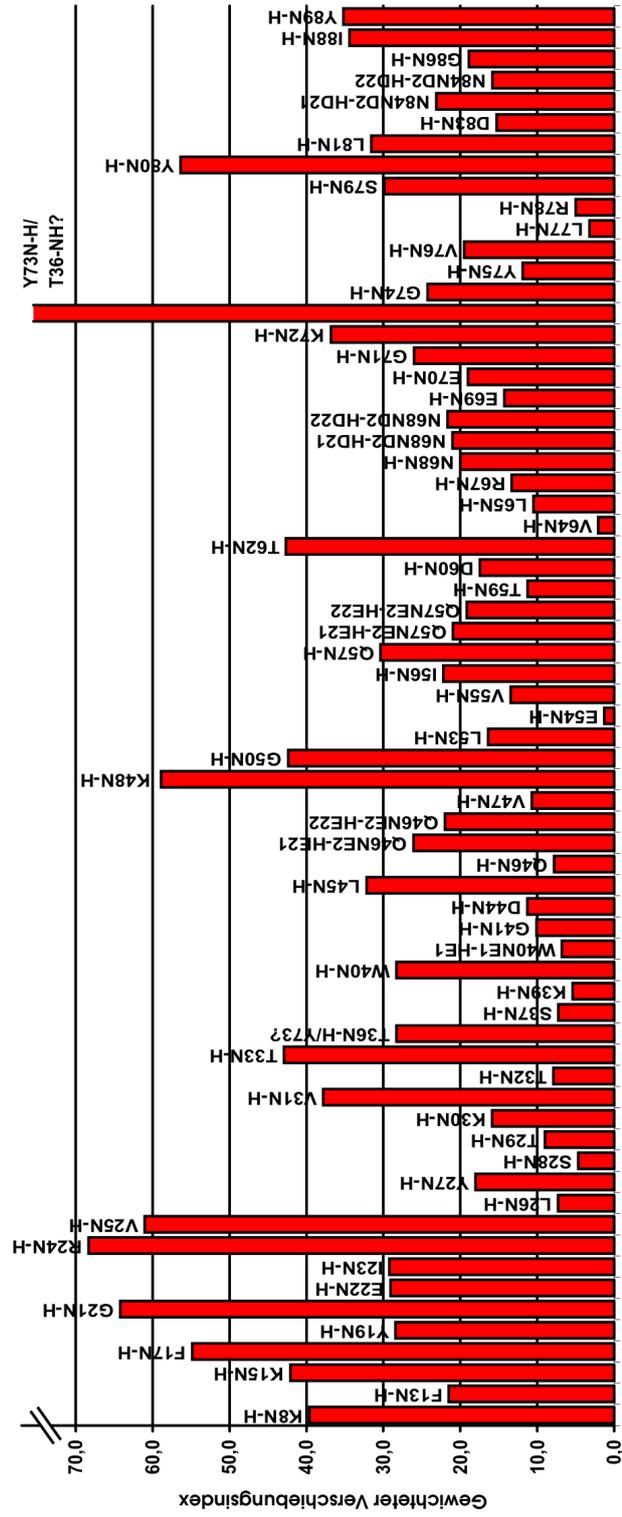


Abbildung 3.7: **Änderung der chemischen Verschiebungen nach $hSH3^C$ -Phosphorylierung.** Aufgetragen ist der gewichtete geometrische Verschiebungsindex für die analysierbaren Peaks. Die Werte sind mit der Nummer und der Art der Resonanz beschriftet. Die Nummerierung bezieht sich auf den Beginn der Domäne (Lys⁶⁸³).

3 Ergebnisse

Eine zentrale Region der Primärstruktur (As. 46–62) schien eine erhöhte Empfindlichkeit für strukturelle Änderung durch Phosphorylierung zu zeigen. Die Lage der betreffenden Reste ist jedoch sehr unterschiedlich, sodass keine einfache Korrelation zwischen einer Phosphorylierungsstelle und diesen Peak-Verschiebungen herzustellen ist. Siehe hierzu Abb. 3.8. Es handelte sich jedoch vorwiegend um Verschiebungen bei Aminosäuren, deren Seitenketten sich an der Oberfläche der Domäne befinden. Des Weiteren ist die vermutliche Resonanz von Tyr⁷³ (im Gesamtprotein As. 755) am stärksten verschoben. Die spätere massenspektrometrische Analyse ergab eine Phosphorylierung bei Tyr⁷³. Auch Tyr⁸⁹ (Gesamtprotein As. 771) ist phosphoryliert. Siehe hierzu 3.1.3 auf Seite 100. Da diese Aminosäure im untersuchten Konstrukt den C-terminalen Rest bildet, korrespondiert die Peak-Verschiebung im NMR-Spektrum aber vermutlich nicht mit der physiologischen Situation im Gesamtprotein. Ein phosphorylierter Aminosäurerest zeigt also gleichzeitig die stärkste Verschiebung im NMR-Experiment. Tyrosine 19, 75 und 80 (Gesamtprotein: Tyrosin 701, 757, 762) sind laut MS-Analyse wahrscheinlich nicht phosphoryliert. Eine Verschiebung von Tyr⁸⁰ ist nicht eindeutig zuzuordnen.

3.1.3 Massenspektrometrische Phosphorylierungsanalyse

Bereits vor der Klonierung von ADAP war das Protein als Tyrosinphosphoryliert identifiziert worden (siehe 1.2.1.3, sowie da Silva *et al.*, 1993, 1997b). Die Charakterisierung der Phosphorylierungsstellen erfolgte über Verkürzungsstrukturen, Detektion mit Phosphotyrosinantikörpern, Bindung an Phosphopeptide und Mutationsanalysen. Dies resultierte in der Beschreibung von drei funktionell wichtigen Tyrosinen (As. 595, 625 und 651). Bei Beginn dieser Arbeit lag jedoch keine explorative massenspektrometrische Analyse der Phosphorylierung vor. Insbesondere die Beobachtung, dass auch die isolierten Domänen des Proteins *in vitro* durch Fyn modifiziert werden können (s. 3.1.1.2), motivierte die eingehende Charakterisierung möglichst vieler potenzieller Phosphorylierungsstellen.

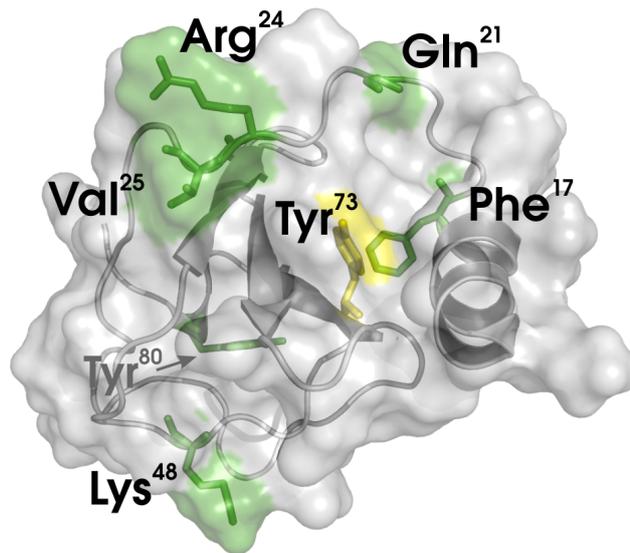


Abbildung 3.8: **Dreidimensionale Struktur von hSH3^C mit Aminosäureresten, die nach Phosphorylierung Peak-Verschiebungen zeigen.** Repräsentative Struktur aus dem NMR-Ensemble (PDB-Code 1RI9) als Sekundärstruktur-Skizze mit Oberfläche (grau). Die Aminosäurereste, die nach Phosphorylierung starke Verschiebungen im ¹H¹⁵N-HSQC zeigten, werden in grün mit Seitenketten gezeigt. In gelb: Tyr⁷³ gezeigt.

3.1.3.1 Analyse in vitro-phosphorylierter Proteine

Aufgrund der beschränkten Verfügbarkeit von ADAP-Gesamtprotein wurde zunächst die Analyse von *in vitro*-phosphorylierter Domäne hSH3^C und ADAP(486–783) durchgeführt. Die Proteine wurden phosphoryliert und die phosphorylierte Fraktion mit Affinitätschromatographie angereichert. Nach Auftrennung mit SDS-PAGE wurde in der Arbeitsgruppe Massenspektrometrie (Dr. Eberhard Krause) von Clementine Klemm die Probenvorbereitung und eine MALDI-TOF-Analyse nach tryptischem Verdau durchgeführt. Außerdem wurde die Gesamtmasse von phospho-hSH3^C verglichen mit Phosphatase-behandelter Domäne. Dabei ergab sich eine Differenz von 77 Da, die im Rahmen der Messgenauigkeit auf den Verlust eines Phosphatrestes hindeuten kann (erwartete Differenz=80 Da). Bei der Peptidmassenanalyse im wurde eine entsprechende Massendifferenz gefunden (passend zu As. 761-791). Für die Probenvorbereitung der hSH3^C-Domäne war die phosphorylierte Fraktion über eine Affinitätssäule angereichert worden. In

3 Ergebnisse

den Massenspektren des phosphorylierten Proteins konnte kein Signal für nicht-phosphoryliertes Protein gefunden werden, was auf einen geringen Anteil nicht-phosphorylierten Proteins hindeutet. Für die bekannten Phosphorylierungsstellen konnten keine Peptide gefunden werden. Dies liegt vermutlich an der Größe der Peptide, die in dem betreffenden Bereich durch Trypsinspaltung entstehen.

Mögliche posttranslationale Modifikationen von ADAP(486-768), identifiziert nach einfacher MALDI-TOF-Analyse nach Trypsin-Verdau, sind in Tabelle 3.1 aufgelistet (außer Phosphorylierungen). Hierbei sind Modifikationen nicht aufgeführt, die zwar die erwartete Massendifferenz hervorrufen, aber nicht in humanen oder *E.coli*-Zellen vorkommen. Im Weiteren wurden mehrere Analysen durchgeführt, für die phosphoryliertes ADAP(486-783) eingesetzt wurde. Dieses wurde mit Trypsin, GluC (*Staphylococcus aureus*-Protease V8) oder AspN (Flavastacin) gespalten und Peptide mit einem ESI-Quadrupol-TOF oder MALDI-TOF/TOF gemessen. Die Verwendung von GluC erbrachte ebenfalls keine zusätzliche Information bezüglich der bekannten Phosphorylierungsstellen, zeigte jedoch eine schlechtere Sequenzabdeckung als Trypsinspaltung.

Eine zusätzliche Analyse wurde von Dr. Andreas Schlosser (Arbeitsgruppe Dr. Achim Kramer, Charité) durchgeführt. Dabei wurden die Proteine vor SDS-PAGE reduziert und alkyliert und die Phosphopeptide nach Proteolyse an einer Titandioxid-Matrix angereichert. Bei der Analyse wurden die Phosphorylierung der Tyrosine 559, 595 und 651 nachgewiesen. Somit wurden insgesamt folgende Tyrosine aus *in vitro*-phosphoryliertem ADAP(486-783) identifiziert: 559, 571, 595, 651, 755, 771 und 780 (siehe auch Tab. 3.2).

3.1.3.2 Analyse von zellulärem phosphorylierten ADAP

Um sich einer Charakterisierung des zellulären Proteins anzunähern, wurde eine Affinitätschromatographie von Jurkat-Lysaten an der immobilisierten SH2-Domäne von Fyn durchgeführt. Das Lysat von unstimulierten oder stimulierten Zellen war vor der Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose-Matrix („Beads“) ohne GST-Fyn-SH2 inkubiert worden, um unspezifische Interaktion zu eliminieren („pre-clear“). Einzelheiten hierzu finden sich in 2.2.2.3. ADAP wurde in Mengen

3.1 Phosphorylierung

Peptid-Anfang	Peptid-Ende	Art der Modifikation	konform mit PROSITE-Regeln?
504	523	Cys-SO ₂ H	ja
506	523	FAD	ja
518	523	3-Methylthioasparaginsäure	ja (<i>E.coli</i>)
518	523	O-GlcNAc	ja
518	532	Dimethylierung	ja
533	541	Pyrrolidincarboxylsäure	nein
533	549	Pyrrolidincarboxylsäure	nein
542	549	Methylierung	ja
554	575	Citrullinierung	ja
677	683	Pyridoxalphosphat	ja
681	684	Dimethylierung	ja
685	690	Methylierung	ja
688	693	Acetylierung	ja
694	697	Dimethylierung	ja
701	720	Dimethylierung	ja
707	712	Acetylierung	ja
707	712	Trimethylierung	ja
713	725	Glucosylierung	ja
722	745	3-Methylthioasparaginsäure	ja (<i>E.coli</i>)
746	749	4-Carboxyglutamat	ja
746	749	Cys-SO ₂ H	ja
746	754	Acetylierung	ja
746	754	S-Nitrosocystein	ja

Tabelle 3.1: Liste der Kandidatenpeptide für posttranslationale Modifikationen im Konstrukt ADAP(486-768) ohne Berücksichtigung von Phosphorylierungen.

3 Ergebnisse

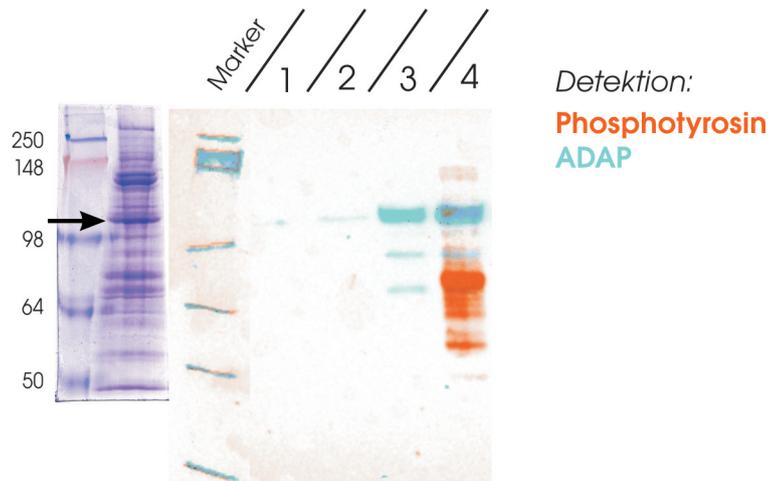


Abbildung 3.9: **Vorversuch zur Isolierung von zellulärem ADAP aus Jurkat-Lysaten mit immobilisierter Fyn-SH2-Domäne.** links Coomassiegefärbtes Gel mit ungefähren Molekulargewichten des Standards. „→“ markiert die analysierte Bande. rechts 1 Lysat (stimulierte Zellen), nach Pre-clear (2 μ l) 2 Pre-clear-Matrix (15 μ l) 3 Pulldown-Beads, (Lysat unstimulierter Zellen) (15 μ l) 4 Pulldown-Beads, (Lysat stimulierter Zellen) (15 μ l).

isoliert, die deutlich durch Coomassie anzufärben waren. Beide Isoformen konnten im Gel sichtbar gemacht werden (siehe Abb. 3.9). Die Identität der Banden wurde durch anti-ADAP-Immundetektion bestätigt. Ausgeschnittene Banden wurden wie zuvor beschrieben per Massenspektrometrie analysiert. Hierbei wurden eine gute Sequenzabdeckung und eine zweifelsfreie Identifizierung für Banden beider Molekulargewichte erreicht. Das Phosphorylierungssignal war auf Höhe des ADAP-Signals schwach vorhanden. Der deutliche Unterschied zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen weist auf eine erfolgreiche Aktivierung vor Lyse hin, obwohl im Lysat selbst die Konzentration von Phosphoproteinen eher gering zu sein scheint. Die Spezifität der Fyn-SH2-Interaktion wurde auch durch die Identifizierung von bekannten Fyn-Bindungspartnern wie *Focal adhesion kinase* untermauert. In Abb. 3.10 ist die Kontrolle einer Optimierung der Isolierungsbedingungen von ADAP nach Chromatographie an Fyn-SH2 zu sehen. Im hier eingesetzten 7%-iges Tris-Acetat-Gel migriert ADAP an der erwarteten Stelle gemäß dem Molekulargewicht (85 kDa). Im Tris-Glycin-Puffersystem wird eine Migration bei ca. 120 kDa beobachtet. Da eine

2D-Gelelektrophorese in Betracht gezogen werden musste, wurde hier auch der Puffer der isoelektrischen Fokussierung als Elutionspuffer von der Matrix getestet. Der LDS-Probenpuffer entspricht in etwa dem Standard-SDS-Probenpuffer, mit der Ausnahme, dass SDS durch besser lösliches Lithium-Dodecylsulfat ersetzt wurde (Bestandteil des verwendeten PAGE-Systems, siehe 2.2.2.6, S. 73). Die erzielte Reinheit der Extraktion mit LDS-Probenpuffer war ausreichend und die Konzentration von ADAP war in diesen Proben höher als mit IEF-Puffer. Daher wurde auf 2D-Elektrophorese verzichtet und die Banden ausgeschnitten, die durch Immundetektion als ADAP-haltig identifiziert wurden. Eine Übersicht aller identifizierten Phosphorylierungsstellen

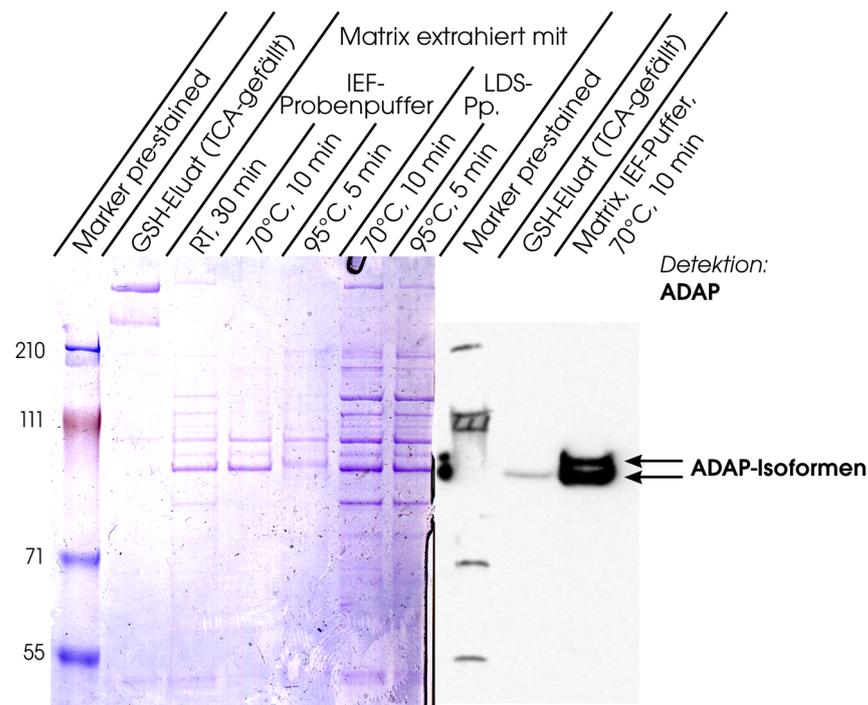


Abbildung 3.10: **Verfeinerung der Isolierung von ADAP aus Zelllysaten.** links Coomassie-gefärbtes Gel (Tris-Acetat-System). „GSH-Eluat“ steht für ein konzentriertes Eluat der präzipitierten Proteine nach Elution mit reduziertem Glutathion. Die weiteren Proben wurden durch Extraktion der Matrix mit Probenpuffer für isoelektrische Fokussierung („IEF-Probenpuffer“) oder mit Probenpuffer für SDS-PAGE („LDS-Pp.“) bei verschiedenen Temperaturen gewonnen. Aufgetragen wurden jeweils 24 μ l der Probe. rechts Immundetektion mit Antikörpern gegen ADAP von einem Teil der Proben.

3 Ergebnisse

ist in Tabelle 3.2 zu finden. Serine werden dort aufgeführt, wenn sie als phosphoryliert identifiziert wurden. Threonin-Phosphorylierung wurde bis jetzt in keinem Experiment nachgewiesen.

Position	Motiv	Phosphorylierungsstatus	Bemerkung
4	AKYNTG	unbekannt	siehe 4.1.6 (weitere Analysen der ADAP-Phosphorylierung)
387	TSYSTT	unbekannt	
462	ETYEDI	unbekannt	
558	RGSYGY	phosphoryliert	ADAP aus Jurkat-Zellen
559	GSYGYI	phosphoryliert	
561	YGYIKT	nicht phosphoryliert	
571	IDYDSL	phosphoryliert	
573	YDSLKL	phosphoryliert	siehe 4.1.6
595	EVYDDV	phosphoryliert	SLP-76-Bindung
625	DIYDGI	unbekannt	biochemische Daten siehe (Raab <i>et al.</i> , 1999)
651	EVYDDV	phosphoryliert	SLP-76-Bindung
662	PVSSAEM	phosphoryliert	evtl. nur in <i>E.coli</i>
701	FKYDGE	nicht phosphoryliert	
709	VLYSTK	unbekannt	
755	GKYGYV	phosphoryliert	ca. 20%
757	YGYVLR	nicht phosphoryliert	siehe 4.1.6
762	RSYLAD	nicht phosphoryliert	
771	EIYDDI	phosphoryliert	ca. 20%
780	CIYDND	phosphoryliert	

Tabelle 3.2: ADAP-Phosphorylierungsstellen identifiziert durch Massenspektrometrie von zellulärem ADAP oder rekombinantem, *in vitro*-phosphoryliertem ADAP(486–783).

Die Selektivität der Fyn-SH2-Bindung für das beschriebene Motiv in ADAP (um poY^{625}) wurde durch die gezielte Wechselwirkung der SH2-Domäne mit phosphorylierten und unphosphorylierten gereinigten Domänen von ADAP demonstriert. Abb. 3.11 zeigt das Ergebnis einer Kosedimentation von immobilisierter Fyn-SH2-Domäne (GST-Fusion) mit den hSH3-Domänen und ADAP (486–783). Letzteres enthält das

3.1 Phosphorylierung

Fyn-Bindungsmotiv und wird im Gegensatz zu den isolierten Domänen von Fyn-SH2 gebunden. Hierbei ist auch eine deutliche Verstärkung der Bindung nach Phosphorylierung des Proteins zu sehen. Es wird offenbar aber auch nicht-phosphoryliertes Protein gebunden.

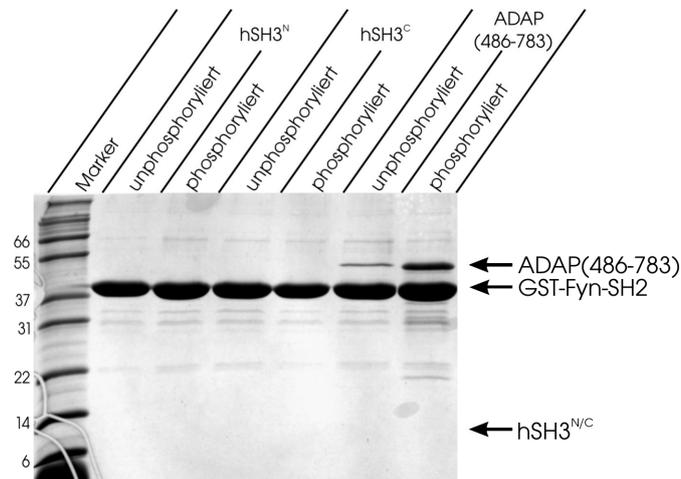


Abbildung 3.11: **Selektive Bindung von Fyn-SH2 an phospho-ADAP(486–783)**. Coomassie-gefärbtes Gel mit Proteinen, nach Affinitätschromatographie an GST-Fyn-SH2. „Phosphoryliert“ / „Unphosphoryliert“ bezieht sich auf die gereinigten ADAP-Konstrukte mit oder *in vitro*-Phosphorylierung. Die Pfeile markieren die erwarteten Laufhöhen für ADAP(486–783) (oben), GST-Fyn-SH2 (Mitte) sowie hSH3^N und hSH3^C(unten).

Die Lage der Phosphorylierungsstelle im Domänenkonstrukt von hSH3^C wurde in Abb. 3.8 gezeigt. Die Phosphorylierung von hSH3^N an Tyr⁵⁵⁹ und Tyr⁵⁷¹ wurde massenspektrometrisch nachgewiesen. Die Lage dieser Reste in der dreidimensionalen Struktur wird in Abb. 3.12 unter Berücksichtigung der beiden Redox-Konformere gezeigt. Die NMR-Strukturen wurden von Zimmermann *et al.* (2007) beschrieben. Die redox-sensitiven Cysteine und der sechsgliedrige Ring, der sich nach Oxidation ausbildet, sind markiert. Die Seitenketten von Ser⁵⁵⁸ sind für die reduzierte und oxidierte Struktur kongruent. Aus Gründen der Vereinfachung ist der Rest daher nur für die oxidierte Struktur abgebildet (gelb).

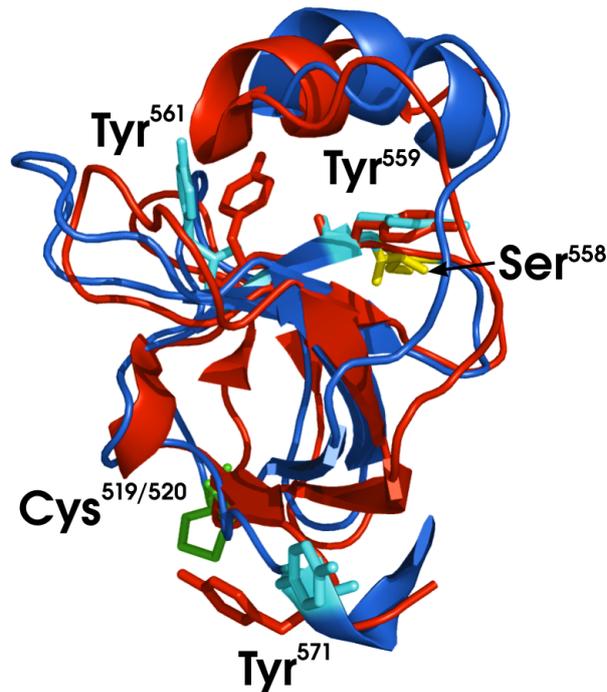


Abbildung 3.12: Dreidimensionale Strukturen von reduziertem und oxidiertem hSH3^N mit Phosphotyrosinen. Repräsentative Strukturen aus den NMR-Ensembles (rot: reduziert, PDB-Code 2GTJ, blau: oxidiert, 2GTO) als Sekundärstruktur-Skizze. Tyr⁵⁵⁹ und Tyr⁵⁷¹ sind in rot (reduziert) bzw. cyan (oxidiert) dargestellt. Der sechsgliedrige Ring von Cys^{519/520} in oxidiertem hSH3^N ist grün dargestellt. In gelb: Ser⁵⁵⁸.

3.1.4 In vitro-Kinetik

ADAP ist Substrat und Bindungspartner von Fyn nach Phosphorylierung. Dies verändert möglicherweise die Zugänglichkeit von weiteren Tyrosinmotiven in ADAP für Phosphorylierung durch Fyn. Des Weiteren beruht die Regulation der Kinasen der Src-Familie hauptsächlich auf einer Aufhebung einer inhibierten Struktur, bei der die SH2-Domäne ein Phosphopeptid am C-Terminus des Proteins bindet und somit die katalytische Domäne verdeckt wird. Zur Aktivierung wird im zellulären Umfeld das C-terminale Tyrosin dephosphoryliert. Auch eine Verdrängung des phosphorylierten Peptids durch ein bindungskompetentes Peptid in trans ist jedoch denkbar. Die SH2-Domäne von Fyn erkennt das Phosphopeptid aus ADAP um *poY*⁶²⁵, das auch von der Kinase phosphoryliert werden kann. Um zu untersuchen, wie sich

die Phosphorylierungsgeschwindigkeit von ADAP aufgrund dieser möglicherweise komplexen Abhängigkeiten darstellt, wurden ADAP-Fragmente mit rekombinanter, gereinigter Kinase *in vitro* inkubiert. Als Standardsubstrat diente ADAP(486–783), da es die meisten relevanten Tyrosinreste enthielt (insbesondere Tyr⁶²⁵) und ein deutlich detektierbares Phosphorylierungssignal lieferte.

3.1.4.1 Zwei-Komponenten-System: Fyn und ADAP

Der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung wurde durch SDS-PAGE, Western-Blotting und Immundetektion mit einem Phosphotyrosinantikörper verfolgt. Um einen Einfluss des Substrat-Kinase-Verhältnisses auf den Phosphorylierungsverlauf zu untersuchen, wurden die Experimente bei konstanter Enzymkonzentration mit verschiedenen Substratkonzentrationen durchgeführt. Hierbei wurden im Vorfeld folgende Parameter optimiert:

- Substratmenge
- Substrat- und Enzymkonzentrationen
- Reaktionstemperatur
- Inkubationsdauer und Zeitpunkte
- Auftragungsmengen und Immunblotparameter

Die Phosphorylierungssignale nach Immundetektion wurden im Odyssey[®]-Infrarot-Scanner detektiert und quantifiziert. Es wurden identische Substratmengen aufgetragen. Die Kinase-Menge im Immunblot ist hingegen nicht konstant. Die Anregungsintensität wurde so gewählt, dass alle Signale unterhalb der Detektorsättigung lagen. Die Signalintensität kann in diesem Bereich als proportional angesehen werden zur Konzentration des Epitops, das vom Erstantikörper (anti-Phosphotyrosin) erkannt wird. Exemplarische Detektionen der Western Blots sind in Abb. 3.13 gezeigt. Hierbei wurde die Reaktion bei 18°C, mit [Fyn]=0,29 μ M durchgeführt. Die molaren Verhältnisse zwischen Kinase und Substrat sind der Abbildung zu entnehmen. Deutlich sichtbar war hier die Autophosphorylierung von Fyn. Da die Menge der Kinase im Blotauftrag bei höheren Substrat-Verhältnissen niedriger war, lässt sich das *poY*-Fyn-Signal nicht direkt zwischen den Verhältnissen vergleichen. Von den quantifizierten Phosphorylierungssignalen

3 Ergebnisse

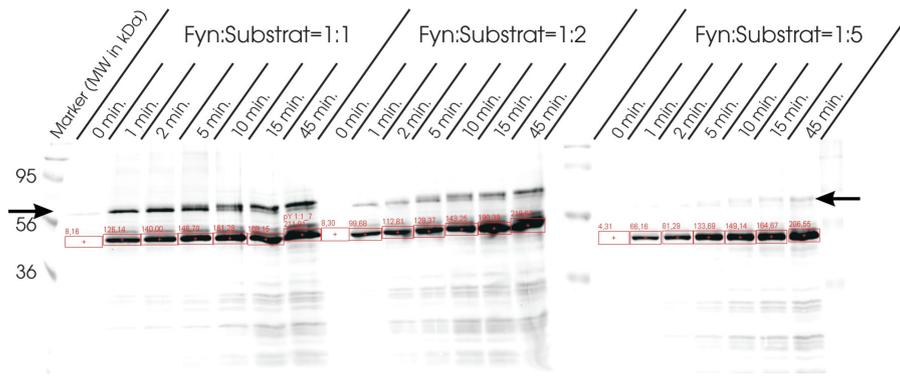


Abbildung 3.13: **Exemplarische Immundetektion der ADAP(486–783)-Tyrosinphosphorylierung.** Die Inkubation des Substrats im angegebenen Verhältnis wurde nach den genannten Zeiten gestoppt. Die integrierte Intensität der ADAP(486–783)-Banden ist über den roten Quantifizierungsrechtecken vermerkt. Die Pfeile markieren die Laufhöhe von Fyn.

wurde das Signal des unphosphorylierten Proteins abgezogen. Die resultierenden Werte wurden gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 3.14 **A**). Gezeigt werden die Daten für drei unabhängige Experimente mit jeweils vier Enzym-Substrat-Verhältnissen bei $T=20^{\circ}\text{C}$. Es trat ein exponentieller Verlauf auf, der die Zunahme des phosphorylierten Substrats reflektiert. Eine Kurvenanpassung wurde mit einer logarithmischen Gleichung durchgeführt (t : Zeit in min., a, b : Kurvenparameter): $\text{Fluoreszenzsignal} = a - b \cdot \ln(t)$. Eine Linearisierung durch logarithmische Auftragung der Geschwindigkeit führte zu schlechteren Kurvenanpassungen. Daher wurde keine reine Kinetik pseudoerster Ordnung angenommen.

Obwohl die Messwerte zwischen den Experimenten deutlich variierten, stimmten die Mittelwerte und Kurvenparameter gut überein mit Ausnahme für das Kinase-Substrat-Verhältnis 1:2. Für die gezeigten Daten ist das Bestimmtheitsmaß der Kurvenanpassung (R^2) immer 0,99. Da die Proteinmengen in der SDS-PAGE nicht für alle Proben identisch gehalten werden konnten, wurden die Werte auf die Endpunkte normiert. Der zeitliche Verlauf der selben Phosphotyrosinsignale nach Normierung ist in Abb. 3.14 **B** gezeigt.

Abb. 3.15 **A** und **B** geben beispielhaft den Effekt der Logarithmierung der Zeit-Achse wieder. Die Phosphorylierungsintensitäten aus zwei Experimenten wurden auf die Endpunkte normiert und logarithmische

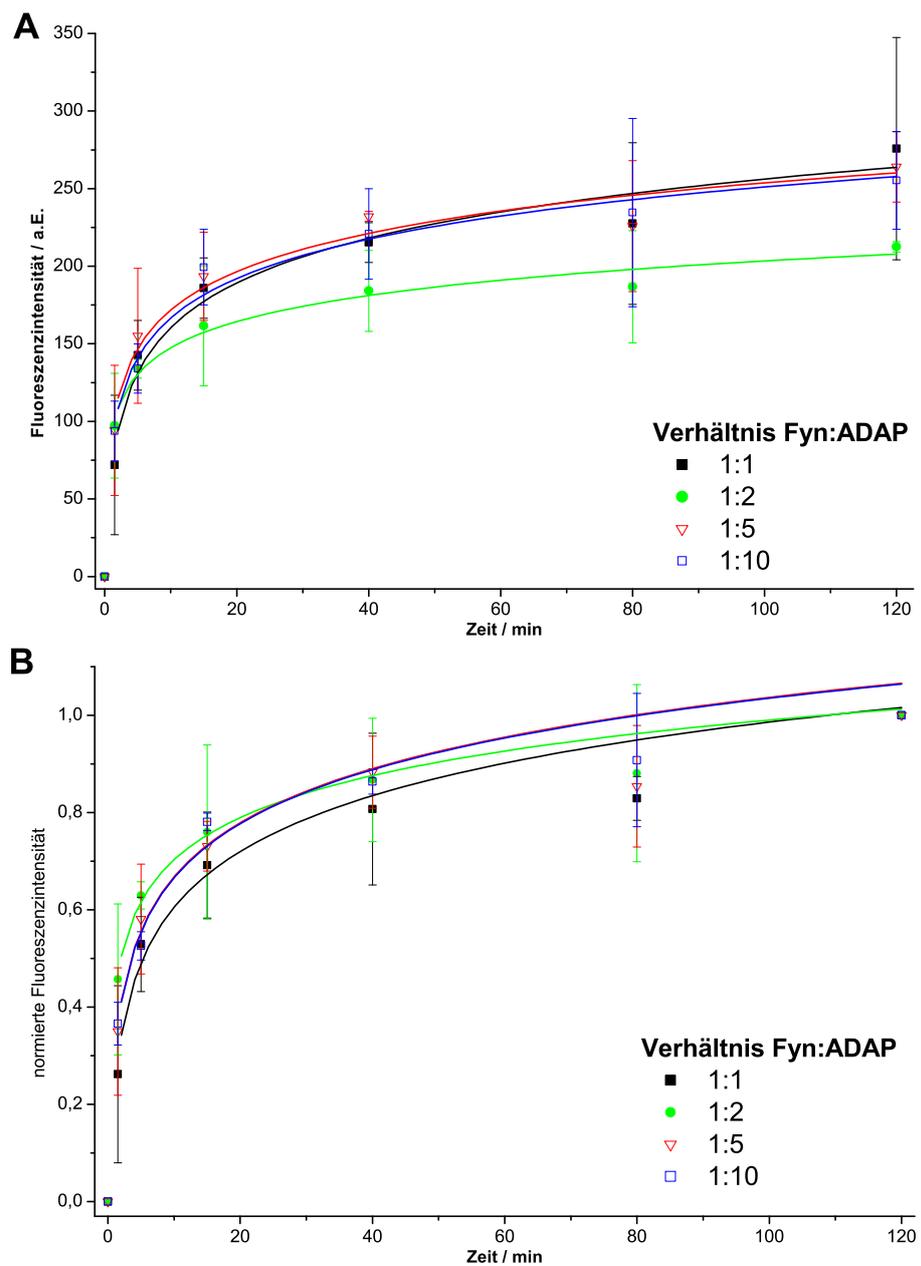


Abbildung 3.14: Verlauf des *in vitro*-Phosphotyrosinsignals für ADAP. Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung bei $T=20^{\circ}\text{C}$. $[\text{Fyn}]=0,29 \mu\text{M}$, molares Verhältnis zu ADAP wie angegeben. **A** Auftragung der Hintergrund-bereinigte Fluoreszenz-Intensitäten mit nicht-linearer Kurvenanpassung (siehe Text), wobei die Zeitachse linear ist. **B** Repräsentation der selben Daten, normalisiert auf den letzten Punkt der Messung.

3 Ergebnisse

Regressionsgeraden unter Auslassung der letzten beiden Punkte (80 und 120 min.) nach der Methode der kleinsten Quadrate angepasst. Die letzten Messpunkte wurden nicht berücksichtigt, um eine Überbewertung der unveränderlichen Endpunkte zu vermeiden. Der Vergleich der identischen Experimente **A** und **B** verdeutlicht die starke Streuung der abgeleiteten Daten. Dies findet auch Niederschlag bei Betrachtung der Parameter aus der logarithmischen Regression der Phosphorylierungsverläufe. Abb. 3.15 **C** zeigt dies für den Parameter a für die verschiedenen Substratkonzentrationen. Die Werte pro Experiment sind einzeln aufgetragen und der Mittelwert wurde mit dem Standardfehler versehen. Die Standardabweichungen waren 0,191 (0,29 μM Substratkonzentration), 0,170 (0,58 μM), 0,150 (1,44 μM) und 0,050 (2,88 μM). Die Anfangswerte, also normalisierte Intensitäten bei 1,5 min. waren proportional zum logarithmischen Fit-Parameter a . Dieser reflektierte offenbar die Anfangsteilheit der Kurve. Die Auftragung des Parameters b wird hier nicht gezeigt, da sie sich ähnlich dem inversen Wert für a verhält und keine zusätzlichen Informationen birgt.

Der Erwartung nach wird der Endpunkt der Phosphorylierung bei hohen Temperaturen früher erreicht, jedoch erhöht sich der Fehler bei den frühen Messpunkten. Daher wurden auch Experimente bei 16°C durchgeführt. Die Ergebnisse hierzu sind in Abb. 3.16 zu sehen. Die Streuung war bei diesen Daten höher, was vermutlich (unbekannte) experimentelle Gründe hatte. Es zeigte sich außerdem ein starker linearer Anteil im späten Kurvenverlauf, deren Grund nicht auf die Durchführung zurückzuführen war. Die genauere Auswertung der Einzeldaten wurde daher nur für Experimente bei 20°C durchgeführt.

3.1.4.2 Vorbehandlung der Kinase

Fyn wird hauptsächlich über die Maskierung der Kinasedomäne durch die intramolekulare Bindung der SH2-Domäne an $p\text{oY}^{531}$ (in Isoform 1) inhibiert. Des Weiteren ist die (Auto-)Phosphorylierung des Tyr⁴²⁰ für die volle Aktivierung nötig (siehe 1.2.2.1 auf Seite 24). Um den Zustand dieser beiden Tyrosine bei der eingesetzten Kinase zu klären, wurden Proben vor und nach einer Phosphorylierungsreaktion mit Massenspektrometrie analysiert. Für die Phosphorylierungsreaktion wurde ein Vav1-Konstrukt eingesetzt (As. 170-375), das kein optimales Substrat

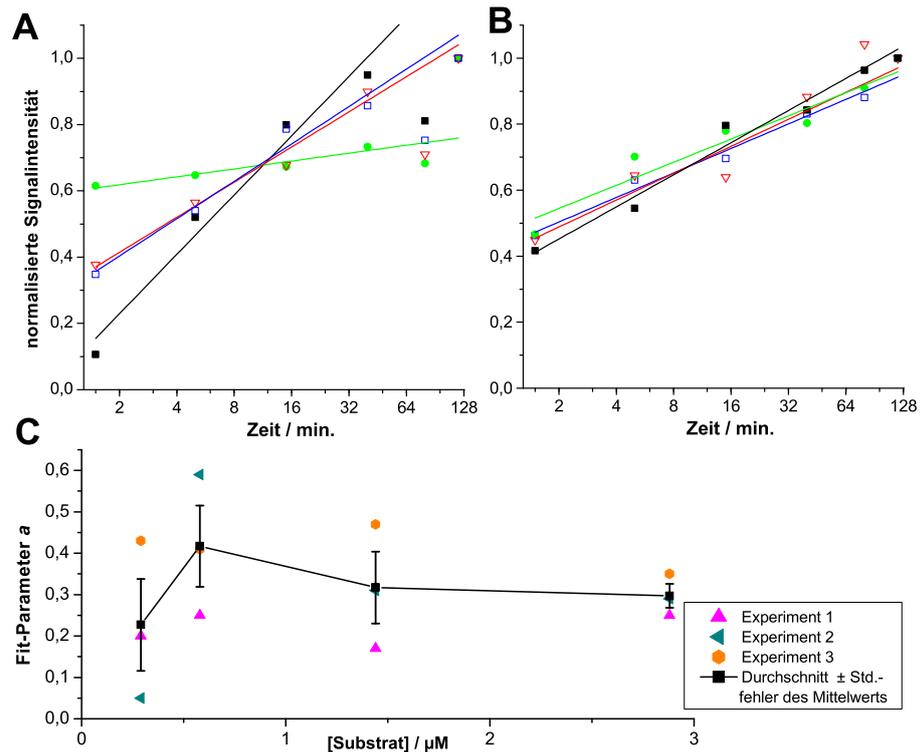


Abbildung 3.15: **Linearisierung der Phosphorylierungssignale und Ableitung von Vergleichsparametern.** **A** und **B** Beispiele einer logarithmischen Auftragung aus zwei Experimenten mit je vier Fyn-ADAP-Verhältnissen. **C** Einzel- und Mittelwerte der Kurvenparameter a in Abhängigkeit der Substratkonzentration aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler des Mittelwerts.

für Fyn darstellt und daher die Autophosphorylierung begünstigt. Die Tabelle 3.3 fasst die Ergebnisse zusammen. Es zeigt sich, dass die Kinase-Präparation aus *Sf9*-Zellen kaum autophosphoryliert ist an Position Tyr⁴²⁰. Dies stellt die Haupt-Autophosphorylierungsstelle dar. Weitere Autophosphorylierungsstellen von Fyn sind bekannt (Tyr³⁰ und Tyr³⁹). Sie werden durch den allgemeinen anti-Phosphotyrosinantikörper detektiert, in der durchgeführten MS-Analyse wurden sie aber nicht berücksichtigt. Tyr⁴²⁰ wird im Verlauf der Autophosphorylierung wie erwartet stark phosphoryliert (von 10 auf ca. 80%). Hingegen ändert sich der Phosphorylierungsgrad des inhibitorischen Tyrosins (Tyr⁵³¹) nicht signifikant. Der Anteil ist bereits vor der Phosphorylierung größer als 50%. Durch Inkubation mit Substrat und ATP verändert sich dieser Wert nicht signifikant. Dies entspricht den Erwartungen, da dieses

3 Ergebnisse

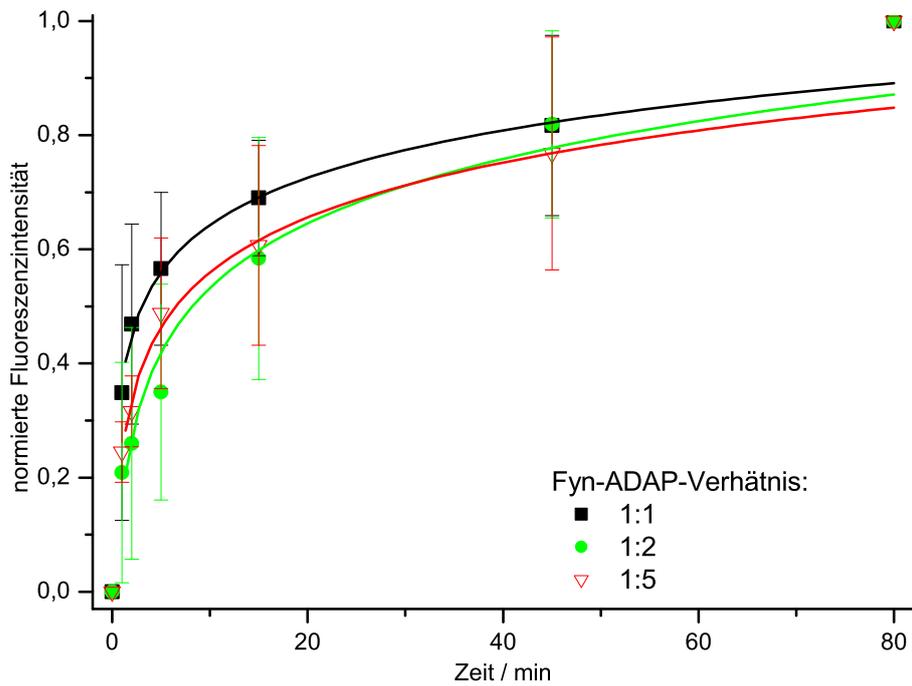


Abbildung 3.16: Verlauf des *in vitro*-Phosphotyrosinsignals für ADAP bei 16°C. Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung. Logarithmische Kurvenanpassung wie in 3.14

Aminosäureposition	Phosphorylierungsgrad von Fyn		
	vor Phosphorylierung	nach Auto-phosphorylierung	nach Csk-Inkubation
420 (positive Regulationsstelle)	10%	75-85%	nicht bestimmt
531 (negative Regulationsstelle)	57%	62%	87%

Tabelle 3.3: Phosphorylierungszustände von Fyn, bestimmt mit Massenspektrometrie vor und nach Inkubation mit Csk oder Autophosphorylierung.

Tyrosinmotiv zur Regulation durch Csk dient. Diese Kinase kann die Phosphorylierung von Tyr⁵³¹ noch weiter erhöhen auf ca. 87%.

Die Gegenwart von autoinhibiertem Fyn in der Reaktion kompliziert die Betrachtung der Kinetik. Diese Fraktion muss nicht vollkommen inaktiv sein, wenn mit ADAP ein Substrat vorhanden ist, das auch als Bindungspartner um die intramolekulare SH2-Bindung konkurrieren kann. Zur Klärung dieser Möglichkeit war die Präparation einer maximal inhibierten Kinase wünschenswert. Andererseits war die Präparation einer möglichst aktiven Kinase aus ökonomischen Gründen anzustreben.

Die vollständige Dephosphorylierung wurde mit unspezifischen Phosphatasen durchgeführt. Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm dephosphoryliert Nukleinsäuren und Proteine. Die Reaktion verlief vollständig (Abwesenheit von anti-Phosphotyrosinsignal, nicht gezeigt), das Enzym kann aber nur bei hohen Temperaturen deaktiviert werden. Daher wurde die „Antarctic Phosphatase“ (TAB5 AP) eingesetzt, die laut Herstellerangaben nach 5 min. bei 65°C deaktiviert sein soll. Im gezeigten Experiment wurde jedoch keine Hitzeinaktivierung durchgeführt, um Schäden an Fyn zu vermeiden. Außerdem hatte sich das Erhitzen als nicht zuverlässig erwiesen. Eine Inhibierung durch Pervanadat ist prinzipiell möglich, hatte in Vorversuchen aber einen negativen Effekt auf die Fyn-Aktivität. Im gezeigten Versuch wurde daher als Kontrolle Vanadat ohne und mit Phosphatase eingesetzt. Die Kinase wurde für 40 min. bei 37°C dephosphoryliert.

Die Phosphorylierung von Tyr⁵³¹ in Fyn sollte mit kommerziell erhältlich Csk (*c-Src kinase*) durchgeführt werden. Die Präinkubation fand bei 30°C, ebenfalls für 40 min. statt. Dabei wurde ein molares Verhältnis von 14,5:1 (Fyn:Csk) eingesetzt. Aliquots vor Vorinkubation oder nach 40 min. Vorinkubation wurden abgenommen („0' / 40' Vorbehandlung“). Die Phosphatase-Ansätze wurden mit oder ohne 1 mM Pervanadat zur Hemmung angesetzt. Ein Aliquot der Kinase wurde ohne modifizierendes Enzym für 40 min. bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die vorbehandelten Kinasen in *in vitro*-Phosphorylierungen von ADAP(486–783) verwendet. Immundetektionen des Phosphorylierungsverlaufs sind in Abb. 3.17 gezeigt. Zur Unterscheidung der modifizierten Tyrosinreste wurden Sequenz- und phosphorylierungs-

3 Ergebnisse

abhängige Antikörper eingesetzt.

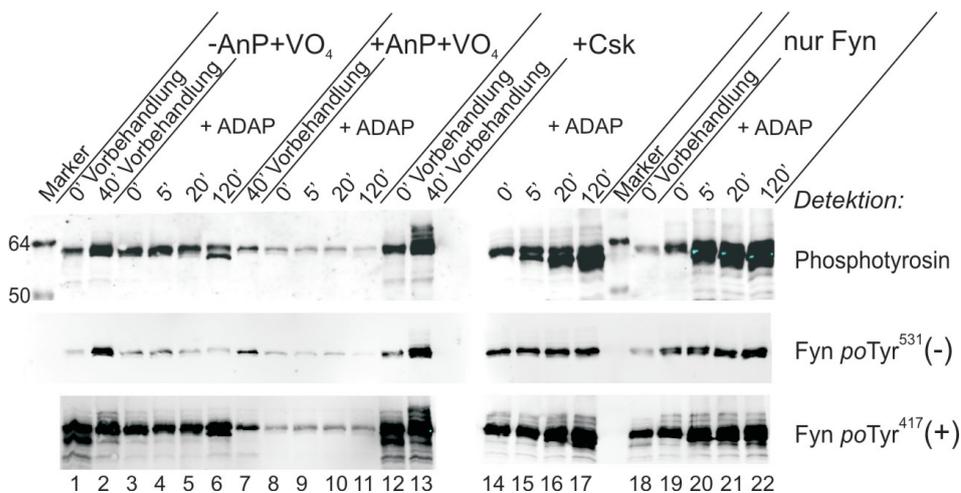


Abbildung 3.17: Effekt der Vorbehandlung von Fyn mit Phosphatase oder Csk auf die Aktivität und Phosphorylierung regulatorischer Tyrosine. Nummerierung der Banden unterhalb der Spuren. Fyn Kinase wurde mit Phosphatase („AnP“, 1-6) oder Csk (12-17) vorinkubiert. Die Kinase wurde mit ADAP(486–783) als Substrat versetzt (4-6, 9-11, 15-17, 20-22). In Gegenwart oder Abwesenheit der Phosphatase wurde mit Pervanadat („VO₄“) inkubiert (1-11). Als Kontrolle wurde nicht-vorbehandelte Kinase ohne modifizierende Enzyme vorinkubiert (18-22). Pixel in cyan: Sättigung des Detektors erreicht.

Die negative Regulationsstelle in Fyn wurde der Antikörperdetektion nach zu urteilen während der Vorinkubation mit und ohne Phosphatase phosphoryliert (Spuren 2, 7). In Gegenwart der Phosphatase jedoch deutlich geringer, was der Erwartung entspricht. Noch stärker war das Signal in Anwesenheit von Csk, die eben dieses Tyrosin phosphorylieren soll (13). Die aufgetragene Fyn-Menge war in ADAP-Phosphorylierungen geringer als bei der Kontrolle der Vorinkubation. Der Wert bei 0 min. in der anschließenden Substrat-Phosphorylierung (19) kann jedoch mit den entsprechenden Werten in Gegenwart von Phosphatase (3, 8) / Csk (14) verglichen werden: Fyn ohne weitere Enzyme hatte eine deutliche inhibitorische Phosphorylierung, die ungefähr derjenigen mit Csk entsprach. Die Gegenwart von Pervanadat scheint einen negativen Einfluss auf das Phosphorylierungssignal von Tyr⁵³¹ zu haben. Der Unterschied zwischen an- und abwesender Phosphatase (8-11, 3-6) ist hingegen nicht sehr groß. Obwohl Csk in der Phosphorylierungsreaktion präsent bleibt, war keine Verstärkung in der

Immundetektion des betreffenden Phosphotyrosins zu erkennen (14-17). Dies könnte an der Verdünnung liegen. Die unerwartete Erhöhung des Signals für die negative Phosphorylierungsstelle in Abwesenheit von Csk könnte durch unspezifische Bindungen des poY^{531} -Antikörpers an andere Phosphopeptide liegen. Die Fyn-Konzentration auf den Western Blots ist deutlich höher als bei der Detektion von zellulärem Fyn aus Lysaten.

Das Signal der positiven Regulationsstelle zeigte für die einfache *in vitro*-Phosphorylierung den erwarteten Verlauf. In Abwesenheit eines Substrats phosphoryliert sich Fyn hier selbst (18-22). Auffällig waren die starken Signale vor Beginn der Autophosphorylierung (1, 12, 18). Dies steht im Widerspruch zu den üblichen Beobachtungen und der MS-Analyse von Fyn. Phosphatase sorgte hier für ein deutlich geringeres Signal (7). Csk konnte die Autophosphorylierungsaktivität von Fyn in diesem Experiment nicht unterbinden (14-17). Es ist kein Unterschied zum Ansatz ohne Csk zu erkennen (19-22).

Die Phosphorylierung des Substrats hingegen scheint ohne Csk deutlich schneller zu verlaufen (19-22, Phosphotyrosinsignal unterhalb von Fyn). Dies deutet auf eine verminderte Aktivität von Fyn nach Csk-Inkubation hin. In Gegenwart von Phosphatase ließ sich keine ADAP-Phosphorylierung beobachten, was mit der fehlenden Autophosphorylierung von Fyn korreliert. Überraschenderweise ist auch ohne Phosphatase die Fyn-Aktivität stark eingeschränkt in Gegenwart von Pervanadat. Erst nach 120 min. wurde ein Signal erzeugt. Somit ist die Inhibition der Phosphatase mit Pervanadat kein geeignetes Mittel. Da auch die Hitzeinaktivierung unbefriedigend war, wurde die Phosphatase-Anwendung nicht weiter verfolgt.

Der Effekt der Präinkubation mit Csk sollte durch die Beobachtung des Phosphorylierungsverlaufs genauer untersucht werden. Hierzu wurden während der Vorbehandlung von Fyn mit und ohne Csk bei mehreren Zeitpunkten Proben entnommen. Die Ansätze wurden dann geteilt und mit oder ohne ADAP als Substrat weiterinkubiert. Dadurch sollten zufällige Variationen zwischen den Ansätzen minimiert werden. Der Verlauf der Reaktion wurde durch Detektion mit Phosphotyrosinantikörper (Gesamt-Fyn und Substrat-Phosphorylierung) sowie Regulationsstellen-spezifischem Fyn-Antikörper (Tyr⁴²⁰) verfolgt. Wie

3 Ergebnisse

in Abb. 3.18 **A** und **B** ersichtlich, ergaben sich starke Fehler durch die Teilung der Ansätze und das anschließende Zugabe von Substrat (oder Puffer). Einheitliche Trends lassen sich nicht erkennen. In Anwesenheit von Csk und ADAP stiegen beide Signale zunächst an, um dann kontinuierlich zu fallen. Dies galt sowohl für Fyn als auch für ADAP. Dies deutet entweder auf einen ungleichmäßigen Western-Transfer oder eine Verunreinigung der zugesetzten Substratmenge mit Phosphatase hin. In Abwesenheit von Csk verminderte sich das Fyn-pTyr-Signal zunächst, um dann wieder anzusteigen. Die Phosphorylierung von ADAP hingegen entsprach in diesem Ansatz den Erwartungen und erreichte nach ca. 60 min. eine Sättigung.

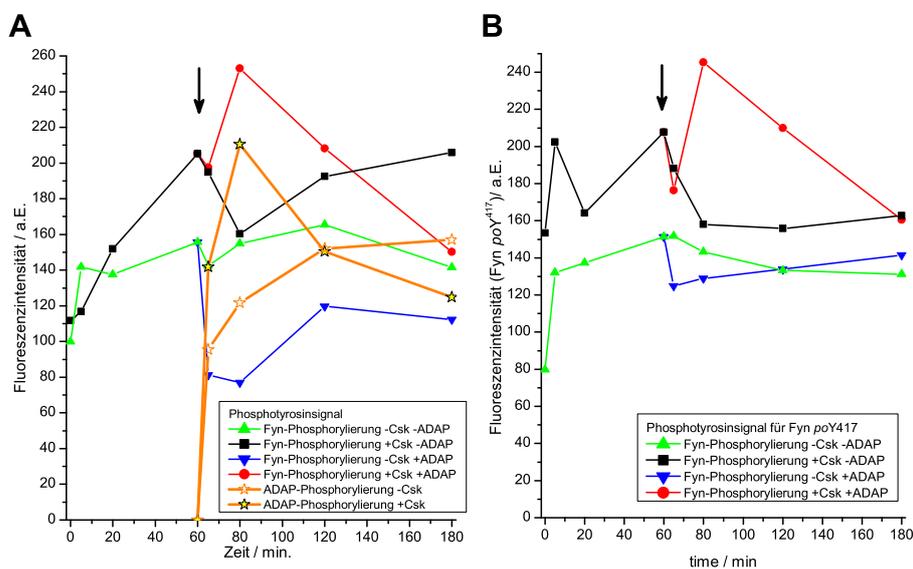


Abbildung 3.18: Effekt der Vorbehandlung von Fyn mit Csk auf die Phosphorylierung regulatorischer Tyrosine und Substrat-Phosphorylierung. **A** Gesamtphosphotyrosinsignal. Getrennte Betrachtung von Fyn- und ADAP-Signalen (ab 60 min. siehe Pfeile). **B** Fluoreszenzsignal der Detektion mit Fyn-poY⁴²⁰.

3.1.4.3 ATP-Verbrauchsassay

Die Durchführung der Phosphorylierungsassays mit Hilfe der Immunodetektion ermöglichte die Unterscheidung von Fyn-Autophosphorylierung und ADAP-Phosphorylierung. Bei höheren Verhältnissen zwischen Kinase und Substrat können hingegen nicht mehr bei

gleichzeitig analysiert werden. Da hier die Untersuchung der ADAP-Phosphorylierung im Mittelpunkt stand, wurde auch die Anwendbarkeit anderer Assayformen untersucht. Ein Lumineszenz-gekoppeltes System, zur Verfolgung des ATP-Verbrauchs ermöglichte eine hohe Parallelisierbarkeit und die Verringerung der Probenvolumina. Abb. 3.19 zeigt den Vergleich zweier Kinase-Präparationen mit ADAP(486–783) als Substrat bei Raumtemperatur. Es wurden 500 nM Kinase, 5 μ M Substrat und 50 μ M ATP eingesetzt. Die Fehlerbalken (Standardfehler) sollen hier nur die Reproduzierbarkeit zwischen Duplikaten eines Versuchs zeigen. Die Pipettiergenauigkeit ist hoch und die Durchschnittswerte zwischen den Ansätzen stimmen stark überein mit Ausnahme der Punkte beim Beginn der Reaktion. Das logarithmische Modell zur Kurvenanpassung 3.1.4.1 wurde hier unverändert eingesetzt und konnte den Reaktionsverlauf gut abbilden.

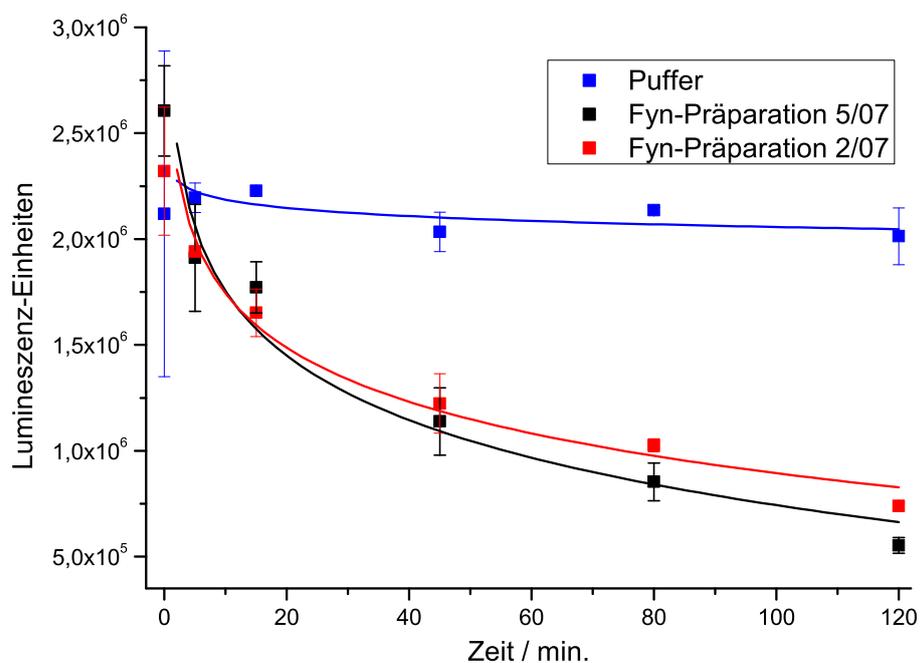


Abbildung 3.19: [ATP]-abhängige Lumineszenz während der Phosphorylierung von ADAP(486–783) durch Fyn. Mittelwerte der Duplikate ($n=1$) für zwei Fyn-Präparationen sind im zeitlichen Verlauf aufgetragen. Nicht lineare Kurvenanpassung wie 3.14.

3 Ergebnisse

3.1.4.4 Affinität von Fyn-SH2

Als Vorbereitung auf eine quantitative Modellierung des ADAP-Fyn-Systems, sollte die Affinität von Fyn-SH2 für das relevante ADAP-Phosphopeptid bestimmt werden. Die Sequenz des Peptids ist GIFFPPP-DDD $I_{po}Y^{625}$ DGIEE. Die hier durchgeführte Auswertung beruht auf NMR-Titrationsdaten. Die isolierte Fyn-SH2-Domäne wurde schrittweise mit steigenden Konzentrationen des Peptids gemischt und $^1H^{15}N$ -HSQC-Spektren aufgenommen. Die Frequenzen von vier deutlich veränderlichen Resonanzen wurden aufgezeichnet und die geometrische Verschiebung berechnet. Abb. 3.20 zeigt die Auftragung dieser Änderungen gegen die Peptidkonzentration. Da der Bindungsmodus nicht

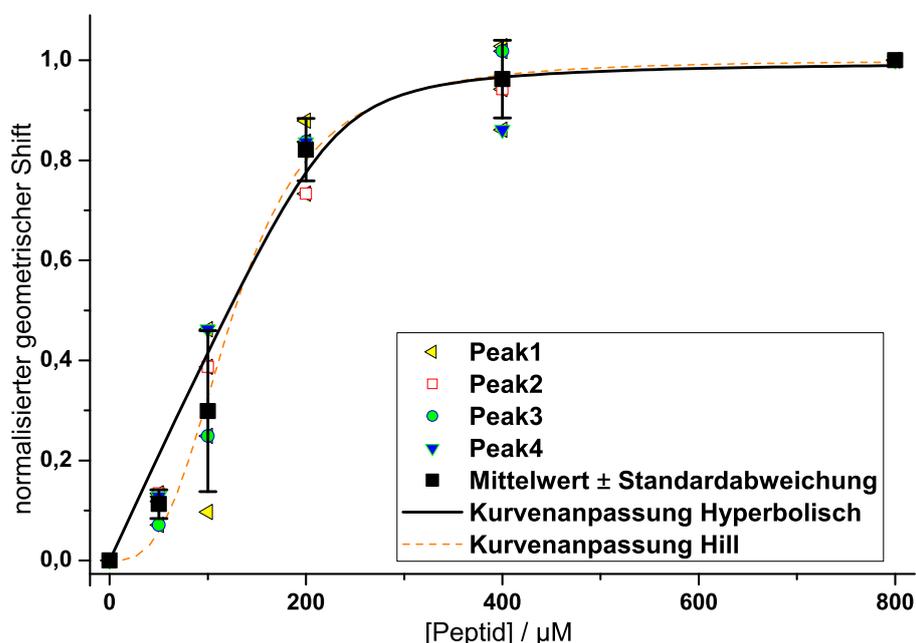


Abbildung 3.20: Titration von Fyn-SH2 mit ADAP-Phosphopeptid. Die Änderung der chemischen Verschiebungen für vier Resonanzen im $^1H^{15}N$ -HSQC von Fyn-SH2 (300 μ m) wurde gegen die Konzentration des zugesetzten Peptids aufgetragen. Schwarze Quadrate: Mittelwert \pm Standardabweichung. Erklärung der beiden nicht-linearen Kurvenanpassungen siehe Text.

bekannt ist, wurde zunächst ein einfaches Bindungsmodell mit zwei Zuständen zugrunde gelegt. Die Kurvenanpassung ließ einen hyperbolischen Verlauf erwarten (siehe 2.2.4). Der hieraus abgeleitete K_d -Wert war $6,2\pm 6,2 \mu$ M (Proteinkonzentration=230 μ M). Mit $R^2=0,975$ war das

Bestimmtheitsmaß der Anpassung aber eher mäßig, was auf einen Fehler bei der Auswahl des Bindungsmodells deuten kann. Als Vergleich wurde eine Anpassung nach dem Hill-Modell für kooperative Bindung durchgeführt (Fit des Mittelwerts). Hiernach ergibt sich ein K_d -Wert von $127 \pm 6 \mu\text{M}$ mit einer Kooperativität von $3,0 \pm 0,4$ ($R^2=0,993$). Da dieses Bindungsmodell eine Allosterie impliziert, die für SH2-Domänen nicht beschrieben wurde, handelt es sich vermutlich um ein Artefakt der Titration bei hohen Proteinkonzentrationen. Hierbei liegt das Protein zunächst im starken Überschuss als Dimer vor, wodurch die Zugabe von geringen Peptidmengen keine detektierbare Wirkung zeigt (siehe 4.1.3, S. 147). Erst bei der Annäherung an äquimolare Verhältnisse von Peptid und Domäne wird die Konzentrations-Effekt-Beziehung linear.

3.2 Lipidbindung

Wie in Abschnitt 1.2.1.4 (S. 23) erläutert, konnte hSH3^C und hSH3^N als Lipidvesikel-bindende Domänen identifiziert werden. Um die Selektivität der ADAP-Bindung an Lipide zu untersuchen, wurde ein komplexes Gemisch von Lipiden eingesetzt, die aus Schweinehirn extrahiert worden waren (kommerzielles Produkt). Dies enthält neben den häufig eingesetzten Lipiden mit Cholin- und Serinkopfgruppen auch eine große Anzahl verschiedener anderer Lipide wie Glycero-, Sphingo- und Glycolipide. Auch die Zusammensetzung der Fettsäureketten ist sehr heterogen und umfasst auch mehrfach-ungesättigte Spezies. Ein solches Gemisch eignet sich zur Abdeckung eines weiten Spezifitätsraumes, falls die Affinität für eine der Komponenten hoch ist.

Abb. 3.21 **A** zeigt den Verlauf der Bindung von hSH3^C an MLV aus Schweinehirnlipiden. Die zugängliche Lipidkonzentration beträgt bei MLVs nur ca. ein Sechstel der totalen Lipidkonzentration. Dies ist eine Abschätzung aus der Beobachtung, dass durchschnittlich drei konzentrische Lipiddoppelschichten in den Vesikeln vorliegen, die Proteinbindung aber nur an der äußersten Einzelschicht stattfindet. Vesikel und daran gebundenes Protein wurden nach Inkubation durch Zentrifugation vom ungebundenen Protein abgetrennt. Der Anteil des nicht-gebundenen Proteins im Überstand wurde über die Tryptophan-

3 Ergebnisse

Fluoreszenz ermittelt ($\lambda_{ex.}=280$ nm, $\lambda_{em.}=350$ nm). Um den K_d -Wert und die Parameter für die unspezifische Bindung zu erhalten, wurde aus dem Massenwirkungsgesetz die folgende Formel abgeleitet:

$$\frac{[P_{geb}]}{[P_0]} = a \left(1 - \frac{-[L] + [P_0] - K_d + \sqrt{([L] - [P_0] + K_d)^2 + 4K_d[P_0]}}{2[P_0]} \right) - b$$

Hierbei steht $[P_{geb}]$ für die Konzentration des gebundenen Proteins, $[P_0]$ für die Gesamtproteinkonzentration und $[L]$ für die zugängliche Lipidkonzentration. Die Parameter a und b korrigieren die Bindungskurve linear und repräsentieren somit den unspezifischen Anteil an der Gesamtbindung. a gibt hierbei die lineare Steigung an und b beschreibt den Abstand zur Abszisse. Hierbei ist in der Regel $b \approx 0$. Die nicht-lineare Kurvenanpassung liefert nur einen apparenten K_d -Wert, da der Bindungsmechanismus zwischen Protein und Lipidmonolayer nicht bekannt ist. In diesem Experiment ist die Anzahl der Titrationschritte gering und $n=1$, sodass der erhaltene apparente K_d -Wert von $1,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$ nicht verlässlich ist. Die Kurvenanpassung ergab $a = 0,88 \pm 0,02$. In diesem Fall ist der Anteil der unspezifischen Bindung somit zu vernachlässigen. Die Größenordnung des apparenten K_d -Werts entspricht den Werten für die Bindung an Vesikel mit einem Verhältnis PC:PS=1:1.

In **B** wird exemplarisch ein Vergleich der Lipid-Affinitäten von hSH3^N und hSH3^C dargestellt. Hier wurden große unilamellare Vesikel (LUVs) eingesetzt, deren Aufbau und Größe zellulären Vesikeln wie frühen Endosomen ähnlicher ist als multilamellare Vesikel. Ein qualitativer Vergleich der apparenten Dissoziationskonstanten ergibt eine deutlich geringere Affinität der hSH3^N-Domäne ($K_d=135 \pm 25 \mu\text{M}$) im Vergleich zur hSH3^C-Domäne ($K_d=22 \pm 5 \mu\text{M}$).

3.2.1 Einfluss von Lipiden auf die in vitro-Phosphorylierung

Die Bindung von ADAP, insbesondere hSH3^C an Lipide kann die Kinetik von Interaktionen mit anderen Proteinen ändern, da die Diffusion eingeschränkt wird und die lokale Konzentration steigt. Des Weiteren liegt Fyn im zellulären Umfeld durch Myristoylierungen und Palmitoylierungen zumindest teilweise membrangebunden vor. Die eingesetzte Fyn-Präparation ist löslich, der genaue Grad der Acyl-Modifikation

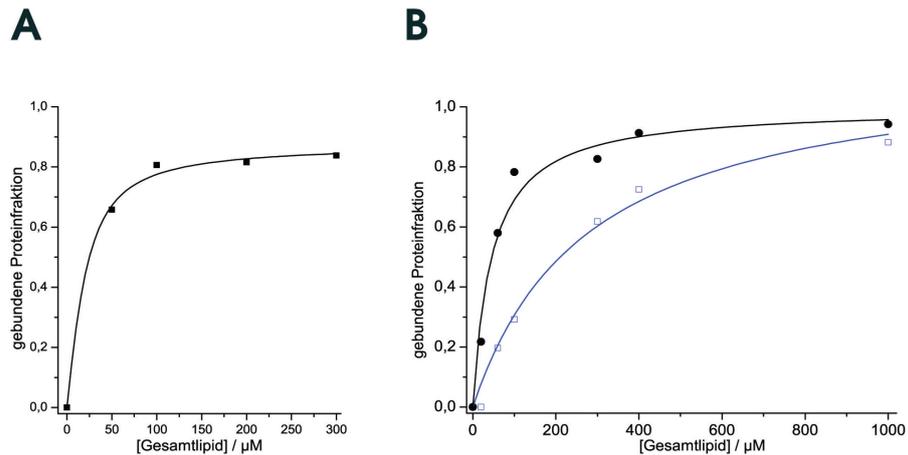


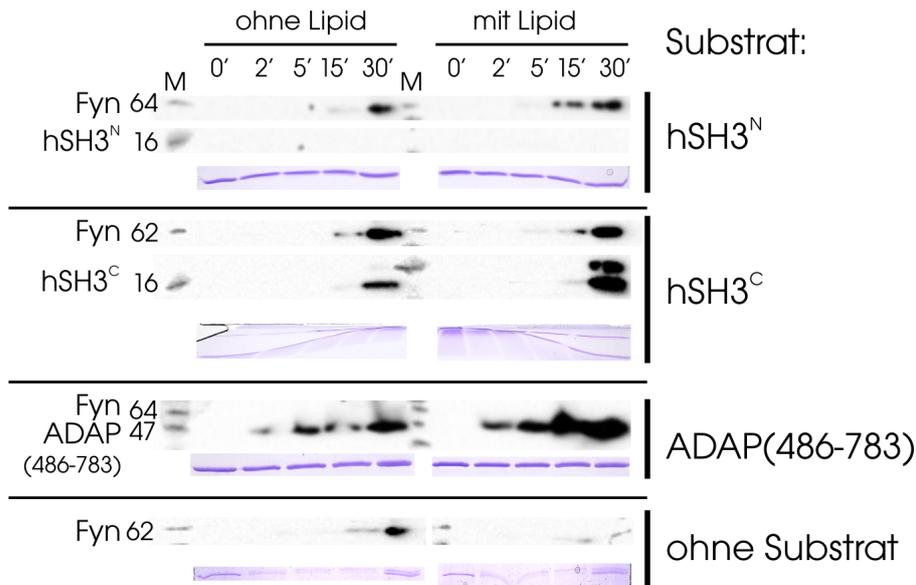
Abbildung 3.21: **Bindung von hSH3^C und hSH3^N an Lipidvesikel.** Auftragung der gebundenen Proteinfraction gegen [Lipid]. **A** Kosedimentation von hSH3^C mit MLVs aus Schweinehirnlipiden. [hSH3^C]=3 μM , [DTT]=1,5 mM. **B** Vergleich der Bindung von hSH3^N (blaue Quadrate) und hSH3^C (schwarze Kreise) an LUVs der Zusammensetzung PC:PS:PI(4,5)P₂=50:46:4. [Protein]=2 μM

von Fyn ist aber nicht bekannt. Um einen möglichen Einfluss der Lipidbindungen auf die Kinetik der ADAP-Phosphorylierung *in vitro* zu untersuchen, wurden daher Phosphorylierungsassays in Gegenwart von 100 μM LUVs mit PC:PS:PI(4,5)P₂=50:48:2 durchgeführt. Abb. 3.22 zeigt den Verlauf der Phosphorylierung der Domänen und des Konstrukts ADAP(486–783). Als Kontrolle der vergleichbaren Proteinmengen sind auf einem separaten Gel die Proben aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt worden. Die Verzerrungen bei Proben mit hSH3^C beruht auf einem defekten SDS-PA-Gel.

hSH3^N wird erwartungsgemäß nicht detektierbar phosphoryliert. In Anwesenheit von Lipid scheint die Autophosphorylierung von Fyn möglicherweise etwas beschleunigt zu sein. hSH3^C wird offenbar besser phosphoryliert, wenn Lipidvesikel zugegen sind. Auffällig ist hier das Auftreten einer zweiten Bande bei höherem Molekulargewicht. Dies könnte eine phosphorylierte Spezies sein, die in anderen Versuchen ohne Lipide in der Regel nicht auftritt. Die Autophosphorylierung von Fyn ist in diesem Ansatz unverändert. Bei ADAP(486–783) ist das Gesamtsignal wesentlich stärker. Die Expositionszeit bei der ECL-gekoppelten Detektion war im gezeigten Fall nur 10 s (alle anderen:

3 Ergebnisse

5 min.) Die Phosphorylierungsgeschwindigkeit mit Vesikeln war auch hier deutlich erhöht. Bereits nach 2 min. war ein deutliches Signal vorhanden. Die Autophosphorylierung wurde hier nicht detektiert, was auch an der geringeren Expositionszeit liegen könnte. Als Kontrolle wurde Fyn ohne Substrat inkubiert, wobei der oben genannte Trend zu schnelleren Phosphorylierungen mit Lipid umgekehrt wurde. Ein Phosphotyrosinsignal für Fyn in Gegenwart von Lipiden entwickelt sich kaum.



Detektion: anti-Phosphotyrosin

Abbildung 3.22: **Phosphorylierungsverlauf verschiedener ADAP-Konstrukte mit Fyn in Gegenwart von LUVs.** Phosphotyrosindetektion (grau) und Coomassie-gefärbtes Protein (separates Gel) im zeitlichen Verlauf (0-30 min.) in Abwesenheit (links) oder Anwesenheit von 100 μ M LUV (PC:PS:PI(4,5)P₂=50:48:2). Art des Substrates siehe rechte Seite.

3.2.2 Einfluss der Redox-Bedingungen auf die Lipidbindung

Die N-terminale hSH3-Domäne von ADAP zeigt reversible Strukturänderungen unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen (Zimmermann & Freund, 2005; Zimmermann *et al.*, 2007). Diese Beobachtung wirft die Frage nach dem Einfluss dieser Änderung auf weitere Eigenschaften von ADAP auf. Die Lipidbindungseigenschaften von hSH3^N

sind deutlich schlechter als die der C-terminalen Domäne (s. Abb. 3.23 **B**). Diese Beobachtungen wurden ohne Zusatz von Reduktions- oder Oxidationsmitteln gemacht. Um eine Veränderung der Affinität unter definierten Redox-Bedingungen zu ermitteln, wurden Vesikel-Kosedimentationsassays in Anwesenheit von Dithiothreitol (DTT) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) durchgeführt. In Abb. 3.23 wird die Bindung von hSH3^{N} unter diesen Bedingungen verglichen. Dabei zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Die eingesetzten Lipide PC und PS enthielten jeweils einen gesättigten Acylrest (Palmitoyl) und einen einfach ungesättigten (Oleoyl). $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ stammte aus Schweinehirn und enthält eine heterogene Mischung aus gesättigten und ungesättigten Fettsäureresten (Verhältnis 0,76). Dies ist im Falle der oxidativen Bedingungen von Belang, da hier eine Oxidation der Acylketten potenziell Auswirkungen auf die Vesikelstruktur und Bindungsfähigkeit haben könnte. Ein solcher Einfluss wird hier nicht beobachtet. Bei einem Fit mit den Durchschnittswerten aus drei Experimenten sind die apparenten Dissoziationskonstanten $132 \pm 12 \mu\text{M}$ (reduziert) bzw. $115 \pm 15 \mu\text{M}$ (oxidiert). **B** zeigt einen Vergleich der Mittelwerte der Dissoziationskonstanten (\pm Standardfehler) bei individueller Anpassung für jedes Einzelexperiment. Die Mittelwerte betragen $138 \pm 25 \mu\text{M}$ (reduziert) und $101 \pm 18 \mu\text{M}$ (oxidiert). Der Unterschied ist nicht signifikant ($P=0,19$ im paarweisen t-Test). Auch die Integrität des Proteins blieb unter den reduzierenden und oxidierenden Bedingungen erhalten (siehe **C**).

3.2.3 Lipidbindung mit steigenden PIP_2 -Konzentrationen

Papayannopoulos *et al.* (2005) konnten zeigen, dass für das Actin-Regulationsprotein N-WASP (*neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*) eine Kooperativität der $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ -Bindung zu beobachten ist. Die Gesamtlipidkonzentration wurde dabei konstant gehalten und Vesikel mit steigenden PIP_2 -Mengen eingesetzt. Der Hill-Koeffizient lag bei 3,1 für die Bindung. Analog dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit daher der Einfluss von $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ auf die Bindung hSH3^{C} untersucht. Abb. 3.24 zeigt die Ergebnisse, die in einer normierten Form in Heuer *et al.* (2005) veröffentlicht worden sind. In diesem Experiment wurden für jeden Titrationspunkt Vesikel mit unterschiedlichem PS- und $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ -Anteil hergestellt. Der Anteil von PS wurde linear zum Anteil von

3 Ergebnisse

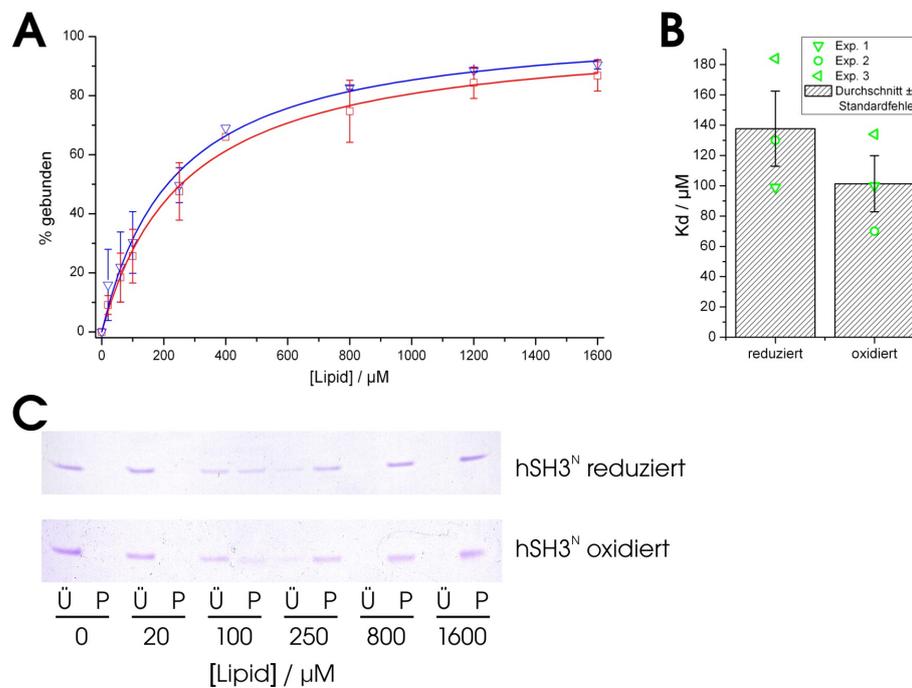


Abbildung 3.23: **Bindung von hSH3^N an Lipidvesikel unter reduzierenden oder oxidierenden Bedingungen.** 1,5 μM hSH3^N wurden in Gegenwart von 3 mM DTT („reduziert“) oder 1 mM H₂O₂ („oxidiert“) mit steigender Konzentration von LUVs der Zusammensetzung POPC:POPS:PI(4,5)P₂=54:44:2 inkubiert und sedimentiert. **A** Auftragung der Mittelwerte der gebundenen Proteinfraktion \pm Standardabweichung gegen die Gesamtlipidkonzentration (n=3). Reduziert: rote Quadrate, oxidiert: blaue Dreiecke. Nicht-lineare Kurvenanpassung gemäß Gl. 3.2. **B** K_d -Werte aus Einzelfits (grüne Symbole) und deren Mittelwert \pm Standardfehler (schwarze Balken). **C** Coomassie-gefärbte hSH3^N-Banden nach SDS-PAGE der gebundenen (P) und nicht gebundenen (Ü) Proteinfractionen.

PI(4,5)P₂ vermindert. Die Gesamtlipidkonzentration wurde bei 200 μM konstant gehalten. Die resultierende Konzentration von PI(4,5)P₂ war dementsprechend 0-40 μM (0-20 μM zugängliches Lipid). Die Kurvenanpassung liefert in diesem Fall keinen echten K_d -Wert, da auch eine Bindung an PS beobachtet wird, wenn kein PI(4,5)P₂ in den Vesikeln vorhanden ist. Die anfängliche Bindung beträgt daher ca. 23% (entsprechend dem linearen Ausgleichsparameter $b=-0,23\pm0,03$, $a=0,94\pm0,07$). Unter Vernachlässigung der PS-Bindung ergibt sich ein apparenter K_d von $5,3\pm1,5 \mu\text{M}$. Bei Anpassung mit einer Hill-Funktion, die für den Ordinatenschnittpunkt modifiziert wurde (nicht gezeigt), wird ein ähnlicher K_d -Wert ermittelt ($4,8\pm0,9 \mu\text{M}$). Der Hill-Koeffizient beläuft sich auf $1,4\pm0,3$, eine signifikante Kooperativität tritt also hier nicht auf.

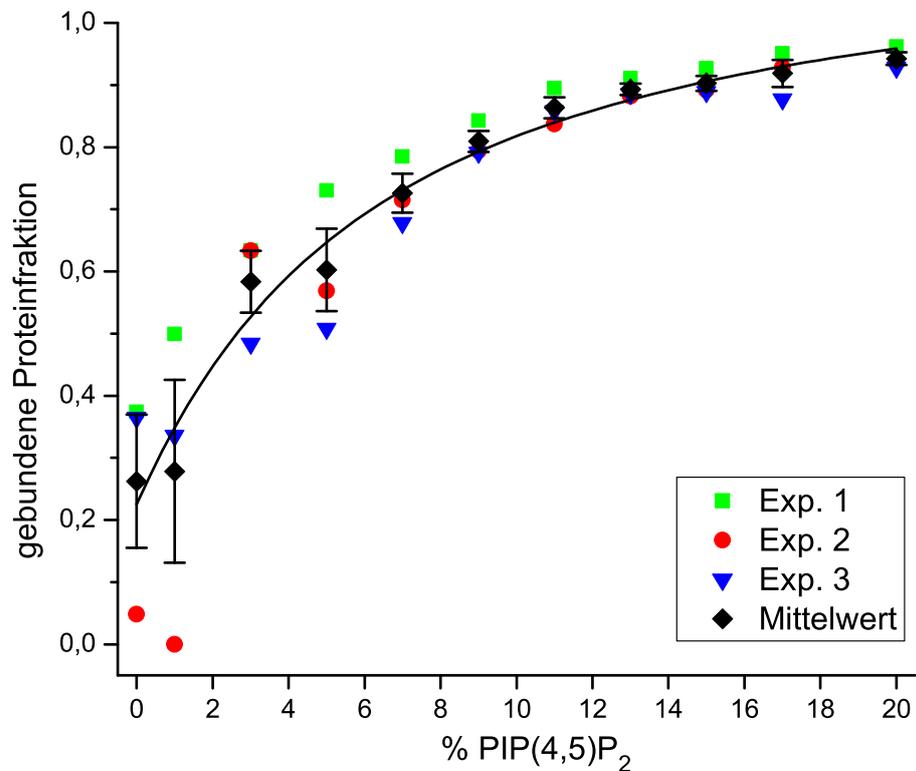


Abbildung 3.24: **hSH3^C-Bindung an PI(4,5)P₂-enthaltende Vesikel.** LUV-Kosedimentation. PC:PS:PI(4,5)P₂=60:40-x:x, [Gesamtlipid]=200 μM und [hSH3^C]=1,5 μM . Die Werte aus den Einzelmessungen sind farblich markiert (siehe Legende), der Mittelwert \pm Standardfehler und nicht-lineare Kurvenanpassung in schwarz.

3.2.4 Selektivität der hSH3^N-Bindung an verschiedene Lipidspezies

Für Affinitätsbestimmungen der Domänen an Lipidvesikel wurde vorwiegend die Standardzusammensetzung mit PC, PS und eventuell PI(4,5)P₂ eingesetzt. Die niedrige Affinität von hSH3^N in diesen Experimenten führte zur Suche nach Lipidspezies, die eine höhere Affinität zwischen LUVs und der Domäne vermitteln können. Hierzu wurden Vesikel hergestellt mit Lipiden, die verschiedene Kopfgruppen trugen oder sich in ihrer Acyl-Zusammensetzung unterschieden.

3.2.4.1 Selektivität gegenüber dem Acylrest

Zum Vergleich verschiedener Sättigungsgrade von Acylketten wurden LUVs präpariert, die PC mit Dipalmitoyl (PC, 16:0 = C₁₆, 0 Doppelbindungen), Palmitoyl/Oleoyl (PO, 16:0/18:1) oder Stearoyl/Arachidonyl (SA, 18:0/20:4) enthielten. Merkmale der eingesetzten Lipide und Abkürzungen sind der Tabelle 3.4 zu entnehmen.

Aufgrund der hohen Phasenübergangstemperaturen der gesättigten Fettsäuren war die Vesikelherstellung nicht vollkommen identisch zwischen den Lipiden. Die Proteinpräparation für Wildtyp-hSH3^N war zudem nicht homogen: ein bedeutender Teil des Proteins war nicht bindungskompetent (vermutlich durch Entfaltung). Dies ist im direkten Vergleich mit den Daten für die Cys_{2519,520}Ser₂-Mutante augenfällig, die überwiegend an Vesikel gebunden ist (Abb. 3.25). Daher werden hier nur qualitative Aussagen gemacht. Beide Proteine zeigen tendenziell die gleiche Selektivität. DP- und SA-Acylreste verbessern die Bindung im Vergleich zu PO-Acylresten. Die Redox-Bedingungen scheinen die Bindung in keinem Fall zu beeinflussen. Daher kann eine bedeutsame oxidative Schädigung der Lipidvesikel an den ungesättigten Fettsäureresten ausgeschlossen werden. Ob die unterschiedliche Bindung verschiedenen Acylketten oder unterschiedlichen Lipidkonzentrationen aufgrund von Präparationsproblemen geschuldet ist, lässt sich hier nicht abschließend entscheiden. Falls eine Acyl-Spezifität vorhanden ist, ist sie für beide hSH3^N-Konformere identisch. Zur Charakterisierung der Cys_{2519,520}Ser₂-Mutante siehe 3.2.4.3 (S. 130).

Kopfgruppe	Acylreste	Abkürzung	Bemerkung
Phosphocholin	Palmitoyl/Oleoyl (16:0/18:1)	POPC	
	Dipalmitoyl	DPPC	
	Stearoyl/Arachidonyl (18:0/20:4)	SAPC	
Phosphoserin (Glycerol)	Palmitoyl/Oleoyl	POPS	
	Diocetyl	DOctG	keine Kopfgruppe, nur Glycerol-Rückgrat
	Palmitoyl/Oleoyl	POG	
Phosphat	Palmitoyl/Oleoyl	POPA	
Inositolphosphat	Dipalmitoyl	PI(X)P	3', 4'- oder 5'-Phosphat
Inositolbisphosphat	heterogenes Gemisch, haupts. 18:0, 20:4, ges./unges.=0,76	PI(4,5)P ₂	aus Schweinehirn
Phosphocholin	Sphingosin und heterogenes Gemisch, haupts. 18:0, 24:1, ges./unges.=3,5	Sph	Sphingomyelin

Tabelle 3.4: Übersicht der eingesetzten Lipide

3.2.4.2 Kopfgruppenselektivität

Für hSH3^N wurde eine mögliche Kopfgruppenselektivität erkundet, indem LUV mit der Zusammensetzung POPC:POPS:X=50:45:5 (Konzentration des Gesamtlipids=800 μ M) mit Protein inkubiert wurden und nach Sedimentation der Vesikel die nicht gebundene Proteinfraction bestimmt wurde. Um eine mögliche Affinitätsänderung unter reduzierenden / oxidierenden Bedingungen zu erfassen, wurden Ansätze mit DTT oder H₂O₂ hergestellt. Ergebnisse hierzu sind in Abb. 3.26 zusammengefasst. Die Kontrolle mit PC:PS=50:50 zeigte die erwartete Bindung von 60-70%. Ungeladenes Diocetyl-glycerol (DOctG) bzw. Palmitoyl-Oleoyl-Glycerol (POG) vermindern die Bindung bereits deutlich. Für DOctG war auch ein deutlicher Unterschied zwischen reduziertem und oxidiertem Protein vorhanden (44 und 59%), der bei identischer Kopfgruppe

3 Ergebnisse

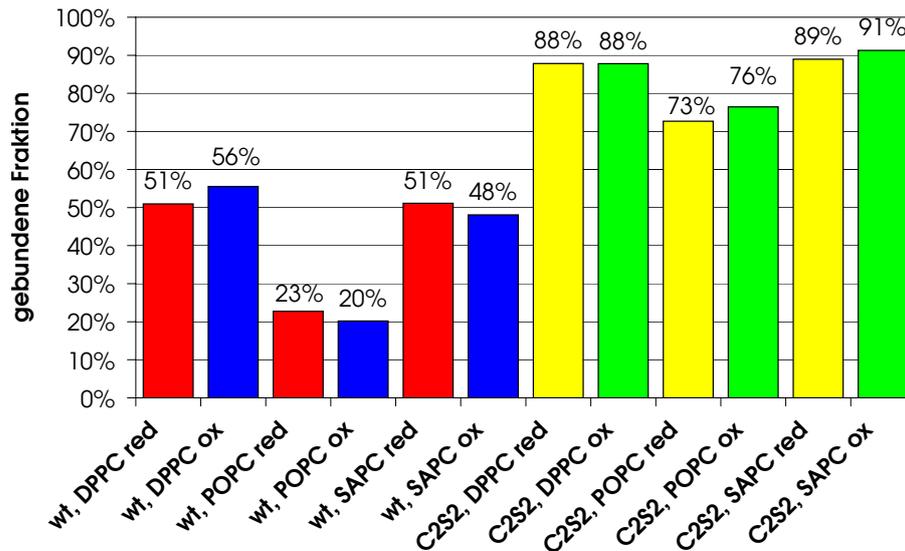


Abbildung 3.25: **Bindung von hSH3^N Wildtyp und Mutante an Lipide verschiedener Sättigung.** [Lipid]=500 μ M, PC:PS=50:50, [Protein]=2 μ M, [DTT]=3 mM (rote/gelbe Balken), [H₂O₂]=1 mM (blaue/grüne Balken). Wildtyp-Daten in rot/blau, C₂S₂-Mutante in gelb/grün. Abkürzungen der Acylreste siehe Text und Tabelle 3.4. n=1

mit POG nicht auftrat. Phosphatidat (POPA) bewirkte keine stärkere Bindung als PC:PS=50:50, obwohl seine Ladung ca. -1,5 beträgt. Die einfach phosphorylierten Phosphatidylinositolphosphate (PI(X)P) sind in PC-Vesikeln dreifach negativ geladen (van Paridon *et al.*, 1986), die Bindung ist jedoch etwas höher (PI(3)P), gleich (PI(4)P) oder schlechter (PI(5)P) als bei reinen PC:PS-Vesikeln. Dies kann jedoch im Rahmen der Messungengenauigkeit liegen. In einem Folgeexperiment wurde dieser Trend nicht beobachtet. PI(4,5)P₂, mit einer Ladung von -4 zeigt hingegen die zuvor beobachtete etwas höhere Affinität. Überraschend ist der stark negative Effekt von Sphingomyelin (Sph).

3.2.4.3 Charakterisierung der hSH3^N-Mutante Cys₂519,520Ser₂

Um die Empfindlichkeit von hSH3^N gegenüber Redox-Bedingungen zu eliminieren, wurden die Cysteine 519 und 520 zu Serin mutiert. Diese Mutation sollte die elektronische Struktur des reduzierten Dicysteins simulieren und somit die Konformation der reduzierten Domäne nachahmen. Um die strukturelle Integrität zu überprüfen und für die

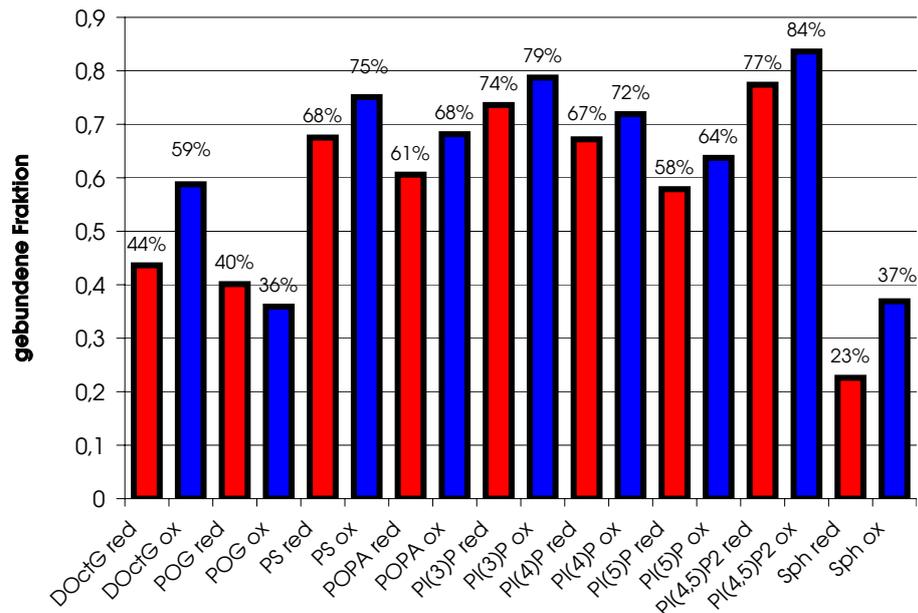


Abbildung 3.26: **hSH3^NBindung an Lipide mit unterschiedlichen Kopfgruppen.** [protein]=2 μ M, [LUV]=800 μ M, [DTT]=3 mM (rote Balken), [H₂O₂]=1 mM (blaue Balken). Abkürzungen der Lipide siehe Text.

Identifizierung von Ähnlichkeiten mit der reduzierten oder oxidierten Variante des Wildtyp-Proteins wurde ein ¹H¹⁵N-HSQC dieses Proteins aufgenommen und mit den Spektren für das Wildtyp-Protein verglichen. Abb. 3.27 zeigt eine Überlagerung der drei Spektren. Die Daten für das reduzierte und oxidierte Wildtyp-Protein wurden von Zimmermann *et al.* (2007) publiziert. Die Nummerierung der Aminosäuren beginnt hier mit Lys¹⁰ (entspricht Lys⁴⁹⁵ im Gesamtprotein). Die Zuordnung des eingeführten Ser³⁴ (121,5 ppm/9,35 ppm) kann nur anhand der Nähe des Peaks zum Cys³⁴-Signal vermutet werden, da keine weitergehenden Spektren aufgenommen wurden. Für Ser³⁵ kann keine Zuordnung gemacht werden.

Das Spektrum der Mutante weist hauptsächlich Signale auf, die eher mit der reduzierten Form überlagern. Der oxidierten Form ähnlicher ist die Lage für Lys78. Der Grund hierfür ist unklar. Im Allgemeinen ähnelt das Spektrum der Mutante am ehesten der reduzierten Form. Auch wenn das isolierte HSQC-Spektrum die räumliche Struktur nicht vollständig abbildet, ist somit die Ähnlichkeit der Mutante mit der reduzierten Form sehr wahrscheinlich. Da die redox-empfindlichen

3 Ergebnisse

Cysteine nicht mehr Teil des mutierten Proteins waren, sollte die Redox-Umgebung keinen Einfluss haben auf die Struktur. Um die zu testen, wurde die Mutante mit 0,2 mM oxidiertem und 0,2 mM reduziertem Glutathion inkubiert und ein HSQC-Spektrum aufgenommen (oxidierende Bedingungen). Anschließend wurde reduziertes Glutathion mit einer Endkonzentration von 15 mM zugesetzt und erneut ein Spektrum aufgenommen. Ein Peak trat neu auf, ansonsten waren die Spektren identisch (Daten nicht gezeigt). Die Mutante ist somit wie erwartet nicht redox-sensitiv.

3.3 Weitere Bindungsstudien

3.3.1 hSH3^N-Interaktionspartner

Die besonderen Redox-Eigenschaften von hSH3^N und die Beobachtung, dass diese Domäne im Gegensatz zu hSH3^C Lipide nur mit geringer Affinität bindet, motivierten die Suche nach einem Proteinbindungspartner. Hierzu wurde hSH3^N als His₆-Konstrukt gereinigt und anschließend an einer Ni²⁺-NTA-Matrix im Säulenformat immobilisiert. Jurkat-Lysate wurden unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen auf die Säule aufgetragen und gebundene Proteine zunächst mit Hochsalz-Puffer und anschließend mit EDTA-haltigem Puffer eluiert. Mit 1 M NaCl wurden keine Proteine von der Matrix eluiert, im Folgenden wird daher nur das EDTA-Eluat erwähnt. Abb. 3.28 zeigt die Auftrennung der Eluate in der SDS-PAGE (Acrylamidgradient 4-12% Bis-Tris-Puffersystem mit MOPS-Laufpuffer). Auf der rechten Seite wurde die Matrix nach Elution aufgetragen, als Kontrolle für die Vollständigkeit der Elution. Bis auf Restmengen von hSH3^N (an der Lauffront) sind kaum weitere Proteine vorhanden. Als Vergleich für unspezifische Bindung an die Affinitätsmatrix sind jeweils Lysat-inkubierte Matrix-Proben mit und ohne gekoppelter Domäne nebeneinander aufgetragen. Die unspezifische Bindung an Matrix schien im reduzierten Fall geringer zu sein. Die meisten Banden, die in Anwesenheit von hSH3^N binden, sind auch ohne die Domäne unspezifisch gebunden. Die mit Pfeilen markierten Banden wurden als Kandidaten für spezifische Bindung ausgeschnitten und nach tryptischem Verdau massenspektrometrisch

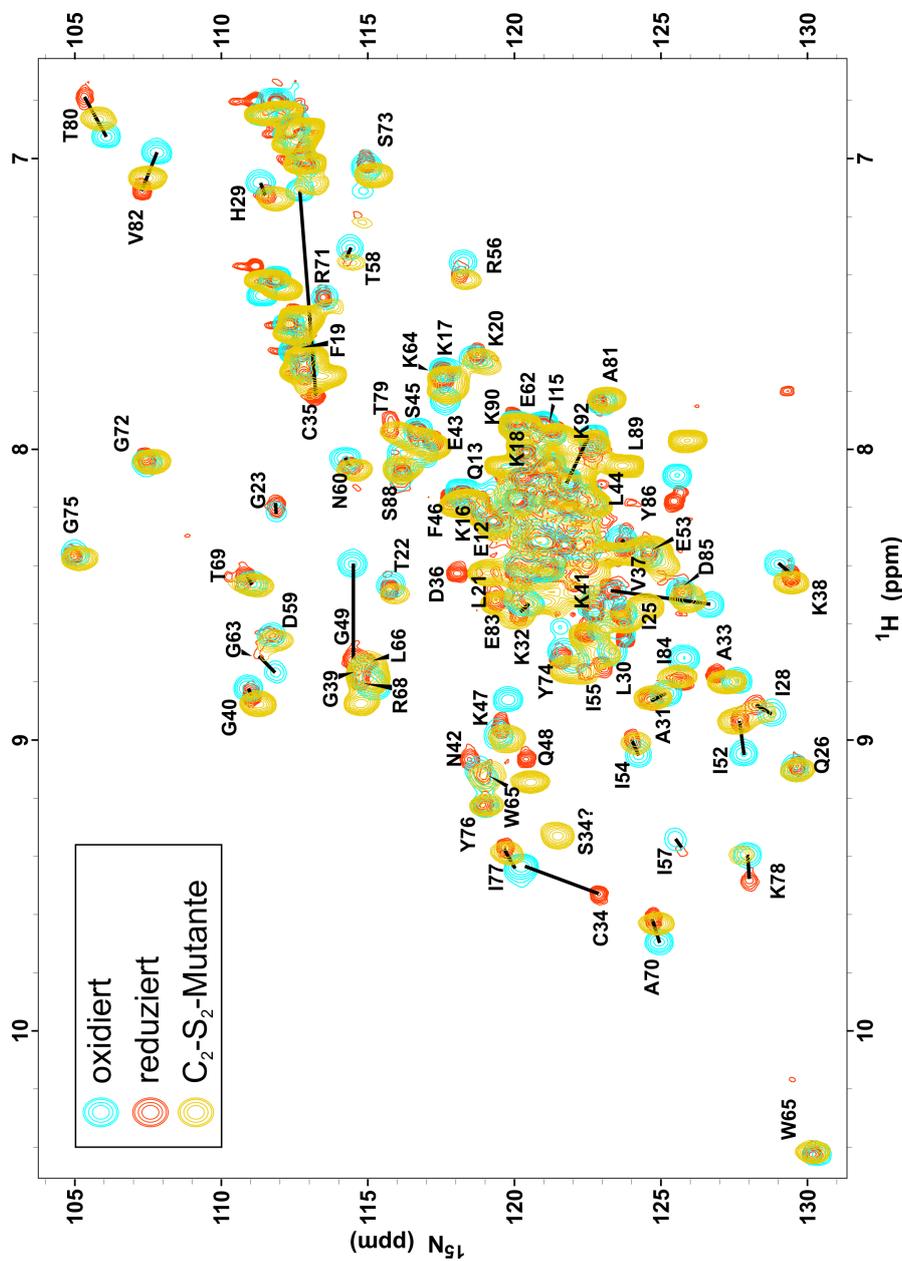


Abbildung 3.27: $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Überlagerung von Wildtyp-hSH3^N und Cys₂Ser₂-Mutante. Die Überlagerung der oxidierten (blau) und reduzierten (rot)-HSQC-Spektren ist Zimmermann *et al.*, 2007 entnommen. In gelb: HSQC-Spektrum der Cys₂Ser₂-Mutante. Deutliche Verschiebungen von Resonanzen zwischen reduzierter und oxidiert Variante sind mit schwarzen Balken markiert.

3 Ergebnisse

untersucht. Bei beiden Laufhöhen wurden Banden sowohl für reduzierende als auch oxidierende Bedingungen gesehen. Die untere markierte Bande war unter oxidierten Bedingungen jedoch stärker als für reduzierende, daher wurde nur diese analysiert.

In der Bande mit höherer elektrophoretischer Mobilität (ca. 15 kDa) fanden sich neben ADAP-Peptiden nur Fragmente des 40S-ribosomalen Proteins S19 (berechnetes Molekulargewicht=15,1 kDa). Ein Protein, das bei ca. 25 kDa migriert, aber nur im oxidierten Ansatz angereichert wird, ist LSm12 (zur Zeit der Durchführung hypothetisches Protein FLJ30656, 21,6 kDa). Es gehört zur Familie der Sm-ähnlichen Proteine, die mit RNA assoziiert sind in Prozessen wie prä-mRNA-Spleißen, Telomerreplikation und mRNA-Abbau (Fleischer *et al.*, 2006). Einer der Bindungspartner ist die *IκB-related kinase ε*, die in der Interferon-Induktion eine Rolle spielt (Ewing *et al.*, 2007). Die Banden bei 25 kDa enthalten sowohl für den reduzierten wie den oxidierten Ansatz Peptide der *Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5* (CFIm25, 26,2 kDa). Es bindet ebenfalls RNA und könnte somit indirekt mit hSH3^N binden, da die Domäne deutlich positiv geladen ist. Hierfür liegen aber keine weiteren Hinweise vor. Ein weiteres Protein, das hSH3^N reduziert und oxidiert zu binden scheint, ist HT014. Dieses Protein wird der Familie der Thioredoxin-Ähnlichen zugerechnet.

3.3.1.1 HT014-Bindungsstudien

LSm12 und CFIm25 wurden wegen ihrer RNA-Bindungseigenschaft als möglicherweise falsch positive Bindungsproteine zunächst nicht weiter untersucht. HT014 ist hingegen im Kontext einer Redox-Regulation denkbar. Für eine genauere Abklärung der Bindung zwischen HT014 und hSH3^N wurde die cDNA des kompletten Proteins in pGex- und pET-Expressionsvektoren für *E.coli* eingebracht. Das His₆-HT014-Konstrukt konnte nicht in ausreichenden Mengen mit befriedigender Stabilität isoliert werden. Das gereinigte GST-Fusionsprotein wurde in Bindungsexperimenten mit ADAP-hSH3^N eingesetzt. Dabei wurde entweder GST-HT014 auf Glutathion-Sepharose oder His₆-hSH3^N auf Ni-NTA-Agarose immobilisiert. In Vorexperimenten wurde hSH3^N unspezifisch an GSH-Sepharose gebunden. Daher wurde die Waschprozedur schrittweise angepasst und 0,1% (v/v) Tween-20, sowie 0,6% (w/v)

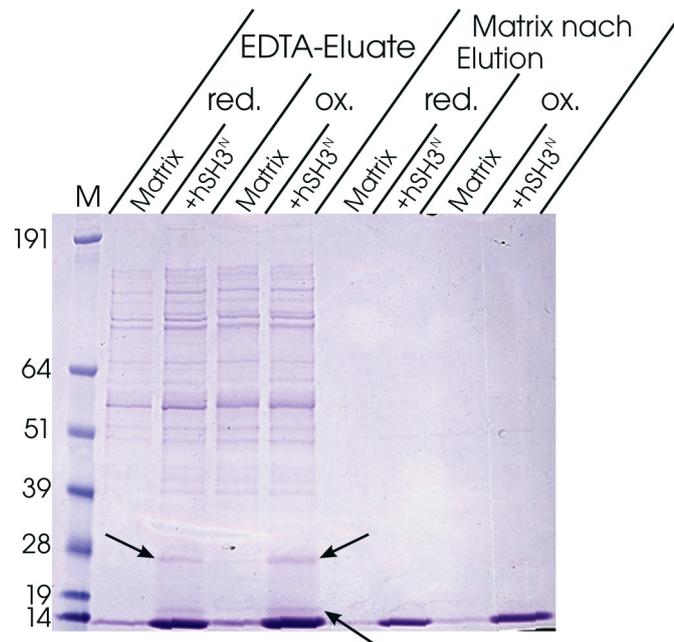


Abbildung 3.28: **hSH3^N-Affinitätschromatographie unter Redox-Bedingungen.** Coomassie-Färbung der SDS-PAGE von EDTA-Eluaten und Kontrolle der Elution nach Affinitätschromatographie von Jurkat-Lysaten an immobilisierter hSH3^N-Domäne unter reduzierenden oder oxidierenden Bedingungen. „Matrix“ markiert Ni²⁺-NTA-Sepharose ohne Domäne, die mit Lysat inkubiert worden war, „+hSH3^N“ markiert immobilisierte Domäne, die mit Lysat inkubiert worden war. Die Pfeile sind auf Proteinbanden gerichtet, die massenspektrometrisch analysiert wurden. MW(hSH3^N)=12,0 kDa

BSA eingesetzt. Die Abb. 3.29 **A** zeigt ein Bindungsexperiment, in dem GST-HT014 mit hSH3^N inkubiert wurde. Nach den Waschschrritten ist keinerlei Bindung der ADAP-Domäne zu erkennen, HT014 ist hingegen in großen Mengen auf der Matrix gebunden. In einem reziproken Experiment (**B**) wurde hSH3^N auf Ni-NTA-Matrix immobilisiert. Hierbei wurde kein BSA eingesetzt, die Tween-20-Konzentration war 0,05% und 10 mM Imidazol wurden zugesetzt. Zusätzlich wurden alle Schritte unter reduzierenden oder oxidierenden Bedingungen durchgeführt. Auch hier konnte keine Bindung von HT014 an hSH3^N gezeigt werden. In einem weiteren Ansatz wurden HT014, hSH3^N, hSH3^C und ADAP (486-762) in Yeast-Two-Hybrid-Vektoren eingebracht und eine Wachstumsselektion transformierter Hefezellen durchgeführt. Auf Medien mit geringem Selektionsdruck zeigte sich mit HT014 als Prey auch in Ge-

3 Ergebnisse

genwart eines leeren oder hSH3^C-kodierenden Bait-Vektors Wachstum. Sobald der Selektionsdruck erhöht wurde (Nutzung einer dreifachen Auxotrophie in Anwesenheit von 3-Amino-1,2,4-triazol) konnte keine Interaktion mehr nachgewiesen werden. Interessanterweise führte ein als Negativkontrolle geplantes Konstrukt mit einer GYF-Domäne mit HT014 immer zu Koloniebildung.

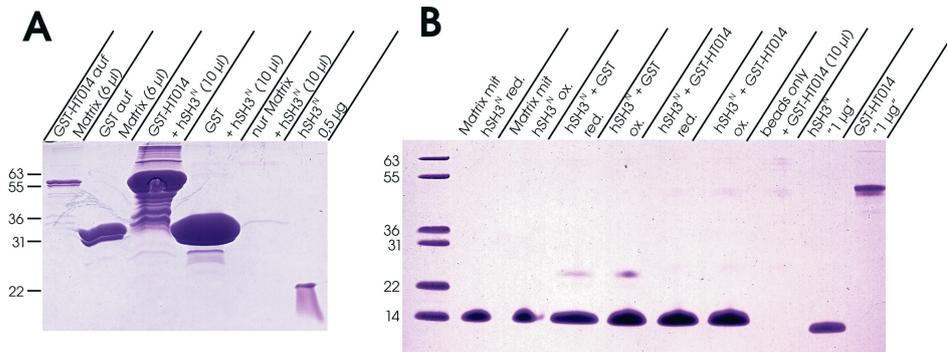


Abbildung 3.29: **HT014-Bindungsexperimente an hSH3^N**. **A** Immobilisiertes GST-HT014 und His-hSH3^N unter stringenten Waschbedingungen. **B** His-hSH3^N auf Ni-NTA-Matrix, inkubiert mit GST-HT014.

3.3.2 Carma1-Bindung

Im Verlauf dieser Arbeit beschrieben Medeiros *et al.* (2007) Carma1 als Bindungspartner für ADAP und grenzten den interagierenden Bereich auf einen Abschnitt ein, der mit hSH3^N überlappt. Um diese Bindung näher zu charakterisieren wurden verschiedene Carma- und ADAP-Konstrukte hergestellt. Damit sollten die Interaktionsbereiche der Proteine eingegrenzt werden. Abb. 3.30 **A** gibt einen Überblick über die verwendeten Konstrukte in Bindungsstudien. Nicht alle GST- und His₆-Fusionskonstrukte konnten hergestellt werden, da die Ausbeute oder Löslichkeit schlecht waren. Tendenziell waren GST-Konstrukte besser löslich. Verkürzungen der hSH3^N-Domäne bis As. 541 waren nur mit geringerer Ausbeute zu reinigen. Abbildungsteil **B** markiert den Bereich der Domäne, der in diesem Konstrukt nicht enthalten ist. Verschiedene *E.coli*-Expressionsstämme wurden getestet. Konstruktabhängig wurde BL21(DE3) mit und ohne zusätzlichen tRNAs für die Verbesserung der Expression von DNA mit seltenen *E.coli*-Kodonen eingesetzt. Die

3.3 Weitere Bindungsstudien

Standardexpressionstemperatur wurde auf 20°C in Verbindung mit autoinduzierendem Medium festgelegt. Die typischen optischen Dichten bei Ernte lagen zwischen 10 und 13 (OD_{600}). Die Bindungsstudien mit zellulären Proteinen beruhten auf der Detektierbarkeit von Carma1 und ADAP mit Antikörpern im Western-Blot. Für ADAP ist diese Detektion problemlos, während Carma1 durch sein größeres Molekulargewicht und geringere Konzentration in der Zelle sowie schlechtere Antikörper zunächst nicht zu detektieren war. Abb. 3.31 zeigt die erfolgreiche Detektion von Carma1 und ADAP auf einer Membran nach Western-Transfer. Jurkat Zellen waren mit leerem Flag-Expressionsvektor oder Flag-ADAP-Vektor transfiziert worden. Durch Erhöhung der Spannung und der Transferzeit konnte der Proteintransfer optimiert werden. Die gleichzeitige Detektion von ADAP und Carma war möglich. Im gezeigten Tris-Acetat-Gel (7%) ist die elektrophoretische Mobilität von ADAP höher als in Tris-Glycin-Systemen. Die Zuordnung der vorgefärbten Markerbanden ist nur eine Näherung, da dieser Standard für das Puffersystem vom Hersteller nicht geeicht wurde. Aus der Quantifizierung von Carma geht hervor, dass sich dessen Expression scheinbar nicht verändert bei Überexpression von ADAP.

In Abb. 3.32 **A** ist eine Immundetektion von Carma gezeigt, das an immobilisierte ADAP-Konstrukte bindet. Diese wurden mit Lysaten von nicht stimulierten oder TCR-Antikörper-stimulierten Jurkat-Zellen inkubiert. Die Detektion ist bereits aus dem Lysat sehr schwach und unspezifische Bindungen treten hervor. Der Vergleich zwischen GST und GST-hSH3^N zeigt jedoch ein deutliches spezifisches Signal in Gegenwart der ADAP-Domäne. Das N-terminal erweiterte ADAP-Konstrukt („CESn“ - ADAP(460-579)) präzipitiert Carma in geringerem Maß, allerdings ist die Menge des immobilisierten Proteins deutlich geringer. ADAP(486-783) („dbl“) scheint zumindest aus unstimulierten Zellen kein Carma zu binden. Für die stimulierten Zellen ist die Aussage nicht eindeutig möglich, da hier versehentlich auch das CESn-Konstrukt gebunden war. In einem weiteren Experiment mit größeren Mengen Zelllysate an immobilisierten ADAP-Fragmenten wurden im Coomassiegefärbten Gel eine Reihe von Proteinen detektiert, die an hSH3^N und CESn banden. Diese Banden tauchten an hSH3^C nicht auf. Insbesondere eine Bande bei ca. 130 kDa passte zum Carma1-Molekulargewicht.

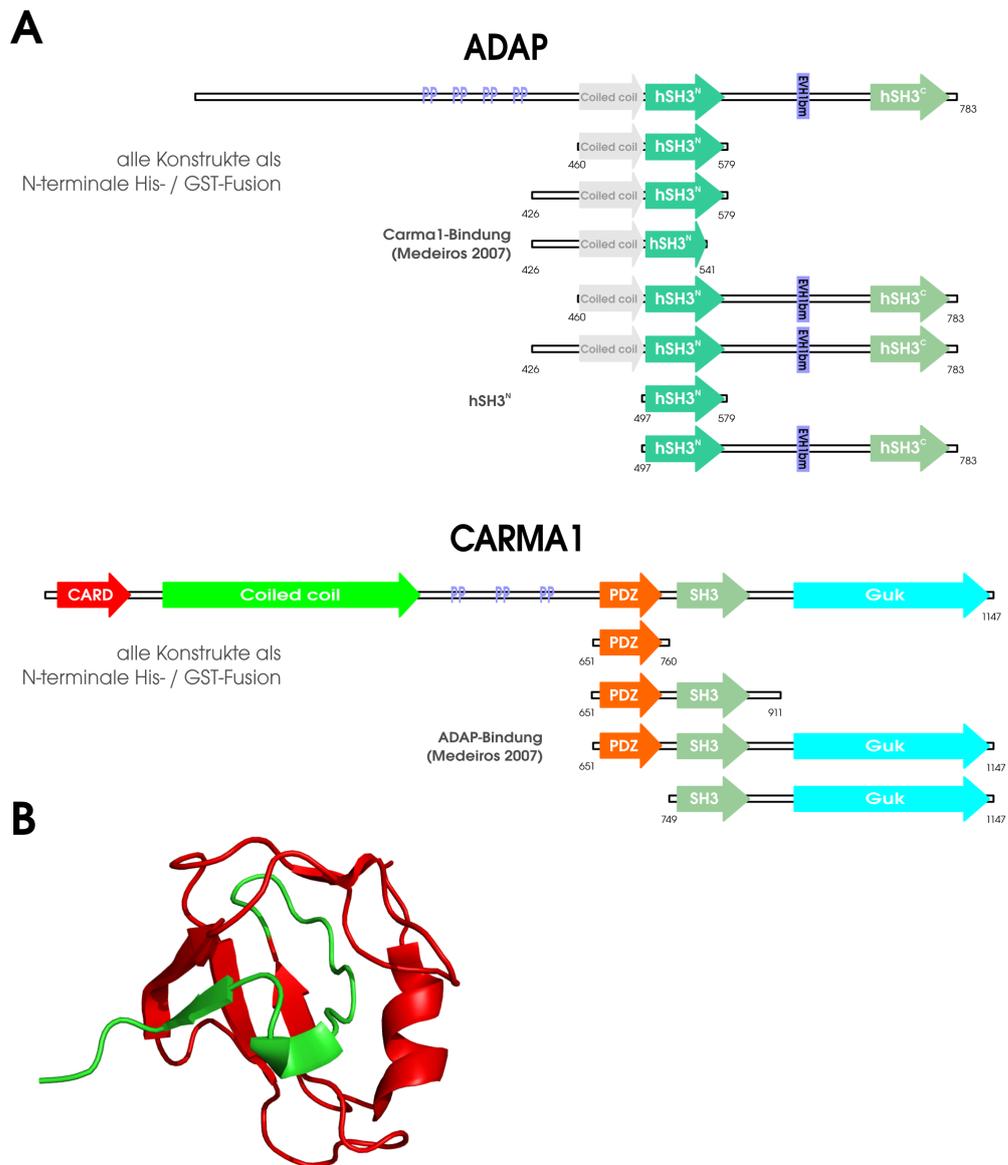


Abbildung 3.30: Übersicht der Carma- und ADAP Konstrukte für Bindungsstudien. **A** Schematische Darstellung der Primärsequenzen von ADAP und Carma1 mit den Grenzen der Konstrukte, Domänen und besonderen Sequenzmerkmalen. „EVH1bm“: Bindungsmotiv für EVH1-Domänen. „PP“: prolinreiche Sequenz. **B** Dreidimensionale Struktur hSH3^N (reduziert). Grün: Teil der Sequenz, der im Konstrukt 438-553 enthalten ist, rot: nicht im Konstrukt (ab T⁵⁵⁴, Medeiros *et al.*, 2007).

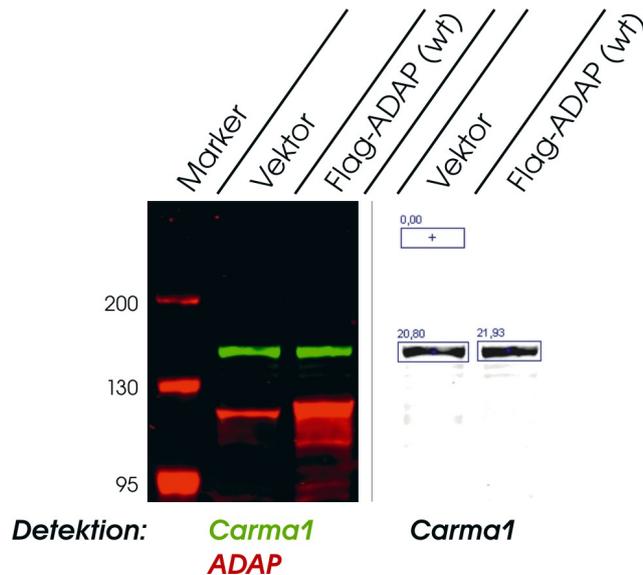


Abbildung 3.31: **Carma1- und ADAP-Immundetektion nach Western-Blotting.** Lysate (130.000 Zellen) von Flag-ADAP- oder Leervektor-transfizierten Jurkatzellen wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western-Transfer mit anti-Carma1 (Kaninchen) oder anti-ADAP (Maus) monoklonalen Antikörpern gleichzeitig detektiert (Odyssey Infrarot-Imager). Links: Überlagerung beider Signale, rechts: nur Carma1-Signal mit Quantifizierung. Markerzuordnung nur näherungsweise.

Massenspektrometrische Untersuchung ergab die Bindung des COPI-Coatomeer-Komplexes mit den Untereinheiten α (138 kDa), β , γ und δ . Carma1 wurde nicht identifiziert. Die Konstrukte hSH3^N und CESn enden mit einer Sequenz, die dem COPI-Erkennungsmotiv (KLKKD-COOH) entspricht. An GST-ADAP(486–783) war das einzige spezifisch bindende sichtbare Protein Ku86. Dieses ist ein Bestandteil des Ku70/86-Dimers, welches eine ssDNA-abhängige Helikasefunktion ausübt. Die Bindung von rekombinanten, gereinigten Carma-Fragmenten *in vitro* sollte die Abschnitte identifizieren, die für die Bindung verantwortlich sind und eröffnete gleichzeitig die Möglichkeit den Einfluss biochemischer Zustände wie Redox-Status und Phosphorylierung zu untersuchen. In 3.32 **B** ist das Ergebnis eines Bindungsexperiments als Coomassie-gefärbtes Gel zu sehen. Hierbei sind die verschiedenen GST-ADAP-Konstrukte nebeneinander aufgetragen, um deren unterschiedliches Bindungsverhalten zu demonstrieren. Die PDZ-Domäne wird von GST-hSH3^N nicht stärker gebunden als von GST. Eine deutli-

3 Ergebnisse

chere Bindung wird mit GST-CESn erreicht, an GST-dbl sogar eine recht starke unter Berücksichtigung der geringeren Menge an immobilisiertem GST-dbl (zwischen 55 und 66 kDa). Dies könnte allerdings auch durch unspezifische Bindung an freie GSH-Matrix vermittelt sein. Die

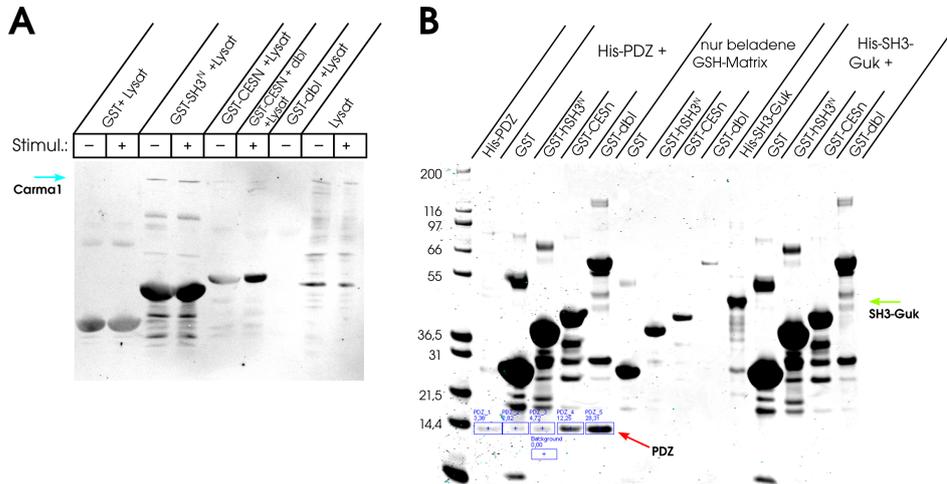


Abbildung 3.32: **Kosedimentation von Carma-Fragmenten mit ADAP-Konstrukten.** Immobilisierte GST-ADAP-Konstrukte wurden mit His-Carma1-Fragmenten inkubiert und nach dem Entfernen nicht gebundener Proteine per SDS-PAGE aufgetrennt. **A** Immundetektion von Carma1 nach Western-Blotting von gebundenen Jurkat-Proteinen, die mit immobilisierten ADAP-Konstrukten inkubiert wurden. „→“ markiert zelluläres Carma1. „Stimul.“: Lysate aus stimulierten (+) oder nicht stimulierten (-) Zellen. „CESn“: ADAP(460–579), „dbl“: ADAP(486–783) **B** Coomassie-gefärbte Proteine. „↗“ markiert Carma-PDZ (Kästchen markieren Quantifizierungsbereiche), „←“ weist auf Carma-SH3-Guk.

Bindung des Carma-SH3-Guk-Konstrukts an ADAP-Fragmente konnte hier nicht gezeigt werden. Für den ADAP-Bereich 486–783 („dbl“) lässt sich dies auch nicht ausschließen, da beide Proteine komigrieren. In reziproken Bindungsexperimenten mit immobilisierter Carma-GST-PDZ konnte eine Bindung von ADAP(486–783), (460–579), hSH3^C oder hSH3^N nicht gezeigt werden. Im selben Experiment wurde jedoch auch rekombinantes ADAP voller Länge eingesetzt. Die Bindung an GST-PDZ und -SH3-Guk ist in Abb. 3.33 gezeigt.

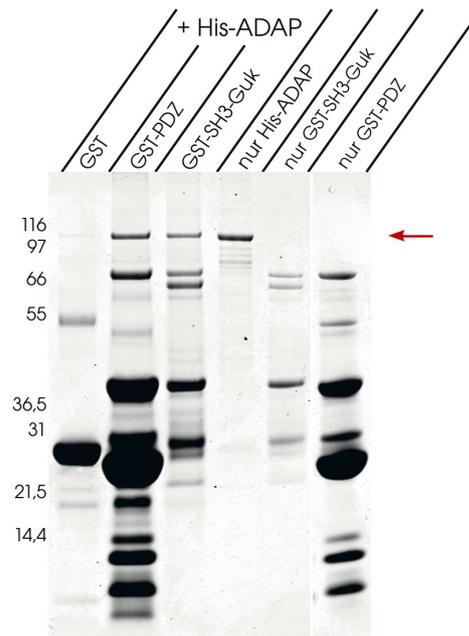


Abbildung 3.33: ADAP-Bindung an GST-Carma-PDZ. Gereinigtes His-ADAP voller Länge (\leftarrow) wurde mit immobilisierter PDZ-Domäne von Carma gebunden. Spur „nur GST-PDZ“ aus separatem Gel.

3.3.3 SKAP55-Kompetition mit hSH3^C

Die Bindung von SKAP55 an ADAP wird hauptsächlich über prolinreiche Sequenzen in der N-terminalen Hälfte von ADAP vermittelt (Marie-Cardine *et al.*, 1998). Es wurde aber auch eine Interaktion des SKAP55-Peptids T²⁸⁸RRKGDYASYQ³⁰⁰ mit einem C-terminalen Bereich von ADAP beschrieben (Duke-Cohan *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2000). Das verwendete ADAP-Konstrukt (As. 695–762) hat jedoch abweichende Eigenschaften von der strukturell charakterisierten hSH3^C-Domäne (As. 683–769 mit strukturiertem Bereich 689–765). Daher wurde der Einfluss eines analogen Peptids auf die Bindung von hSH3^C an Lipidvesikel untersucht. Das eingesetzte Peptid umfasste As. 288–300 und war nicht phosphoryliert. Zur Kosedimentation von 2 μ M hSH3^C wurden 480 μ M (Gesamtkonzentration) LUVs der Zusammensetzung PC:PS:PI(4,5)P₂=60:38:2 eingesetzt. Die Peptidkonzentration wurde von 0–230 μ M variiert. Durch Auftrennung von Überstand und pelletierter Fraktion mit SDS-PAGE und Coomassie-Färbung wurde der Einfluss der Konzentration auf die Proteinbindung untersucht. Abb. 3.34 **A** zeigt,

3 Ergebnisse

dass die Peptide in diesem Polyacrylamidgel nicht gut sichtbar gemacht werden können, was aufgrund der Menge von ≤ 42 ng auch den Erwartungen entspricht. Bei hohen Konzentrationen (100 und $230 \mu\text{M}$) wurde beim Entfärben kurzzeitig eine diffuse Färbung nahe der Lauffront erkennbar. Auffällig ist eine Verminderung der gebundenen Proteinmenge bei Peptid-Konzentrationen ab $30 \mu\text{M}$. Die densitometrische Auswertung in **B** zeigt, dass die gebundene Fraktion bei noch höheren Peptidkonzentrationen nicht auf 0 sinkt. Im Überstand lässt der reziproke Verlauf nicht so deutlich nachvollziehen. Auch ohne Lipid ist eine nicht-gebundene Fraktion detektierbar und diese steigt nur in verhältnismäßig geringem Maße an. Auffällig ist das Auftreten einer Doppelbande unbekannter Natur. Da das lipidgebundene Protein nur eine Bande zeigt, handelt sich vermutlich um eine Verunreinigung.

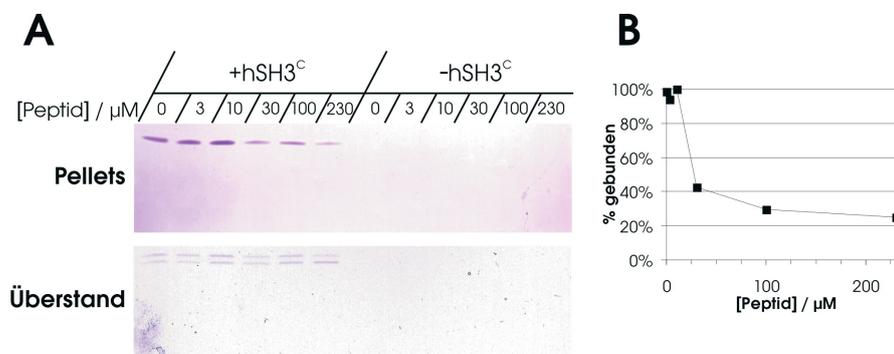


Abbildung 3.34: Einfluss des SKAP55-Peptids (288-300) auf die Lipidbindung von hSH3^C. [Lipid]= $480 \mu\text{M}$, [hSH3^C]= $2 \mu\text{M}$. **A** Coomassiegefärbte Banden von gebundenem Protein (oben) und nicht-gebundenem Protein (unten). Rechte Hälfte: Fraktionen ohne hSH3^C. **B** Densitometrische Auswertung der Pellet-Protein-Banden und Darstellung als gebundene Fraktion gegen die Peptidkonzentration.

3.4 Funktionale Studien

3.4.1 Nukleäre Lokalisation

Aus der Primärstruktur werden zwei Kernlokalisierungssignale (NLS) vorhergesagt. Diese jeweils zweiteiligen Sequenzen befinden sich unmittelbar vor den strukturell charakterisierten Domänen. Da die Funktionalität dieser Motive unklar war, wurden die Lokalisation von drei

ADAP-Abschnitten untersucht, die die möglichen NLS enthalten. Diese wurden als Fusionsprotein zwischen GST und GFP hergestellt. (Begitt *et al.*, 2000; Eguchi *et al.*, 1997). Tabelle 3.5 gibt eine Übersicht über die Konstrukte und die enthaltenen Sequenzmerkmale. Nach Reinigung

Bezeichnung	As. Anfang	As. Ende	Merkmale
PNLS1	660	703	NLS2
PNLS2	660	783	NLS2, hSH3 ^C , C-Terminus
PNLS3	475	783	NLS1, hSH3 ^N , Linker, NLS2, hSH3 ^C , C-Terminus

Tabelle 3.5: Übersicht der ADAP-Konstrukte zur Kernlokalisation

der *E.coli*-exprimierten Proteine mit GSH-Affinitätschromatographie und Gelfiltration wurden diese durch Mikroinjektion in Hela-Zellen injiziert. Dabei wurde in der Regel das Zytoplasma getroffen, jedoch in Einzelfällen auch der Zellkern. Als Kontrolle des Injektionskompartiments wurde gleichzeitig TRITC-markiertes BSA eingeführt, das weder NLS noch Exportsignal enthält. Repräsentative Mikrographien sind in Abb. 3.35 gezeigt. Aufgrund der Aufnahme mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop war auch der Kernbereich leicht gefärbt. Er hebt sich jedoch deutlich vom Zytoplasma ab und es handelt sich vermutlich um Signale über und unterhalb des Kerns. Die Abgrenzung der Kerne ist durch die Hoechst-Färbung gut nachzuvollziehen. Die Sublokalisierung innerhalb des Zytoplasmas ist bei PNL1 anders als bei BSA, dies ist für die Kernlokalisation jedoch nicht relevant. Die GFP- und TRITC-Signale überlagern in allen Fällen. Das heißt, es wurde weder ein Kernimport- noch -Export festgestellt.

3 Ergebnisse

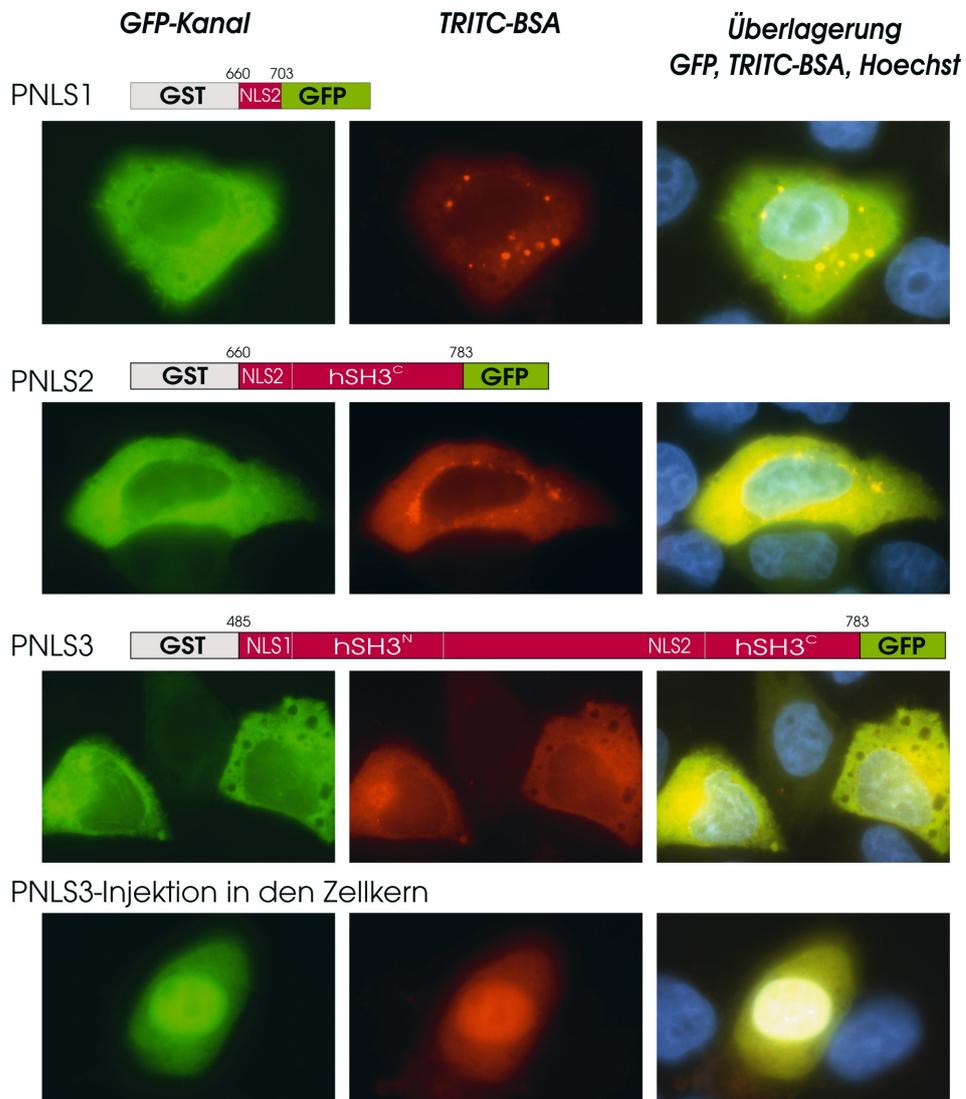


Abbildung 3.35: **Mikroinjektionsexperimente mit GST-ADAP-GFP-Fusionsproteinen.** Exemplarische Fluoreszenzmikrographien von HeLa-Zellen, denen die Fusionskonstrukte PNL1 bis PNL3 injiziert wurden. Linke Spalte: GFP-Signal des Fusionsproteins (grün), mittlere Spalte: TRITC-Fluoreszenz der Injektionskontrolle BSA (rot), rechte Spalte: Überlagerung der ersten beiden Signale mit dem des DNA-Farbstoffs Hoechst33258 (blau).

4 Diskussion

4.1 Phosphorylierung

4.1.1 Kinase-Aktivität

Mit dem gewählten Expressionssystem konnte aktive Kinase (Fyn-Isoform 1) isoliert werden (3.1.1.1, S. 87). Hierbei fiel auf, dass in unterschiedlichen Präparationen Fyn mit scheinbar unterschiedlichen Molekulargewichten auftrat. Neben dem erwarteten Produkt voller Länge (61 kDa), trat auch eine verkürzte Form auf (ca. 55 kDa). Diese unterschied sich jedoch nicht in ihrer Aktivität (Abb. 3.19, S. 119). Außerdem wurden beide über Metallchelate-Affinitätschromatographie aufgereinigt, womit die Gegenwart des C-terminalen His₆-Motivs vorausgesetzt werden kann. Die Immundetektion des *poY*⁵³¹ war ebenfalls möglich, sodass eine N-terminale Verkürzung nach Translation wahrscheinlicher scheint. Fyn ist in Säugerzellen konstitutiv myristoyliert und reversibel S-acyliert (Liang *et al.*, 2004). Der Zustand des isolierten Proteins aus *Sf9*-Zellen ist unbekannt. Möglicherweise ist die Ausbeute gering, weil ein Teil des Proteins acyliert und bei der Aufreinigung ohne Detergenz weniger wasserlöslich ist. Die Analyse mit Massenspektrometrie lieferte hierzu keine Daten. Hingegen konnten die regulatorischen Tyrosinphosphorylierungsstellen von Fyn charakterisiert werden. Tab. 3.3 (S. 114) gibt hierzu einen Überblick. Auffällig ist die deutliche inhibitorische Phosphorylierung nach Aufreinigung (ca. 60%). Das Csk-Ortholog in *Spodoptera* ist noch nicht beschrieben, kommt aber vermutlich vor, da auch *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* darüber verfügen. Allerdings konnte durch Inkubation mit rekombinanter (humaner) Csk eine Erhöhung auf 87% Phosphorylierung erreicht werden. In *Sf9*-Zellen ist möglicherweise auch eine Phosphatase vorhanden, die die Csk-Wirkung teilweise aufheben kann.

Die Phosphorylierungsstelle, die für die vollständige Aktivierung von

4 Diskussion

Fyn modifiziert sein muss (Tyr⁴²⁰), wird hingegen im Expressionssystem kaum phosphoryliert (10%). Gereinigtes Fyn wird wie erwartet in Gegenwart von ATP durch sich selbst an diesem Aminosäurerest phosphoryliert (bis $\geq 80\%$). Dies ist zumindest teilweise für die Erhöhung des Phosphotyrosinsignals von Fyn während der *in vitro*-Phosphorylierungen verantwortlich zu machen.

Die Phosphorylierbarkeit von ADAP(486–783) entsprach den Erwartungen, da die bekannten Tyrosinmotive in diesem Konstrukt enthalten sind. Wie in Abb. 3.3 (S. 90) ersichtlich, konnte die Phosphorylierung durch die Substanz PP2 gehemmt werden. Hierbei handelt es sich um einen Inhibitor, der selektiv Kinasen der Src-Familie hemmt. Eine Kinase-Aktivität durch eine Verunreinigung in der Präparation wird daher nicht angenommen. Die Autophosphorylierung von Fyn war stets reziprok zur Phosphorylierbarkeit des Substrats. In Gegenwart von ADAP(487-783) war die Autophosphorylierung gering.

4.1.2 Aufreinigung von zellulärem ADAP

Die immobilisierte SH2-Domäne von Fyn konnte erfolgreich als Bindungsmodul eingesetzt werden, um zelluläres ADAP zu isolieren (3.10, S.105). Dies ist eine wichtige Voraussetzung, um die Charakterisierung des physiologischen Phosphorylierungszustands des Proteins durchzuführen. Zu dem Zeitpunkt der Durchführung der Isolierung, stand noch kein geeigneter Antikörper zur Verfügung, um ADAP per Immunpräzipitation anzureichern. Außerdem hat die Fyn-SH2-Domäne den Vorteil, bevorzugt phospho-ADAP zu binden und somit die Identifizierung von Phosphopeptiden in der Massenspektrometrie zu erleichtern. Für die quantitative Charakterisierung von Phosphorylierungsmustern aus unterschiedlich behandelten Zellen im SILAC-Experiment wäre dieser Ansatz jedoch weniger gut geeignet.

Die Bindung des ADAP-Peptids um *poY*⁶²⁵ durch Fyn-SH2 war bereits bekannt (Raab *et al.*, 1999), jedoch konnte in dieser Arbeit klarer demonstriert werden, dass der ADAP-Abschnitt zwischen den Domänen in einem System mit gereinigten Proteinen phosphorylierungsabhängig bindet (Abb. 3.11, S. 107). Für die Domänen selbst konnte keine SH2-Bindung beobachtet werden, was aufgrund der fehlenden kognaten Fyn-SH2-Bindungsmotive den Erwartungen entsprach. Die Anwesen-

heit geringer Mengen von Fyn-Gesamtprotein kann die Steigerung der Bindung von ADAP(486–783) nicht begründen, da die Mengen weit unterhalb der stöchiometrischen Verhältnisse lagen. Fyn tritt auch im Coomassie-gefärbten Gel nicht hervor. Auffällig war die Bindung von nicht-phosphoryliertem ADAP(486–783) an Fyn-SH2. Möglicherweise handelt es sich um eine Verunreinigung, die durch stringenteres Waschen eliminiert würde. Es könnte aber auch eine phosphorylierungsunabhängige Interaktion zwischen ADAP und Fyn-SH2 vorliegen. Das ADAP-Peptid, das für die Fyn-Bindung beschrieben ist, ist hierfür jedoch nicht verantwortlich: Es konnte keine nennenswerte Bindung zwischen dem unphosphorylierten Peptid und Fyn-SH2 im NMR-Experiment gefunden werden (siehe folgender Abschnitt).

4.1.3 Charakterisierung der Bindung an Fyn-SH2

Die Titration der SH2-Domäne mit ADAP-Phosphopeptid brachte teilweise erwartete Ergebnisse. So konnte ein deutlicher Bindungseffekt im NMR-Experiment gezeigt werden (3.1.4.4, S. 120). Für unphosphoryliertes Peptid konnte keine Veränderung der chemischen Verschiebungen im NMR-Spektrum beobachtet werden. Bei der Ermittlung des K_d -Wertes für phosphoryliertes ADAP-Peptid zeigte sich das Problem, dass das Standard-Bindungsmodell eines Zwei-Komponenten-Systems (hyperbolische Anpassung, abgeleitet aus den Massenwirkungsgesetz) hier die Daten nur unzureichend erklärt. Zwar wird eine Dissoziationskonstante im niedrigen mikromolaren Bereich ermittelt ($6,2 \pm 6,2 \mu\text{M}$). Dies liegt im oberen (niedrig-affinen) Bereich der beschriebenen SH2-Interaktionen (Ladbury *et al.*, 1995). Das Bestimmtheitsmaß der Kurvenanpassung weist aber mit $R^2=0,975$ auf eine moderate Übereinstimmung zwischen Messung und Modell hin. Schon durch Betrachtung der Kurve fällt auf, dass in den ersten Titrationsschritten der beobachtete Effekt hinter den Erwartungen zurückbleibt. Aufgrund des sigmoidalen Verlaufs wurde ein Hill-Bindungsmodell auf seine Eignung überprüft. Hier ist die Übereinstimmung mit den Messwerten deutlich besser, aufgrund der Berücksichtigung der (theoretischen) Kooperativität ($3,0 \pm 0,4$) wird allerdings ein sehr hoher K_d -Wert ermittelt ($127 \pm 6 \mu\text{M}$, $R^2=0,993$). Die Schlussfolgerung auf das Bindungsverhalten aufgrund der Übereinstimmung mit einem willkürlichen theoretischen Modell ist dabei

4 Diskussion

aber nicht zulässig und diese Kurvenanpassung kann somit nur beschreibenden Charakter haben. Bisher wurde noch keine Kooperativität der Bindung von Phosphopeptiden an einzelne SH2-Domänen gezeigt. Vielmehr handelt es sich wahrscheinlich um eine Folge der Dimerisierung der Fyn-SH2-Domäne bei den hier eingesetzten Konzentrationen (ca. 300 μM). Die Dimerisierung wird bei höheren Ligandenkonzentrationen aufgehoben, da die Phosphopeptid-Bindungstasche mit der Dimerisierungsoberfläche überlappt (Pintar *et al.*, 1996).

4.1.4 Phosphorylierung der Domänen

4.1.4.1 hSH3^C

Es konnte hier zum ersten Mal demonstriert werden, dass die isolierten Domänen hSH3^N und hSH3^C ebenfalls durch Fyn phosphoryliert werden können. In hSH3^N wurde ein Motiv (um Tyr⁵⁷¹) als phosphoryliert vorhergesagt. Das Signal in der Immundetektion nach Western-Blotting war jedoch sehr schwach (Abb. 3.4, S. 93). Erst durch den Einsatz großer Mengen und langer Inkubationszeiten konnte ein starkes Signal erzeugt werden. Hierbei fiel das Auftreten von zwei distinkten Proteinspezies bei Färbung des Gesamtproteins nach Phosphorylierung auf. Die zweite Bande korrespondierte mit einem höheren Molekulargewicht. Vermutlich stellte diese Bande mehrfach phosphoryliertes Protein dar, welches durch das höhere Molekulargewicht langsamer migrierte. Auch die untere Bande erzeugte bereits ein Phosphotyrosinsignal, ist aber möglicherweise nur einfach phosphoryliert.

hSH3^C-Phosphorylierung war in der Regel einfacher zu detektieren, was auf eine schnellere Phosphorylierung oder bessere Erkennung durch den Phosphotyrosinantikörper deuten kann. Der Verlauf der Phosphorylierung ist langsamer als die des Konstrukts, das beide Domänen umfasst (As. 486–783). Dies ist insbesondere bei hohem Substratüberschuss erkennbar. Der Phosphorylierungsverlauf von ADAP(486–783) lässt keine mehrstufige Kinetik erkennen, die als Kombination einer schnellen Phosphorylierung (im Bereich zwischen den Domänen) und einer langsameren Phosphorylierung (von hSH3^C) gewertet werden könnte. Die Daten der *in vitro*-Kinetik sind hierzu zu

ungenau.

In hSH3^C befinden sich mehr Tyrosinmotive als im N-terminalen Domänenkonstrukt. Allerdings hat auch hier nur eines der Motive (um Tyr⁷⁵⁵) hohe Vorhersagewerte. Das Konstrukt endet mit Tyrosin⁷⁷¹ was eine Interpretation der Phosphorylierung dieses Restes in dem Domänenkonstrukt ausschließt (s. 4.1.5). Tyr⁷⁰¹ (Tyr¹⁹ in der hSH3^C-Domäne) ist fast ausschließlich unphosphoryliert gefunden worden, was auch den Erwartungen bei Fyn-Phosphorylierung entspricht. In hämatopoetischen Stammzellen könnte beispielsweise *Vascular endothelial growth factor receptor 2* eine Rolle als Kinase spielen, in Lymphozyten auch Tec. Aufgrund der geringen Konzentration von phosphorylierten Domänen, wurde die Anreicherung mit Hilfe einer kommerziellen Affinitätsmatrix für Phosphoproteine etabliert (Abb. 3.5, S. 95). Die genaue Beschaffenheit der Puffer und der Matrix selbst sind nicht bekannt. Ähnliche publizierte Ansätze nutzen hierfür Titandioxid-Materialien zur Bindung und konzentrierte Phosphatpuffer zur Elution. Die Anreicherung von phosphorylierten Proteinen aus dem *in vitro*-Kinase-Ansatz war erfolgreich. Im Durchlauf und in den Waschfraktionen ging Phosphoprotein verloren. Die eluierten Proteine waren hingegen zum großen Teil phosphoryliert. Dies konnte in der massenspektrometrischen Analyse durch das Fehlen der unphosphorylierten Peptide in Anwesenheit der phosphorylierten Spezies gezeigt werden.

Der Vergleich der Spektren von unphosphorylierter und phosphorylierter Domäne ohne Anreicherung zeigte keine signifikanten Unterschiede (Daten nicht gezeigt). Erst durch die Anreicherung der phosphorylierten Fraktion wurde die Untersuchung von phospho-hSH3^C durch NMR möglich (siehe 3.6, Seite 98). Dabei konnte die Beeinflussung der Struktur durch die Phosphorylierung einzelnen Bereichen der Domäne zugeordnet werden. Die stärkste Veränderung der chemischen Verschiebung fand sich vermutlich bei Tyr⁷³ (Nummerierung des Domänenkonstrukts, welches bei Lys⁶⁸³ beginnt). Die zugehörigen Resonanzen im HSQC-Spektrum der phosphorylierten Domäne sind jedoch nicht eindeutig dieser Aminosäure zuzuordnen. Der entsprechende Peak könnte auch durch Thr³⁶ verursacht sein. Aufgrund der identifizierten Phosphorylierung von Tyr⁷³ ist jedoch eine starke Verschiebung für den Tyrosinrest wahrscheinlicher. Ebenfalls deutlich ist die Veränderung der

4 Diskussion

chemischen Verschiebung für Tyr⁸⁰. Die einfachste Erklärung für diesen starken Effekt ist die Phosphorylierung des betreffenden Tyrosinrests. Die Abb. 3.8 (S. 101) verdeutlicht die Lage der Aminosäuren mit einem Veränderungsindex der chemischen Verschiebung ≥ 45 . Dieser Grenzwert ist willkürlich gewählt worden, um die stärksten Verschiebungen zu kennzeichnen. Weitere Verschiebungen könnten signifikant sein (siehe Diagramm 3.7 auf Seite 99). Dabei fällt auf, dass die Reste in der dreidimensionalen Struktur räumlich weit verteilt sind.

An den hydrophoben Interaktionen zwischen Helix und β -Faltblattstruktur sind Tyr¹⁹ und Tyr⁷⁵ beteiligt. Deren N-H-Resonanzen im HS-QC werden durch die Phosphorylierung nicht gestört. Interessanterweise ist auch für Phe¹³ kein Effekt zu beobachten, obwohl Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit Tyr⁷³ existieren. Phe¹⁷, das ebenfalls mit Tyr⁷³ interagiert, zeigt hingegen eine deutliche Verschiebung der N-H-Resonanz. Mit Ausnahme der genannten Aminosäuren ist ein Großteil der N-terminalen Helix und die folgenden Reste bis Val²⁵ beeinflusst. Es ist zu beachten, dass eine Reihe von Aminosäuren der α -Helix nicht im ¹H¹⁵N-NMR-Spektrum zugeordnet sind. Weitere Effekte könnten also vorhanden sein. Überraschend ist der moderate Effekt für Ile²³ und Arg⁶⁷, welche in direkter Nähe zur Seitenkette von Tyr⁷³ sind. Offenbar wird das Peptidrückgrat an diesen Stellen nicht beeinflusst. Stattdessen tritt ein komplexer Konformationseffekt in Richtung Helix auf, möglicherweise durch eine Drehung des phosphorylierten Tyrosinrests.

Ein weiter entfernter Effekt ist für die Aminosäuren Lys⁴⁸ und in geringerem Ausmaß Gly⁵⁰ zu beobachten. Ein ursächlicher Zusammenhang mit der Tyr⁷³-Phosphorylierung ist nicht zu erkennen. Da in diesem Experiment aber möglicherweise auch Tyr⁸⁰ phosphoryliert wurde (im Gegensatz zu den MS-Analysen des phosphorylierten ADAP[486–783]), könnte diese Veränderung für die beobachteten Verschiebungen im RT-Loop verantwortlich sein. Falls diese Phosphorylierung im Domänenkonstrukt auftritt, stellt sie wahrscheinlich ein Artefakt aufgrund der besonders starken Phosphorylierungsbedingungen dar. Dieses Motiv ist eines der beiden nicht streng konservierten Motive zwischen Maus und Mensch (s. 4.1.6). Eine abschließende Klärung des Phosphorylierungseffekts auf die Struktur der Domänen lässt sich nur durch erneute Strukturbestimmung mit phosphoryliertem Protein erreichen.

Vorzugsweise mit Konstrukten, die die betreffenden Tyrosine deutlich überschreiten, um artifizielle Zugänglichkeit an Konstruktenden zu vermeiden. Hierbei wäre insbesondere Tyr⁴⁶² von Interesse (vor der hSH3^N-Domäne), da es bisher nicht Teil der Analyse war, jedoch wahrscheinlich phosphoryliert ist (s. Abb. 3.1, S. 88).

4.1.4.2 hSH3^N

Die hSH3^N-Domäne wurde nicht separat auf Veränderungen im ¹H¹⁵N-HSQC untersucht, da die Ausbeute von reinem phosphoryliertem Protein sehr gering war. Die identifizierten Phosphorylierungsstellen Tyr⁵⁵⁹ und Tyr⁵⁷¹ sind in Abb. 3.12 (S. 108) hervorgehoben. Eine Besonderheit dieser Domäne stellt die redox-abhängige Konformationsänderung dar. Zwischen reduzierter und oxidiertem Variante bestehen keine großen Unterschiede in der Orientierung von Tyr⁵⁵⁹. Jedoch wird dieser Rest im reduzierten Zustand der Domäne durch umgebende Seitenketten stärker abgeschirmt, vor allem von der α -Helix. Im oxidierten Zustand ist die Hydroxygruppe hingegen deutlich freier zugänglich. Ein Unterschied in der Phosphorylierbarkeit konnte in den durchgeführten Experimenten nicht gezeigt werden. Hierzu wäre ein SILAC-Ansatz sinnvoll, der die Menge von Phosphopeptiden nach *in vitro*-Phosphorylierung unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen vergleicht (Ibarrola *et al.*, 2003). Dies könnte auch Aufschluss über die Zugänglichkeit von Tyr⁵⁶¹ geben. Für diesen Rest wurde keine Phosphorylierung detektiert. Die entsprechenden Vorhersagewerte sind nicht hoch, allerdings auch nicht schlechter als für Tyr⁵⁵⁹. Im reduzierten Zustand ist die Hydroxygruppe des Tyrosinrests schlecht zugänglich, da der Rest mit der α -Helix in Kontakt ist. Aus der Struktur der oxidierten Form kann vermutet werden, dass Tyr⁵⁶¹ besser für die Kinase erreichbar ist als in der reduzierten Form. Zusätzlich müsste natürlich die Motiverkennung gegeben sein.

Tyr⁵⁷¹ stellt laut NetPhos2.0- und GPS-Algorithmen ein gutes Ziel für Fyn dar. Es wurde massenspektrometrisch eindeutig als phosphoryliert identifiziert. Abschätzungen anhand der Intensitäten der Massendetektion deuten einen hohen Phosphorylierungsgrad an (ca. 80%). In der Struktur der Domäne ist dieser Rest am Rand des Bereichs definierter

4 Diskussion

Struktur. Er ist wahrscheinlich leicht für eine Kinase zugänglich, sofern keine Elemente des Gesamtproteins diesen Rest maskieren. In der Regel binden SH2-Domänen gestreckte Peptide, die sich rechtwinklig an die β -Faltblatt-Struktur der Domäne lagern. Neben der Interaktion mit dem Phosphotyrosinrest wird die Spezifität über die Reste in den Positionen +1, +2, +3, zum Teil auch +4, -1 und -2 vermittelt. Im Fall der Fyn-SH2-Domäne ist das Konsensus-Motiv Li *et al.* (2008) zufolge (N/P)(Y/F)poY(E/D/Y)(N/E/T/M)(I/L/V/P)(D/E). Hierbei kommen der negativen Ladung bei Position +1 und dem hydrophoben Rest bei Position +3 die größte Bedeutung zu. Dies wird auch aus der Kristallstruktur der Domäne im Komplex mit einem Peptid ersichtlich (EPQpoYEEIPIYL, Mulhern *et al.*, 1997). Das Peptid ist in diesem Komplex gestreckt und die Seitenketten des Peptid-Aminosäuren Glu (Position +1) und Ile (Position +3) gehen die entscheidenden Kontakte mit der Domäne ein. Unklar ist jedoch, ob die poY⁵⁷¹DSL-Sequenz aus hSH3^N, insbesondere die Seitenketten von Asp⁵⁷² und Leu⁵⁷⁴ genug Flexibilität aufweisen, um die Wechselwirkung mit Fyn-SH2 einzugehen. In der oxidierten Variante zeigt das NMR-Ensemble der hSH3^N-Domäne im Bereich um Tyr⁵⁷¹ eine kurze Helix auf, durch die die poY-, Asp- und Leu-Seitenketten voneinander wegweisen. Eine Bindung an Fyn-SH2 ohne partielle Entfaltung der Domäne ist dadurch eher unwahrscheinlich. Den T₂-Relaxationszeiten und den Variationen im NMR-Ensemble zufolge ist dieser Bereich der Domäne im reduzierten Zustand flexibler und könnte eine gestreckte Konformation des Abschnitts zulassen. Der Bereich um poY⁵⁷¹ sollte in dieser Konformation besser für eine SH2-Bindung geeignet sein, ohne dass eine partielle Entfaltung der Domäne notwendig wäre.

Die Phosphorylierung von Tyr⁵⁷¹ wurde mittlerweile auch in mehreren proteomischen Ansätzen gefunden (Brill *et al.*, 2004; Ficarro *et al.*, 2005; Kim & White, 2006; Zahedi *et al.*, 2008). SH2-Bindungsvorhersagen für dieses Motiv (s. Huang *et al.*, 2007) umfassen die SH2-Domänen aus CRKL, SHIP-2^[1], Tec, Syk (N-terminal) und Yes. Die Sequenz um Tyr⁵⁷¹ stellt ein ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*) dar. Dieses wird vermutlich eher von der SH2-Domäne von SHIP-2 als von SHP-1 oder -2 erkannt. In Makrophagen hat SHIP-2 eine ne-

^[1]SH2 containing inositol phosphatase 2

gative Rolle im M-CSF-abhängigen Signalweg zu NF κ B. Dies würde im Einklang mit einer Bindung an *poY*⁵⁷¹ stehen: SHIP-2 rekrutiert inhibitorische Effektoren zu aktivierten Rezeptorkomplexen in Makrophagen (Timms *et al.*, 1999). ADAP könnte hierdurch das Abschalten des Signalwegs selbst vorbereiten. Analog dazu ist eine solche Funktion für SHPS-1 (SHP-Substrat=SIRP α) gezeigt worden (Timms *et al.*, 1999). Es bindet SHP-1/-2 und findet sich auch im Komplex mit dem ADAP-SKAP-Modul (auch ohne SHP-1). Interessanterweise ist in einem (vermutlich separaten) Komplex SHPS-1 auch an *Protein tyrosine kinase 2 β* (Ptk2 β , Pyk2, FAK2) gebunden (Marie-Cardine *et al.*, 1999). Diese hat eine sehr hohe Vorhersagewahrscheinlichkeit für die Phosphorylierung von Tyr⁷⁷¹, aber auch für Tyr⁴⁶¹, Tyr⁵⁹⁵, Tyr⁶²⁵ und Tyr⁶⁵¹. Außerdem ist die Bindung dieser Kinase an Fyn gezeigt worden (Ganju *et al.*, 1997), wodurch eine Redundanz oder differentielle Regulation von ADAP im Adhäsions-/Migrationskontext denkbar wäre. Wie ADAP hat Ptk2 β eine Rolle im Inside-Out- und Outside-In-Signaling über LFA-1 bei T-Lymphozyten. Eine Bindung von Ptk2 β an SKAP55R ist bereits gezeigt worden, wobei eine Phosphorylierung durch Ptk2 β nicht nachweisbar war (Takahashi *et al.*, 2003).

Auch die Vorhersage der CRKL-Bindung könnte in die gleiche Richtung wirken wie SHIP-2. Das Protein wurde in einem Komplex mit ADAP, Cbl und anderen nach Chemokinstimulation gefunden und ist somit eventuell an der Abschaltung von Signalen beteiligt (siehe 1.2.2.6, S. 30).

Tyr⁵⁷¹ wird wie Tyr⁵⁶¹ als nicht bedeutsam für die Bindung von SLP-76 angesehen (Boerth *et al.*, 2000a). Für *poY*⁵⁵⁹ liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. So konnten Boerth *et al.* (2000a) eine kompetitive Inhibition der SLP-76-SH2-Bindung an ADAP (zellulär) durch das Peptid TARGS*poYGYIKTTAV* ausmachen. Außerdem konnte die ADAP-Y559F-Mutante nicht mehr durch GST-SLP-76-SH2 aus Jurkat-Zelllysaten präzipitiert werden. Andererseits war es Raab *et al.* (1999) nicht möglich mit dem immobilisierten, ähnlichen Peptid RGS*poYGYIKTTA* SLP-76 zu binden, wohingegen dies mit einem Peptid, das *poY*⁵⁹⁵ enthielt gelang. Verkürzungsstrukturen und funktionelle Daten erhärten die Annahme, dass die SLP-76-Bindung von den EV*poY*^{595/651}DDV-Motiven geleistet wird.

4 Diskussion

Das Motiv um As. 559 stellt kein bekanntes Bindungsmotiv für SH2-Domänen dar. Die theoretische Vorhersage ist jedoch lückenhaft und lässt sich auch kaum auf Interaktionen anwenden, die von den Standards abweichen. Andererseits ist auch die Möglichkeit einer artifiziellen Phosphorylierung im durchgeführten *in vitro*-Ansatz gegeben. Hohe Kinase-Mengen und partiell ungefaltetes Substrat können zu falsch positiven Befunden führen. Aufgrund der Deutlichkeit der Daten könnte hier aber eine gezielte Suche nach phosphorylierungsabhängigen Interaktoren lohnend sein. Eine höhere Sicherheit in der Bewertung der Daten könnte durch die Analyse von zellulärem Protein erreicht werden. Eine solche Analyse wurde bereits testweise durchgeführt und ergab die bisher unbekannte Phosphorylierung von Ser⁵⁵⁸. Das zugehörige Sequenzmotiv könnte als Substrat für GSK3, CDK oder PKA dienen. Auch PKC θ könnte dieses Serin phosphorylieren (Vorhersage mit NetPhosK 1.0 und GP2.0), was aufgrund der Bedeutung dieser Kinasefamilie in Immunsignalwegen von besonderem Interesse ist (siehe Abb. 1.7, S. 32).

4.1.5 Identifizierung von Phosphorylierungsstellen außerhalb der Domänen

Zum Phosphorylierungszustand der Tyrosine 4, 387, 462, 625 und 709 liegen keine MS-Daten vor. Sie waren entweder außerhalb des untersuchten Konstrukt (4, 387, 462) oder es wurden keine auswertbaren Peptide gefunden (625, 709). Zu Tyr⁴ und Tyr⁷⁵⁷ siehe Abschnitt 4.1.6. *poY*⁶²⁵ ist bereits vor der Klonierung von ADAP als Fyn-Substrat und -Bindungspartner identifiziert worden (da Silva *et al.*, 1993). Lck und ZAP70 wurden als Kinase für ADAP getestet, aber es wurde eine geringere bzw. keine Phosphorylierung festgestellt (da Silva *et al.*, 1997b; Raab *et al.*, 1999). Andererseits ist die ADAP-Phosphorylierung in Fyn-defizienten Mauszellen stark reduziert, aber nicht vollkommen eliminiert (da Silva *et al.*, 1997a). Mit Hilfe von Verkürzungskonstrukten, Punktmutanten und Peptidbindungsassays konnte die Interaktion von Fyn mit ADAP auf *poY*⁶²⁵ eingegrenzt werden. Weitere experimentelle Hinweise liegen nicht vor, aber die Selektivität der Fyn-SH2-Domäne schließt auch die Motive um Tyr⁴⁶², 571 und 771 ein. Zur Implikation

der Bindung der Kinase an sein Substrat siehe 4.1.8.

Die Bedeutung von poY^{595} und poY^{651} für die SLP-76-SH2 ist akzeptiert (Raab *et al.*, 1999), wenngleich die Bindung an weitere Motive in ADAP nicht ausgeschlossen ist. Die Stärke der SLP-76-Bindung an ADAP folgt der Reihe Wildtyp>Y595F>Y651F>Y₂595,651F₂ (keine Bindung, Geng *et al.*, 1999). Die Phosphorylierung der betreffenden Tyrosine konnte detektiert werden. Dies stellte eine wichtige Positivkontrolle für den Versuch dar, da ansonsten nur zuvor unbekannte Modifikationen gefunden wurden. Die beiden Motive haben eine identische Sequenz, was die Frage nach einer gleichzeitigen Bindung von zwei SLP-76-Molekülen aufwirft. Ist diese Bindung überhaupt möglich, wenn ja, ist sie unabhängig oder kooperativ? Dies könnte durch Peptidtitrationen und Untersuchung von Einzelmutanten geklärt werden. Des Weiteren könnten auch andere SH2-Domänenproteine hier binden. Sehr gute Kandidaten sind Tec, Nck1 und Nck2. Vorläufige unpublizierte Ergebnisse (Kooperation mit U. Stelzl, E. Wanker, MDC-Berlin) lieferten bereits Hinweise, dass die direkte Interaktion zwischen Nck und ADAP phosphorylierungsabhängig stattfinden kann. Hierdurch wäre eine interessante Redundanz in dem Nck-SLP-76-ADAP-Komplex hergestellt. Nck könnte somit neben den EVH1-enthaltenden Proteinen WASP und VASP eine weitere Verbindung von ADAP zur Regulation des Zytoskeletts darstellen. Ob Nck phosphorylierungsabhängig ADAP bindet und ob gleichzeitig SLP-76 an ADAP binden kann, müssen weitere Experimente zeigen.

Tyr⁷⁷¹ liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit phosphoryliert vor (Anteil >20%). Es wird auch als Src-SH2-Bindungsmotiv vorhergesagt. In einer Maus-Makrophagen-Zelllinie wurde die Phosphorylierung und Bindung von Src über das homologe Motiv gezeigt (Koga *et al.*, 2005). Andere Bindungsmotive wurden nicht ausgeschlossen. poY^{595} , poY^{625} und poY^{651} reichen vermutlich nicht aus für die Src-Bindung. ADAP-Knockdown-Studien implizieren eine Funktion von ADAP in der Migration von Makrophagen und der Osteoclastogenese. Eine gezielte Suche nach einer Src-ADAP-Assoziation und -Funktion könnte auch in T-Zellen sinnvoll sein. Am Beispiel der Src-ADAP-Interaktion ist die Schwierigkeit der Entschlüsselung der Substrat-Kinase-Wechselwirkungen erkennbar. Die publizierten Ergebnisse beziehen sich auf eine Kinase und eine Auswahl der möglichen Phosphorylierungsstellen. Zudem wird

4 Diskussion

postuliert, dass die phosphorylierungsabhängige Interaktion direkt ist. Auf allen Ebenen der Interpretation ist jedoch Vorsicht geboten angesichts der Promiskuität der Kinasen einerseits und der Phosphotyrosin-Bindungsdomänen andererseits. Zudem müssen Bindungsexperimente die Frage der Direktheit der Interaktion, der eingesetzten Konzentrationen und der Lokalisation von Substrat und Kinase in der Zelle berücksichtigen.

Für das Motiv um Tyr⁷⁸⁰ wird eindeutig eine Phosphorylierung detektiert, obwohl die Vorhersagen hierzu keinen Hinweis lieferten. Funktionelle Implikationen sind keine bekannt, jedoch existieren interessante Bindungsvorhersagen über verschiedene SH2-Domänen:

Protein	Funktion
<i>SH2 domain-containing protein 2A</i> (SH2D2A)	T-Zellaktivierung
<i>Hematopoietic SH2 domain-containing protein</i> (HSH2D)	CD28-IL-2-Signalweg
<i>GRB2-related adapter protein</i> (GRAP)	Ras-Signalkaskade
<i>Tensin-like C1 domain-containing phosphatase</i> (TENC1)	Zellmotilität

4.1.6 Weitere Analysen der ADAP-Phosphorylierung

Tyr⁷⁵⁷ konnte aufgrund der Daten aus den hier durchgeführten Experimenten als nicht phosphoryliert betrachtet werden. Brill *et al.* (2004); Ficarro *et al.* (2005) identifizierten jedoch Phosphopeptide mit dieser Aminosäure. Es wurde dabei Protein aus Jurkat-Zellen in Anwesenheit von Pervanadat untersucht. Möglicherweise sind andere Kinasen als Fyn an der Phosphorylierung beteiligt. Ausgehend von Vorhersagealgorithmen sind EGF-Rezeptor, Tyk2, Abl2 und Insulinrezeptor-Kinasen hierfür Kandidaten. Aber auch Lyn als Src-Familien-Kinase hat eine kompatible Selektivität zum Motiv YGpoY⁷⁵⁷VLR.

Das N-terminale Motiv MAKY⁴NTG ist möglicherweise ebenfalls phosphoryliert (Ficarro *et al.*, 2005). Es gibt aber keine bekannte SH2-Selektivität für diese Sequenz. Das Motiv ist da einzige, das im Maus-Ortholog ein Phenylalanin statt Tyrosin enthält. Stattdessen ist dort ein anderes Motiv zu finden: PTY⁷⁰EEK. Falls phosphoryliert, wäre unter ande-

rem eine Bindung an die Hck-SH2-Domäne zu erwarten. Daten über funktionelle Unterschiede zwischen Maus- und menschlichem Protein liegen nicht vor. Für künftige funktionelle Untersuchungen der Phosphorylierungsstellen wurden in Zusammenarbeit mit Sabine Geithner acht Konstrukte erzeugt, die jeweils einen Austausch eines relevanten Tyrosins gegen ein Phenylalanin aufweisen. Außerdem wurde die Doppelmutante Y595,651F erzeugt, um den Effekt auf die SLP-76- und eventuell Nck-Bindung zu untersuchen.

4.1.7 Dephosphorylierung von ADAP

Biologische Signale müssen in der Regel an- und abschaltbar sein. Das Entfernen eines Proteins durch Proteolyse kann einen abschaltenden Effekt haben, ist aber aus energetischer Sicht aufwendig. Bei Systemen, die den Phosphorylierungszustand eines Proteins als Informationseinheit nutzen, sind daher Phosphatasen als Gegenspieler der Kinasen beteiligt. Die Anzahl der charakterisierten Phosphatasen ist hierbei deutlich geringer. Eine häufige Konstellation bei der Signalweiterleitung mit Phosphotyrosin stellt die Komplexierung von Kinase, Substrat und Phosphatase dar, wobei die Aktivität der Phosphatase oft im unstimulierten Ruhezustand höher ist als die der Tyrosinkinase. Die Tyrosine sind im Substrat somit weitgehend unphosphoryliert. Nach einem Stimulus wird dann die Kinase aktiviert, und / oder die Phosphatase inhibiert, wodurch das Substrat phosphoryliert werden kann. Als Beispiel für die stimulierte Tyrosinphosphorylierung kann die Signalweiterleitung nach T-Zellrezeptor-(TCR-) Stimulation dienen (Dröge, 2002; Imbert *et al.*, 1994). Der Phosphorylierungszustand vieler Signalmoleküle wie ADAP ist zunächst gering. Nach Rezeptorligation werden die Tyrosinkinasen Lck und ZAP70 aktiviert sowie Phosphatasen wie SHP-2 inaktiviert. Dies geschieht durch reversible Oxidation eines katalytischen Cysteinrestes. Hierfür sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS) verantwortlich, die nach TCR-Stimulation zum Beispiel von einer NADPH-abhängigen Oxidase produziert werden. Auch MAPK-Signalwege werden durch bestimmte ROS aktiviert (Devadas *et al.*, 2002). Resultat ist eine Verschiebung des Phosphorylierungsgleichgewichts zu stärkerer Phosphorylierung. Im Falle der Aktivierung mit löslichen anti-TCR-Antikörpern ist bereits eine Minute nach Ligation

4 Diskussion

eine deutliche ADAP-Phosphorylierung detektierbar. Das Maximum ist nach ca. 5 Minuten erreicht und nach 30 Minuten ist nur noch geringe Phosphorylierung vorhanden. Als Phosphatase, die ADAP und Vav1 dephosphoryliert ist SHP-2 identifiziert worden (Kwon *et al.*, 2005). Andere Phosphatasen sind aber nicht ausgeschlossen. Die vorübergehende Erhöhung der Phosphorylierung von ADAP hat auch funktionelle Implikationen. Als direkte Konsequenz wird die Bindung an SLP-76 ermöglicht. Darauf folgt die Clusterbildung des Integrins LFA-1 und die Verstärkung der Adhäsion von Jurkat-T-Zellen auf Fibronectin. Dieser Effekt unterliegt dann einer zweiten Kinetik, da ADAP bereits dephosphoryliert wird, während die Adhäsion noch anhält. Raab *et al.* (1999) weisen darauf hin, dass die SLP-76-ADAP-Bindung und die ADAP-Phosphorylierung möglicherweise einer langsameren Kinetik folgend können.

Die artifizielle Situation bei der Inkubation großer Mengen von Substrat und Kinase ohne weitere inhibierende (aber auch aktivierende) Komponenten lieferte *in vitro* vermutlich mehr Phosphorylierungsereignisse als in der Zelle zu erwarten sind. Die genauen Mechanismen insbesondere die differentielle Phosphorylierung / Dephosphorylierung einzelner Tyrosine und die daraus resultierende Dynamik der Proteinkomplexe sind zudem noch unklar. Hier sind zeitaufgelöste proteomische Ansätze nötig, da binäre *in vitro*-Systeme die Komplexität nicht abbilden können. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch die grundsätzliche Zugänglichkeit einzelner Aminosäuren durch eine wichtige Kinase demonstriert werden. Dies erlaubt eine gezielte Beobachtung in zukünftigen Experimenten und schafft neue Impulse bei der Suche nach Verknüpfungen von Signalen.

4.1.8 In vitro-Phosphorylierungskinetik

Bei vielen Enzymen ist die Bindung des Übergangszustandes besser als die an das Substrat. Die notwendigen Interaktionen beschränken sich auf diejenigen, die für die nötige Spezifität unverzichtbar sind. Für eine hohe katalytische Effizienz ist die Bindung an das Produkt nicht vorteilhaft. Das hier untersuchte System Fyn-ADAP ist hingegen ein Beispiel für den Fall, dass das Produkt vom Enzym wesentlich stärker gebunden wird und dies möglicherweise zu einer Erhöhung der Enzy-

maktivität führt. Einige Fyn-Substrate sind auch als Bindungspartner beschrieben, bis auf wenige Ausnahmen wurde aber keine phosphorylierungsabhängige Bindung durch die SH2-Domäne gezeigt (TOM1-like und PTPRF, Seykora *et al.*, 2002 bzw. Tsujikawa *et al.*, 2002). Für SKAP55 ist eine Phosphorylierung durch Fyn und die Kosedimentation mit immobilisierter Fyn-SH2-Domäne gezeigt, die Interaktion könnte aber auch zusätzlich über ADAP vermittelt sein, da dies konstitutiv SKAP55 bindet (Marie-Cardine *et al.*, 1999).

Verschiedene Effekte dieser Bindung sind denkbar, jedoch letztlich noch nicht geklärt: Fyn könnte als Membran-proximales Protein ADAP an die Membran rekrutieren, um dort die Inside-Out-Signalkomplexe zu bilden (über SKAP55, RIAM, RAPL). ADAP selbst könnte über einen weiteren Mechanismus (z. B. SLP-76) membrangebunden sein und Fyn aus dem zytoplasmatischen Pool rekrutieren oder membranständiges Fyn lateral in einem besonderen Membranbereich konzentrieren. Eine weitere Möglichkeit ist die Konkurrenz der ADAP-Bindung an Fyn-SH2 mit der Bindung des Fyn-eigenen C-terminalen Abschnitts, sofern dieser phosphoryliert ist. Damit könnte eine zusätzliche Aktivierungsmöglichkeit für Fyn bestehen, ohne dass die Phosphatase CD45 das betreffende Tyrosin dephosphoryliert hätte, zumal das autoinhibitorische Tyrosinmotiv eine geringe Affinität aufweisen sollte (Boggon & Eck, 2004). Die ADAP-Phosphorylierung könnte durch einen kleinen Pool aktiven Fyns oder durch eine weitere Kinase (Pyk2, TXK) initiiert werden. Selbst ohne diese Fyn-aktivierende Rückkopplungsschleife wäre eine Bindung von ADAP an Fyn vorteilhaft für eine nachfolgende Phosphorylierung weiterer Tyrosinmotive in ADAP. Unter der Annahme dieser Mechanismen wurde von Salazar & Hofer (2003) ein kinetisches Modell entworfen, das Vorhersagen zur Phosphorylierungskinetik macht. Hierbei war auffällig, dass die Zeit bis zur vollständigen Phosphorylierung mit steigender ADAP-Konzentration kleiner wird. Bei einfachen enzymatischen Reaktionen ist hingegen die Reaktionszeit zunächst von der Substratmenge unabhängig.

Diese wichtigste Vorhersage aus dem Modell sollte experimentell überprüft werden. Hierzu wurde das *in vitro*-Phosphorylierungssystem Fyn-ADAP zunächst optimiert, um eine verlässliche und unabhängige Quantifizierung der Phosphorylierung von Fyn und ADAP zu

4 Diskussion

ermöglichen (siehe Abb. 3.1.4.1, S. 109). Die Enzymkonzentration wurde konstant gehalten und die ADAP-Konzentration in vier (16°C: drei) Stufen variiert.

Der Versuchsansatz erwies sich nach Optimierung von Temperatur, Proteinmengen und -Verhältnissen als geeignet für das Beobachten der Reaktion. Fyn und ADAP konnten getrennt betrachtet werden, was in anderen Assays nicht ohne weiteres möglich ist (Abb. 3.13, S. 110). Andererseits sind die Limitierungen von Western-Blot-basierten Quantifizierungen nicht zu vernachlässigen. Die diskontinuierliche Probenentnahme birgt Fehlermöglichkeiten und begrenzt die zeitliche Auflösung im Anfangsbereich. Zudem sind die Mengen eingeschränkt, die linear immundetektieren werden. Der dynamische Bereich der eingesetzten fluoreszenzbasierten Sekundärdetektion ist größer als bei Chemilumineszenz-gekoppelten Methoden. Die üblichen Fehlerquellen durch ungleichmäßigen Western-Transfer bleiben aber erhalten.

Der Vergleich der Daten aus unterschiedlichen Experimenten zeigt, dass die absoluten (Hintergrund-bereinigten) Intensitätswerte teilweise sehr gut reproduzierbar sind. Innerhalb eines Experimentes sind die zufälligen Schwankungen gering. Die starken Abweichungen, die sich in weiteren Experimenten ergaben, sind daher eher systematischer Natur. Der Grund ist nicht bekannt. Für einen exemplarischen Vergleich zweier Experimente siehe Abb. 3.15 **A** und **B** (S. 113). Für die Inkubationstemperaturen 20°C und 16°C konnten jeweils drei Versuche zusammengefasst und ausgewertet werden. Weitere Einzelversuche mit einer Variation der Parameter wurden hauptsächlich zur Optimierung der Bedingungen durchgeführt und werden aufgrund der fehlenden statistischen Sicherheit nicht ausgewertet.

Die Normierung auf den Endpunkt macht die Verläufe für verschiedene Substratmengen vergleichbar (Abb. 3.14 **B**, S. 111). Bei Auftragung mit logarithmischer Zeitachse wird der Verlauf annähernd linear (Abb. 3.15, S. 113). Die Kurvenanpassung wurde dementsprechend mit der Formel $Fluoreszenzsignal = a - b \cdot \ln(t)$ durchgeführt (t : Zeit in min., a, b : Kurvenparameter). Der erwartete Verlauf bei einer Reaktion pseudoerster Ordnung wird nicht beobachtet. Hierbei wäre eine Linearisierung durch die logarithmische Auftragung der Geschwindigkeit zu erwarten gewesen. Die letzten beiden Punkte wurden bei der Anpassung

nicht berücksichtigt, da hier bei einigen Versuchsbedingungen bereits das Maximum erreicht wurde. Eine Berücksichtigung würde die Endpunkte somit stark überbewerten. Beim direkten Vergleich der Kurven konnte kein einheitlicher Trend für die Korrelation zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Enzym-Substratverhältnis ausgemacht werden. So wurden in zwei von drei Experimenten keine Veränderungen ausgemacht, während in einem Experiment die Anfangsgeschwindigkeit für das Verhältnis von 1:2 besonders hoch war. Es wurden daher die Kurvenparameter und deren Durchschnittswerte gegen die Substratkonzentration aufgetragen (Abb. 3.15 C (S. 113)). Die Unterschiede sind nicht signifikant. Die Erhöhung des Durchschnittswerts für $0,58 \mu\text{M}$ ist auf einen einzelnen Wert (Experiment 2) zurückzuführen. Bei der Betrachtung der Experimente bei 16°C ergab sich ein ähnliches Bild. Zusätzlich trat hier ein starke lineare Komponente im späteren Reaktionsverlauf auf, für die keine experimentelle Erklärung vorliegt (Abb. 3.16, S. 114).

Mehrere Gründe sind für die Diskrepanz zwischen theoretischem Modell und den experimentellen Daten anzuführen. So ist die Reproduzierbarkeit der Versuche zwar gezeigt worden, es treten aber auch einzelne Durchführungen auf, die ohne erkennbaren Grund starke Abweichungen zeigen. Hier müsste eine noch strengere Kontrolle aller Bedingungen insbesondere der Proteinpräparationen und der Detektionsabläufe erreicht werden. Zusätzlich ist die Signifikanz in diesem Versuchsaufbau durch eine Erhöhung der Wiederholungen anzustreben. Der Einsatz von Western-Blotting und Immundetektion limitiert die eingesetzten Mengen nach unten. Es ist aber nicht bekannt, in welchem Parameterraum der größte Effekt zu erwarten ist. Daher sollten zunächst mehrdimensionale Optimierungen in einem Hoch-Durchsatz-Format stattfinden. Hierzu könnte sich der ATP-Verbrauchsassay eignen (Abb. 3.19, S. 119). Sofern hier eine Veränderung der charakteristischen Phosphorylierungszeit gefunden wird, kann die Unterscheidung von Fyn- und ADAP-Phosphorylierung dann per Western-Blot und Immundetektion versucht werden. Insbesondere könnte eine Erhöhung der Fyn- und ADAP-Konzentrationen sinnvoll sein, um die Substratkonzentration deutlich über dem vermuteten K_d -Wert (um $6 \mu\text{M}$) zu halten. Die eingesetzte Fyn-Präparation ist heterogen im Hinblick auf die inhi-

4 Diskussion

bitorische Phosphorylierung am C-Terminus. Um den Effekt der Autoinhibition auf die ADAP-Phosphorylierung zu untersuchen, wurde der Versuch unternommen, Fyn vollständig zu dephosphorylieren oder im Vorhinein mit Csk inhibierend zu phosphorylieren. Der Einsatz von Phosphatasen führte zwar zur Dephosphorylierung, jedoch konnten die Phosphatasen nicht komplett inhibiert werden ohne die folgende Phosphorylierungsreaktion zu beeinträchtigen (Abb. 3.17, S. 116, insbesondere Spuren 6, 11 und 22). Die Inkubation mit Csk konnte hingegen durchgeführt werden und führte auch zu der erwarteten Phosphorylierung von Tyr⁵³¹ in Fyn (Spuren 12 und 13). Der anschließende Phosphorylierungsverlauf von ADAP schien im Vorversuch auch verlangsamt gegenüber der unbeeinflussten Fyn-Kinase. In eingehenden Experimenten stellte sich aber eine auffällig große Schwankung der Phosphorylierungssignale ein (Abb. 3.18, S. 118). Die Gesamtphosphorylierung von Fyn schien zeitweise sogar rückläufig, insbesondere bei gleichzeitiger Gegenwart von Csk und ADAP. Dies ist nur mit einer Phosphatase-Aktivität in einer der Proteinpräparationen zu erklären. In Abwesenheit von Csk und Anwesenheit von ADAP verminderte sich zwar die Fyn-Phosphorylierung zunächst, stieg dann aber wie erwartet an. Die Kontrolle der Fyn-Aktivität mit der Beobachtung des ADAP-Phosphorylierungsverlaufs entsprach den Erwartungen. Bei Vorinkubation mit Csk schien die anfängliche Aktivität sogar höher, wurde dann aber durch einen dephosphorylierenden Effekt überlagert. Zusammengefasst konnten diese Vorinkubationsexperimente nicht sinnvoll interpretiert werden. Für eine Präinkubation mit Csk sollte die eingesetzte kommerzielle Präparation auf Reinheit und Phosphatase-Freiheit überprüft werden. Die Inhibierung einer möglichen Rest-Aktivität von Phosphatasen sollte mit minimalen Konzentrationen von ortho-Vanadat möglich sein, wobei der Einfluss auf die Kinase-Aktivität kontrolliert werden muss.

4.2 Lipidbindung

4.2.1 Lipidbindung und Phosphorylierung

Der modulare Aufbau von Proteinen ermöglicht die gegenseitige Beeinflussung ihrer biochemischen Eigenschaften. So werden viele Enzyme durch weitere Enzyme reguliert, wie zum Beispiel Src-Kinasen durch Phosphorylierungen aktiviert oder inhibiert werden können. ADAP hat mit der Phosphorylierbarkeit, Lipidbindung und Redox-Sensitivität mindestens drei potenzielle Regulationsmöglichkeiten. Denkbar ist zusätzlich eine differentielle Affinität für weitere Bindungspartner nach Bindung eines der bekannten Bindungsproteine. Ein Beispiel für die Modulation einer biochemischen Funktion durch eine Lipidbindung und Phosphorylierung ist der zur Dbl-Familie gehörende Guaninnukleotid Austauschfaktor Vav1. Dieses Multidomänenprotein wird unter anderem durch intramolekulare Bindung der PH-Domäne an die DH-Domäne reguliert (Das *et al.*, 2000). Diese Bindung ist PI(4,5)P₂-abhängig und inhibiert die Bindung an Rac1. Nach Austausch von PI(4,5)P₂ durch PI(3,4,5)P₃ wird die Rac-Bindung verstärkt. Zusätzlich wird die Phosphorylierbarkeit durch Lck erhöht, was einen zusätzlichen aktivierenden Effekt auslöst.

Die biochemischen Eigenschaften von ADAP wurden daher nicht nur isoliert, sondern auch in Abhängigkeit voneinander untersucht. So wurde die Phosphorylierung in Abhängigkeit der Lipidbindung durchgeführt. Abb. 3.22 (S. 124) zeigt das Ergebnis eines *in vitro*-Kinaseassays. Obwohl die Betrachtung bei diesem Versuchsaufbau nicht sehr detailliert ist, lässt sich ein deutlicher Trend zu schnellerer Phosphorylierung in Gegenwart von Lipidvesikeln ausmachen. hSH3^N wird zwar auch unter diesen Umständen nicht sichtbar phosphoryliert, die hSH3^C-Domäne und das längere Konstrukt ADAP(486–783) zeigen hingegen einen wahrnehmbaren Effekt. Bei hSH3^C tritt eine zusätzliche phosphorylierte Spezies auf, die bei Inkubationen unter den gegebenen Bedingungen normalerweise nicht beobachtet wurde. Bei sehr langer Inkubation (vgl. Abb. 3.3, S. 90) trat dieses Signal ebenfalls auf, was auf ein schwer zugängliches oder nicht-kognates Tyrosinmotiv hindeuten könnte. Aufschluss könnte eine MS-Analyse dieses Proteins geben, insbesondere des längeren Konstrukts, um artifizielle Phosphorylierung z.B. von

4 Diskussion

Tyr⁷⁶² auszuschließen.

Die Kontrolle ohne Substrat brachte keine schnellere Autophosphorylierung von Fyn in Anwesenheit von Lipiden, vielleicht sogar eine geringere. Im Gegensatz hierzu ist die Fyn-Autophosphorylierung in Gegenwart von hSH3^N tendenziell beschleunigt, wenn mit Lipiden inkubiert wird. Es müsste allerdings noch geklärt werden, ob die erhöhte Phosphorylierungsgeschwindigkeit durch einen direkten Einfluss der Lipide auf Fyn oder durch eine bessere Phosphorylierbarkeit des Substrats zustande kommt. Hierzu könnten Fyn-Substrate eingesetzt werden, die keine Lipidbindung zeigen. Selbst wenn der Effekt durch ADAP-Lipidbindung vermittelt wird, bleibt unklar, ob ADAP-Tyrosine besser zugänglich geworden sind (z.B. durch eine Konformationsänderung) oder ob die Beschränkung der Diffusion der Reaktanden ausreicht, um die Phosphorylierung zu beschleunigen. Letzteres würde aber einer physiologischen Funktion der Lipidbindung als Aktivierungs-Beschleuniger nicht widersprechen.

4.2.2 hSH3^N-Bindung unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen

Aufgrund der reversiblen Strukturänderung von hSH3^N nach Reduktion oder Oxidation wurde die Affinität der Domäne zu Lipidvesikeln der Zusammensetzung PC:PS:PI(4,5)P₂=50:48:2 unter entsprechenden Redox-Bedingungen verglichen. Die Durchschnittswerte der gebundenen Fraktion ergeben bei einer Kurvenanpassung einen apparenten K_d -Wert von $132 \pm 12 \mu\text{M}$ (reduziert) bzw. $115 \pm 15 \mu\text{M}$ (oxidiert). Um die Daten auf signifikante Unterschiede zu untersuchen, wurden die Werte aus den einzelnen Experimenten individuell geplottet und der K_d -Wert bestimmt. Die gemittelten Werte sind $138 \pm 25 \mu\text{M}$ (reduziert) und $101 \pm 18 \mu\text{M}$ (oxidiert). Ein paarweiser Vergleich mit Student's-t-Test ergab einen P-Wert von 0,19 und somit keinen signifikanten Unterschied zwischen reduzierter und oxidiertem Domäne.

Die Bindungsfähigkeit des Proteins wird unter den angewendeten Bedingungen nicht geschädigt. Die maximale Bindung ist in beiden Fällen ca. 90%, wonach 10% der Proteinpräparation nicht bindungskompetent sind. Die Beobachtung kann auch auf Verunreinigungen der Proteinprä-

paration zurückzuführen sein, die eine Fluoreszenz bei 350 nm zeigen. hSH3^N war unter diesen Bedingungen stabil (siehe Teil **C** der Abbildung). Bei einer größeren Anzahl von Experimenten könnte statistische Betrachtung zu einem signifikanten Unterschied führen. Sollte sich der Unterschied bei den jetzigen Durchschnittswerten von 138 bzw. 101 μM bestätigen, wäre aber die biologische Relevanz immer noch fraglich. Für eine „Schalterfunktion“ nach Oxidation wäre ein größerer Unterschied in der Affinität zu vermuten.

4.2.3 Einfluss der Lipidspezies auf die hSH3^N-Bindung

Die Bindung von hSH3^N an Standard-Vesikel mit der Zusammensetzung PC:PS:PI(4,5)P₂=50:48:2 ist recht schwach. Eine Vielzahl weiterer Lipide existiert jedoch in biologischen Membranen. Die Affinität an diese Lipide könnte deutlich höher sein. In Verbindung mit anderen Lipiden, die spezifisch an hSH3^N binden, könnte auch ein Affinitätsunterschied von reduzierter und oxidierte Domäne stärker hervortreten. Hierbei könnten die Kopfgruppen, aber auch die Acylreste ein unterschiedliches Bindungsverhalten hervorrufen. Die Erkennung bestimmter Lipide durch Proteindomänen ist jedoch in der Regel stärker von der Kopfgruppe als von der Acylkette des Lipids abhängig. In Abb. 3.25 (S. 130) wird eine Gegenüberstellung der Bindungen an Vesikel mit unterschiedlicher Acylsättigung gezeigt. Auffällig ist die schlechte Bindung an POPC:POPS. In der Regel wurde hier bei 500 μM Lipidkonzentration 60-70% Protein sedimentiert. Möglicherweise war die reale Lipidkonzentration niedriger. Der Vergleich zwischen Dipalmitoyl- und Stearoyl/Arachidonyl-Seitenketten zeigte aber keinen Unterschied. Ebenso haben die Redox-Bedingungen hier keinen Einfluss, dies ist insbesondere bei den ungesättigten Lipidspezies von Belang. Zum Vergleich wurde das Experiment parallel mit der Dicystein-Mutante der Domäne durchgeführt. Diese Proteinpräparation scheint durchweg bindungskompetent zu sein und zeigt eine stärkere Bindung als der Wildtyp. Detailliertere Daten müssten mit einer vergleichenden Lipid-Titration für Wildtyp und Mutante erhoben werden.

Abb. 3.26 (S. 131) zeigt Ergebnisse eines Experiments in dem hSH3^N mit LUVs, die aus 50% PC, 45% PS und 5% eines weiteren Lipids bestehen kosedimentiert wird. Die Bedingungen wurden so gewählt, dass bei

4 Diskussion

der Kontrolle (PC:PS=1:1) die gebundene Fraktion ca. 60% ausmachte. Somit sollten Abschwächungen und Erhöhungen der Affinität beobachtbar sein. Die Unterschiede zwischen den Lipiden bezogen sich hauptsächlich auf die Kopfgruppen, von denen auch der größere Effekt erwartet wird. Aufgrund der Verfügbarkeit von Lipidspezies waren aber auch unterschiedliche Fettsäurereste vorhanden. Eine Auflistung findet sich in Tabelle 3.4.

In der Abbildung wurden die Lipide nach negativer Ladung der Kopfgruppen sortiert (Ausnahme Sphingomyelin). Auffällig ist die verminderte Bindung der Domäne (gegenüber PS:PS=50:50) wenn keine Kopfgruppen vorhanden sind (DOctG und POG präsentieren nur das Glycerol-Rückgrat) oder in Gegenwart des Sphingolipids Sphingomyelin. Dieses Lipid hat ebenso wie PC die zwitterionische Phosphocholin-Einheit, auch die Ladungsverteilung ist in seinem Glycerophospholipid-Pendant sehr ähnlich. Auch wenn Details der chemischen Eigenschaften unterschiedlich sind, ist der beobachtete Effekt überraschend. Mit steigender Ladung der Kopfgruppe nimmt die Bindung tendenziell zu. Unterschiede zwischen den PI(X)P-Spezies konnten in einem Folgeexperiment nicht reproduziert werden und beruhen vermutlich auf der schlechten Löslichkeit der Lipide und resultierenden Konzentrationschwankungen. Die Unterschiede in der Bindung zwischen reduzierenden und oxidierenden Bedingungen bedürfen der Überprüfung. Es war ein Trend zu einer leichten Bindungsverstärkung bei Oxidation erkennbar. Am deutlichsten fällt dies bei Sphingomyelin auf. Nur für POG wurde eine Verminderung gesehen.

Um die stereospezifische Erkennung der Kopfgruppen von elektrostatischen Wechselwirkungen zu unterscheiden, ist eine Wiederholung des Experiments mit Ladungsausgleich durch Verminderung von PS sinnvoll. Dieses Experiment wurde durchgeführt, war aber aufgrund der unterschiedlichen Lipidlöslichkeiten nicht auswertbar. Zur Klärung des negativen Effekts von Sphingomyelin könnte eine Titration im Vergleich zu PC-enthaltenden Vesikeln dienen. Bei quantitativen Vergleichen ist die tatsächliche Menge der eingesetzten Lipide zum Beispiel durch Bestimmung des anorganischen Phosphats zu überprüfen.

4.2.4 Kooperativität der PI(4,5)P₂-Bindung

Zur genaueren Charakterisierung der Bindung von PI(4,5)P₂ an hSH3^C wurde eine mögliche Kooperativität der Bindung untersucht, wie sie für den Actin-Regulator N-WASP (*neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*) gezeigt wurde (siehe unten, Papayannopoulos *et al.*, 2005). Hierzu wurde eine Vesikelsedimentation von hSH3^C durchgeführt, bei der der Anteil an PI(4,5)P₂ auf Kosten von PC erhöht wurde, während die Gesamtkonzentration der Lipide konstant blieb. Die Vesikelzusammensetzung war PC:PS:PI(4,5)P₂=60:40- x : x , wobei $0 \leq x \leq 20$. Wie Abb. 3.24 (S. 127) zeigt, ist die Bindungskurve von hSH3^C bei steigenden PIP₂-Anteilen einer Hyperbel ähnlich. Dabei wird die Ordinate nicht bei 0% geschnitten, sondern bei ca. 23%, da auch in Abwesenheit von PI(4,5)P₂ PS für eine Proteinbindung sorgt. Für N-WASP war ein Hill-Koeffizient von ca. 3 für die Bindung gezeigt worden und eine sogar wesentlich stärkere Kooperativität für die Aktivierung der Actin-Polymerisierung. Bei einem Fit der hSH3^C-Daten mit der Hill-Gleichung (angepasst an den Schnittpunkt mit der Ordinate) wurde ein Hill-Koeffizient von ca. 1,4 ermittelt. Unter Beachtung des Fehlers von $\pm 0,3$ ist somit keine signifikante Kooperativität gegeben.

Im hier durchgeführten Experiment mit hSH3^C wurde PS statt PC vermindert. Die Ladungsdichte wird dadurch nicht konstant gehalten, aber sie steigt nicht so schnell wie mit PC als Ausgleich. Im Fall von hSH3^C kann daher mit diesem Experiment nicht unterschieden werden, ob es sich um eine Selektivität für die Kopfgruppe oder um eine allgemeine elektrostatische Wechselwirkungen handelt. Aus anderen Arbeiten ist für die hSH3^C-Lipidbindung eine Kombination aus elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen beobachtet worden (siehe 1.2.1.4, S. 23 und Heuer *et al.*, 2005, 2006).

Die polybasische Region von N-WASP vermittelt eine Phosphatidylinositolbis- oder trisphosphat-Bindung. Eine hohe Selektivität für PI(4,5)P₂ wurde gezeigt, aber eine Bindung an PI(3,4)P₂ und stärker noch an PI(3,4,5)P₃ ist ebenfalls nicht zu vernachlässigen. Die Abhängigkeit von Enzymaktivität und Lipidbindung von der PIP-Konzentration ist bei N-WASP sehr deutlich (Papayannopoulos *et al.*, 2005). Die Autoren

4 Diskussion

variierten die PIP-Konzentration bei der Sedimentation von N-WASP durch Reduktion von PC bei konstanter Gesamtlipidkonzentration. Die Nettoladung von PS ist -1, wohingegen PIP₂ eine Ladung von ca. -4 bei pH=7,2 trägt (van Paridon *et al.*, 1986). Hier stellt sich die Frage, ob die Erhöhung der Ladungsdichte auf den Vesikeln die Bindung des polybasischen Motivs verstärkt und die beschriebene Kooperativität überschätzt wird. WASP und VASP werden auch in einem Komplex mit ADAP gefunden (Coppolino *et al.*, 2001; Krause *et al.*, 2000). VASP bindet möglicherweise über seine EVH1-Domäne an prolinreiche Sequenzen in ADAP (F⁶¹⁶PPPPDDDI⁶²⁴, Krause *et al.*, 2000). Siehe hierzu 1.2.2.4 (S. 29).

4.3 Weitere ADAP-Interaktionen

Neben der Charakterisierung der Phosphorylierung und Lipidbindung wurden auch explorative Bindungsstudien und verifizierende Bindungsstudien durchgeführt, da insbesondere für die Bereiche, die definierte Strukturen zeigen, keine Interaktionspartner bekannt sind.

4.3.1 hSH3^N-Interaktionspartner

hSH3^N bindet Lipide nur wesentlich schwächer als hSH3^C. Ein Protein- oder sonstiger Bindungspartner war nicht bekannt und daher eine explorative Bindungsstudie angezeigt. Mit der Affinitätschromatographie von Jurkat-Lysaten an immobilisiertem hSH3^N wurden einige Kandidaten isoliert. Hierbei fand sich nur ein Protein, das nur in der oxidierenden Umgebung an die ADAP-Domäne band: LSm12 (21,6 kDa) gehört zu den SM-ähnlichen Proteinen, die an verschiedenen mRNA-Modifizierungsprozessen teilnehmen (unter anderem Spleißen). Ein weiteres Protein, das im reduzierten und oxidierten Ansatz isoliert wurde, gehört ebenfalls zu den RNA-modifizierenden Proteinen. CFIm25 (26,2 kDa) ist Teil eines nukleären RNA-Modifizierungskomplexes, der die 3'-Prozessierung von prä-mRNAs durchführt (Kwon *et al.*, 2005). Eine spezifische Funktion einer solchen ADAP-CFIm25-Bindung könnte in der Modulation der poly-Adenylierung nach TCR-Ligation sein. Weitere Hinweise liegen hierzu aber nicht vor. Ein inhaltlicher Zusam-

menhang zu ADAP war nicht ersichtlich, was auch für das identifizierte 40S-ribosomale Protein S19 gilt. Die Möglichkeit einer unspezifischen und indirekten Bindung über RNA ist für die drei Proteine gegeben. Als Interaktions-Kandidaten wurden sie daher zunächst nicht weiter untersucht.

HT014 wurde in beiden 25 kDa-Banden der Jurkat-Affinitätschromatographie an hSH3^N identifiziert. Das tatsächliche Molekulargewicht (24,2 kDa) macht die Identifizierung plausibel und die Intensität der Banden ließ eine deutliche Bindung vermuten. Das Protein ist weitgehend uncharakterisiert, jedoch wird eine „*Domain of unknown function 1000*“ aus der Sequenz vorhergesagt und eine Zugehörigkeit zur Familie der Thioredoxin-ähnlichen Proteine ist erkennbar. Aus einem proteomischen Ansatz ist zudem die Phosphorylierung von Tyr¹⁸⁹ in Jurkat-Zellen bekannt (Rush *et al.*, 2005). Das entsprechende Motiv ist für die Phosphorylierung durch Src-, Tec- oder Abl-Kinasen am besten geeignet. Eine leichte *in vitro*-Phosphorylierung mit Fyn ist nachweisbar. Die mögliche Assoziation von HT014 als Thioredoxin-ähnliches Protein mit Redox-Vorgängen begründete die genauere Untersuchung der Bindung an hSH3^N. Hierzu wurde HT014 als GST- oder His₆-Fusionsprotein in *E.coli* exprimiert. Die Ausbeute des His-markierten Proteins war jedoch so niedrig, dass hiermit keine Bindungsstudien mit ADAP durchgeführt konnten. Das Protein wird zwar exprimiert, ist in dieser Form aber offenbar schlecht gefaltet und unlöslich. Die GST-Variante konnte hingegen gereinigt werden. In Affinitätschromatographien im Pull-down-Format wurde entweder GST-HT014 oder His-hSH3^N immobilisiert. Dabei zeigte sich, dass bei geringer Stringenz der Waschschriffe unspezifische Bindung (verglichen mit der Bindung an GST oder Matrix alleine) und bei höherer Stringenz (Gegenwart von BSA, geringen Mengen Detergenz, höherer NaCl-Konzentration) keine Bindung mehr detektierbar war. Dies galt für reduzierende wie oxidierende Inkubationsbedingungen. Der Grund hierfür ist nicht bekannt. Möglicherweise ist das GST-Konstrukt nicht bindungskompetent. So könnte die Bindungsfläche des HT014 durch GST maskiert sein. Falls HT014 ein aktives Redox-Protein ist, wäre eine Interaktion mit dem ebenfalls Redox-reaktiven GST sogar wahrscheinlich. Die proteolytische Spaltung von GST- und HT014-Anteil des Fusionsproteins war

4 Diskussion

zwar möglich, aber eine Trennung der beiden Komponenten per Gel-filtration aufgrund der ähnlichen Molekulargewichte nicht erfolgreich. Ionenaustauschchromatographie wurde wegen der ähnlichen isoelek-trischen Punkte der Proteine nicht durchgeführt.

Ein Yeast-Two-Hybrid-Ansatz wurde eingesetzt, um eine direkte Bin-dung in einem eukaryotischen System zu überprüfen. Auch hier konnte eine HT014-hSH3^N-Interaktion ebenfalls nicht bestätigt. Hauptproblem dieses Experiments war die Autoaktivierung unter Bedingungen mit niedrigem Selektionsdruck. Bei höherer Stringenz wurde kein Wachs-tum der Hefezellen beobachtet. Eine Herstellung von HT014 mit einem anderen Tag oder in einem anderen Expressionssystem wie Insektenzel-len könnte für eine Bindungsstudie sinnvoll sein.

4.3.2 Carma1-Bindung

Mit der Identifizierung von Carma1 als Bindungspartner für ADAP (Medeiros *et al.*, 2007) wurde eine neue Funktion für murines ADAP neben der Integrin-Aktivierung beschrieben. Über den Carma1-BCL10-Malt1-Komplex reguliert ADAP NF- κ B-Aktivität in T-Zellen. Die Un-mittelbarkeit der Carma-ADAP-Interaktion wurde von den Autoren zwar nur unvollständig durch Expression der Komponenten in *in vit-ro*-Translationssystemen gezeigt, jedoch ist auch kein weiterer gemein-samer Bindungspartner von Carma1 und ADAP bekannt. Unter der Annahme, dass die Interaktion direkt sei, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Konstrukte von ADAP und Carma1 hergestellt. Diese wurden eingesetzt, um die Interaktion der Proteine *in vitro* mit gereinigten Komponenten zu verifizieren und die Bindungsbereiche einzugrenzen. Zudem bietet ein Ansatz mit gereinigten Komponenten auch die Möglichkeit Bindungsregulation durch posttranslationale Mo-difikationen zu untersuchen.

Die in 3.3.2 gezeigten Ergebnisse lassen die Interpretation zu, dass es sich um eine direkte Interaktion von Carma und ADAP handelt. Dies wird zum einen durch die Bindung von His-ADAP (komplette Sequenz) an Carma-GST-PDZ und in geringerem Maße auch GST-SH3-Guk deut-lich (siehe 3.33, S. 141). Die Bindung an GST ohne PDZ ist marginal. Die leichten Degradations- oder Kontaminationsbanden in der ADAP-Präparation sind bei der Bindung an GST-PDZ nicht zu sehen, was

für die Spezifität der Bindung spricht. Die in der Abbildung gezeigte PDZ-Präparation sieht verunreinigt aus, die Hauptkomponente neben GST-PDZ ist jedoch GST. Weitere Proteine oder Abbauprodukte sind vorhanden, im Vergleich zu den Hauptproteinen aber von geringer Konzentration. Eine Beeinflussung im Sinn einer Bindungsvermittlung zwischen Carma und ADAP ist auch im Hinblick auf die prokaryotische Herkunft der GST-PDZ-Präparation unwahrscheinlich. Die Interaktion mit GST-SH3-Guk hingegen bedarf der Abklärung, da die Konzentration des Fusionsproteins auf der Matrix zu gering ausfiel. Hierdurch könnten unspezifische Bindungen von ADAP auf der GSH-Matrix auftreten, die auf der GST-gesättigten Matrix verhindert werden. Im selben Experiment konnten andere ADAP-Konstrukte wie hSH3^N, hSH3^C, ADAP(426–541) aber auch (486–783) nicht von GST-PDZ präzipitiert werden. Der Grund hierfür ist unklar. Der N-terminale Teil (bis As. 485) fehlt in allen nicht-bindenden Konstrukten. Im Hinblick auf die publizierten und übrigen hier vorgestellten Ergebnisse ist aber eine Notwendigkeit für die Carma1-ADAP-Bindung nicht wahrscheinlich. Möglicherweise sind mehrere Teile von ADAP an der Carma1-Bindung beteiligt. Zudem ist eine indirekte Carma-ADAP-hSH3^N-Bindung über ein drittes Protein mit den vorliegenden Daten zu vereinbaren. In Abb. 3.32 **B** (S. 140) wird die Interaktion von immobilisierter His-Carma-PDZ-Domäne an GST-ADAP(460–579) und (486–783) deutlich, wobei letzteres eine stärkere Interaktion zeigt. In der GST-Kontrolle bindet die PDZ-Domäne kaum, allerdings vermag auch hSH3^N die Domäne nicht zu präzipitieren. Die SH3-Guk-Region wurde von keinem ADAP-Konstrukt gebunden, eine Abklärung mit anti-His₆-Immunblot ist aber nötig, um schwächere Bindungen und mögliche Komigration mit Verunreinigungen (besonders in der GST-dbl-Spur) zu erkennen. GST-hSH3^N vermag hingegen Carma aus Jurkat-Lysaten zu präzipitieren (3.32 **A**). Das Signal in der Immundetektion ist zwar recht schwach, was jedoch dem allgemein schwierigen Carma-Nachweis geschuldet sein kann. Zudem ist das Signal etwas stärker als in den zugrunde liegenden Lysaten und die GST-Kontrolle zeigt dieses Signal nicht. Somit können diese Daten als Bestätigung der publizierten Interaktion angesehen werden und fokussieren die Bindung auf hSH3^N als hinreichendes Bindungsmodul. Auch mit ADAP(460–579) wird ein schwaches

4 Diskussion

Carma-Signal detektiert, vielleicht aufgrund der geringeren immobilisierten Proteinmenge jedoch weniger als mit hSH3^N. Die Bindung an ADAP(486–783) konnte nicht gezeigt werden, allerdings ist die Menge an immobilisiertem Protein aus unbekanntem Grund niedriger als erwartet. Zudem könnte hier die Gegenwart von hSH3^C eine Rolle spielen. Möglicherweise wird im physiologischen Kontext die Lipidbindung der hSH3^C-Domäne genutzt, um die Bindung an Membran-proximales Carma1 zu verstärken. Eine Verwendung von Lipiden in ADAP(486–783)-Carma1-Bindungsassays könnte hierzu Informationen liefern.

Medeiros *et al.* setzten Mausproteine ein und grenzten den Bindungsbereich durch Deletion ein. Hierbei zeigte die Deletion der ADAP-Bereiche 438–493 und 494–553 (äquivalente Nummerierung des humanen Proteins) jeweils eine teilweise Bindungsminderung, während die Deletion des gesamten Bereichs (438–553) einen kompletten Verlust der Bindung verursachte. Umgekehrt setzten die Autoren ein GST-Konstrukt mit As. 443–609 ein und erhielten Bindung an Carma(651–1147). Dieses ADAP-Konstrukt umspannt die Coiled-Coil-Region, hSH3^N und auch das erste SLP-76-Bindungsmotiv. Die Deletion eliminiert ebenfalls die Coiled-Coil-Region und einen Großteil der strukturell bekannten hSH3^N. Eine nennenswerte Restfaltung des Bereichs 553–579 ist nicht zu erwarten. Die hSH3^N-Domäne selbst kann bereits mit den vorliegenden Daten als hinreichendes Bindungsmodul zumindest für eine indirekte Bindung angesehen werden. Es ist aber zu klären, ob die N-terminale Verlängerung in den Coiled-Coil-Bereich eine Verstärkung der Bindung bewirkt. Carma1 enthält einen ausgedehnten Coiled-Coil-Bereich, dieser ist jedoch nicht im Bereich von As. 651–1147, der als ADAP-Bindebereich publiziert wurde. Des Weiteren ist der Einfluss von posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierung oder Redox-Potenzial-Verschiebungen auf die Carma-Bindung zu untersuchen. Das ETTyr⁴⁶²EDI-Motiv in ADAP liegt innerhalb der Coiled-Coil-Region vor der erwarteten ersten nukleären Lokalisationssequenz. Eine Modulation der ADAP-Bindung durch Phosphorylierung dieses Tyrosins wäre denkbar. Dieses Motiv besitzt die höchste Vorhersagewahrscheinlichkeit für eine Src-Familien-Phosphorylierung und ist auch ein typisches Fyn-SH2-Erkennungsmotiv. Bei Betrachtung der Membranfraktion von Jurkat-Zelllysaten, findet die Bindung von Carma1 und

ADAP tatsächlich aktivierungsabhängig statt (Medeiros *et al.*, 2007) und auch die teilweise Lokalisation von ADAP an Membranen wird nach Stimulation beobachtet, während Carma konstitutiv membranlokalisiert auftritt. Vorläufige Experimente im Rahmen dieser Arbeit konnten noch keinen Einfluss der ADAP-Phosphorylierung auf die Carma-Bindung ausmachen. Da ein Phosphotyrosin-Erkennungsmodul in Carma1 nicht bekannt ist, könnte eine strukturelle Änderung nach Phosphorylierung von Tyr⁴⁶² die Interaktion von ADAP und Carma ermöglichen oder ein dritter (unbekannter) Partner bindet konstitutiv an Carma1, aber phosphorylierungsabhängig an ADAP. MALT1 und BCL10 sind nur durch Carma1 in der Koimmunpräzipitation zu isolieren, wenn ADAP vorhanden ist und die veröffentlichten Daten zur Bindung dieser Proteine lassen ADAP als Interaktionspartner zu. Eine Abklärung der binären Interaktionen dieser vier Proteine ist somit notwendig. Eine NMR-gestützte Bindungsanalyse von ¹⁵N Carma-PDZ an hSH3^N und vice versa ist bereits durch entsprechende Expression der Domänen vorbereitet und könnte Auskunft über Dissoziationskonstanten und bindungsrelevante Aminosäuren geben.

Die Bewertung der bisherigen Bindungsergebnisse lässt zwar den Schluss zu, dass Carma1-PDZ direkt an ADAP-hSH3^N bindet, jedoch sind weitere Experimente nötig, um dies abzuklären. So ist die Bindung von ADAP-Fragmenten an die immobilisierte Carma-PDZ-Domäne noch nicht gezeigt worden. Zudem könnte die Art der Bindungsassays von (Medeiros *et al.*, 2007) zu einer Überinterpretation der Unmittelbarkeit der Bindung geführt haben. Wie Dluzniewska *et al.* (2007) zeigen konnten, ist ADAP in erythroiden Zellen möglicherweise exprimiert. Das von Medeiros *et al.* (2007) eingesetzte Retikulozytenlysat könnte somit einen gemeinsamen Bindungspartner beinhalten. Ein Kandidat könnte das kürzlich als Carma1-MAGUK-bindendes Protein identifizierte Cib1^[2] sein (Xin Lin, unveröffentlichte Daten). Des Weiteren könnten Unterschiede zwischen menschlichen und murinen Komplexen der Grund für die unzureichende Reproduzierbarkeit der direkten Interaktion sein.

^[2]Calcium and integrin-binding protein 1

4.3.3 SKAP55-ADAP-Bindung

Die Bindung von SKAP55 an ADAP ist bereits gut charakterisiert und auch die Bedeutung für die Stabilität von SKAP55 in der Zelle belegt. Die Arbeiten von Duke-Cohan *et al.* (2006); Kang *et al.* (2000) lieferten jedoch Hinweise für eine zusätzliche Beteiligung der hSH3^C-Region von ADAP. Diese soll das SKAP55-Peptid T²⁸⁸RRKGDYASYQ³⁰⁰ binden. Das verwendete ADAP-Konstrukt (As. 695-762) unterscheidet sich jedoch von der hSH3^C-Domäne, wie sie strukturell charakterisiert wurde. Insbesondere fehlt dem Konstrukt der Anfang der α -Helix am N-Terminus. Dieser Bereich ist für die Stabilität und die Lipidbindungseigenschaften der Domäne wichtig (Heuer *et al.*, 2006). Somit stellte sich die Frage, ob das vollständige Domänenkonstrukt seine einzige beschriebene Bindungseigenschaft nämlich Lipidbindung in Anwesenheit des SKAP55-Peptids aufrecht erhält. Hierzu wurde ein Kompetitions-experiment durchgeführt mit einer LUV-Konzentration, bei der ein Großteil von hSH3^C sedimentiert wird. Die Bindung von Protein wurde bei steigenden Mengen von SKAP55-Peptid verfolgt. In Abb. 3.34 (S. 142) wird deutlich, dass ab ca. 30 μ M Peptid eine Verminderung der Lipid-gebundenen Fraktion auftritt. Die Auftragung des Bindungsanteils gegen die Peptidkonzentration zeigt, dass es sich hierbei um einen systematischen Effekt handelt und nicht ausschließlich zufällig ist. Die Bindung wird offenbar bei großen Peptidkonzentrationen nicht auf 0% vermindert. Für die nicht-gebundene Fraktion wurde kein analoger Effekt gesehen. Die Konzentration ist gering und daher eine densitometrische Auswertung nicht möglich. Mehrere Komponenten können die sichtbare ungebundene Fraktion ausmachen: 1. Intaktes Protein, das bei der gegebenen Lipidkonzentration aufgrund des Gleichgewichts nicht gebunden ist, 2. Protein, das aufgrund von Fehlfaltung nicht bindungskompetent ist, 3. Eine Verunreinigung, da eine Doppelbande sichtbar wird, die in der Pellet-Fraktion nicht vorhanden ist.

Die Interpretation der gezeigten Daten kann nicht eindeutig sein, da die Menge des gebundenen Peptids in diesem Versuchsaufbau nicht ermittelt werden konnte. Grundsätzlich sind bei steigender Peptidkonzentration drei Szenarien denkbar. Bindet das Peptid weder an Lipide noch an hSH3^C, so sollte sich keine Auswirkung auf die pelletierte Pro-

teinmenge zeigen. Findet eine Peptid-Lipid-Interaktion statt, aber keine mit dem Protein, ist ebenfalls keine Änderung der Proteinkonzentration zu erwarten, solange das Peptid nicht einen signifikanten Anteil der Lipid-Bindungsfläche besetzt hat und somit mit dem Protein konkurriert. Bindet aber das Peptid die Domäne, kann dies in Konkurrenz zum Lipid oder an einer unabhängigen Bindungsfläche stattfinden. Im ersten Fall wird weniger Protein mit zunehmender Peptidkonzentration an die Vesikel binden. Im zweiten Fall bleibt die pelletierte Proteinfraction gleich, es sollte aber auch Peptid im Pellet zu finden sein. Ohne die anderen Möglichkeiten gänzlich auszuschließen, legt die Beobachtung in vorliegenden Fall eine Konkurrenz durch Bindung zwischen Peptid und Protein nahe. Eine vollständige Verdrängung trat nicht auf, was durch eine deutlich niedrigere Affinität der Domäne zum Peptid im Vergleich zu den Lipiden erklärbar ist. Eine gewisse Affinität des Peptids zu sauren Lipiden ist aus der Gegenwart von positiv geladenen Aminosäureresten zu erwarten, jedoch kann die Vesikeloberfläche (zugängliche Konzentration ist $240 \mu\text{M}$) bei $30 \mu\text{M}$ Peptidkonzentration noch nicht soweit abgesättigt sein, dass die Domäne deutlich geringer bindet. Die vorliegenden Daten widersprechen also nicht einer Bindung des Peptids an die Domäne. Die publizierten Dissoziationskonstanten für den Peptid-Protein-Komplex liegen im Bereich von $30 \mu\text{M}$ und sind somit eine Größenordnung höher als die Lipid-Protein-Bindung. In diesem Bereich tritt auch der Konkurrenzseffekt auf. Für eine detaillierte Bewertung müsste das Konkurrenzexperiment inklusive einer Peptidkonzentrationsbestimmung wiederholt werden. Interessanterweise ist in NMR-Bindungsstudien keinerlei Bindung des Peptids an hSH3^C nachweisbar, sofern das strukturell intakte Konstrukt eingesetzt wird (C. Freund und K. Heuer, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Instabilität des verkürzten Konstrukts hingegen wirft Fragen nach der biologischen Relevanz der Peptid-Protein-Interaktion auf.

4.4 Kernlokalisation

Die ADAP-Sequenz enthält zwei Bereiche, die von Vorhersagealgorithmen als mögliche Kernlokalisationssignale identifiziert werden (unter anderem mit Wolf PSORT, Horton *et al.*, 2007). Diese zweiteiligen

4 Diskussion

Motive befinden sich jeweils vor den Domänen (As. 469–505 sowie 674–700, nach da Silva *et al.*, 1997b). Da diese Abschnitte jeweils mit dem Beginn der Tertiärstruktur überlappen, sind die möglichen NLS auf die Sequenzen 469–496 bzw. 674–688 begrenzt. Wenngleich keine der publizierten Studien eine ausschließliche Kernlokalisierung zeigen, so ist diese jedoch nicht widerlegt. Siehe hierzu 1.2.1.1 (S. 18). Durch den niedrigeren ADAP-Anteil, der im Kern lokalisiert sein könnte und aufgrund von methodischen Einschränkungen ist die Lokalisation im Kern noch nicht gelungen. Um die Funktionalität der NLS zu untersuchen wurden daher ADAP-Konstrukte entworfen, die diese Sequenzen isoliert oder eingebettet in den strukturellen Kontext enthalten. Um eine NLS-unabhängige Kernporengängigkeit zu verhindern und die Lokalisation mit Fluoreszenzmikroskopie zu ermöglichen wurde ein Fusionsprotein mit GST (N-terminal) und GFP (C-terminal) hergestellt. Gereinigte Proteine wurden dann in Hela-Zellen injiziert. Ergebnisse sind in Abb. 3.35 (S. 144) gezeigt. Dort ist zu sehen, dass die Injektionen erfolgreich waren. Die GFP-Fluoreszenz ist deutlich, ohne dass die Zellen sichtbaren Schaden genommen haben. In der Regel wurde in das Zytoplasma injiziert, was anhand des nicht-translozierenden BSA-TRITC-Markers erkennbar ist. In keiner der beobachteten Zellen konnte ein Unterschied der Lokalisation zwischen Injektionsmarker und GFP-ADAP-Konstrukt festgestellt werden. Somit sind hier keine Hinweise auf eine Funktionalität der NLS in ADAP gefunden worden. Mehrere Erklärungen sind hierfür denkbar. Zum einen könnten experimentelle Probleme den Kerntransport gestört haben. Zur Abklärung muss eine Positivkontrolle mit bekanntem funktionalem NLS eingesetzt werden. Eine weitere Erklärung wäre die Notwendigkeit für eine „Aktivierung“ der NLS, zum Beispiel indem eine intramolekulare oder Liganden-vermittelte Maskierung aufgehoben und die Interaktion mit Importin ermöglicht wird. Denkbar ist in diesem Zusammenhang auch die Beeinflussung durch das nahegelegene Tyrosin Tyr⁴⁶² als potenzielle Phosphorylierungsstelle. Putative Bindungspartner im Kern wie CFIm25 oder LSM12 sind bereits in der hSH3^N-Bindungsstudie identifiziert worden (siehe 4.3.1 und 3.3.1 auf Seite 132). Wenn ADAP hauptsächlich im Zytoplasma, nach Aktivierung an der Plasmamembran, aber auch im Zusammenhang mit Endosomen und eventuell im Kern

4.4 Kernlokalisierung

lokalisiert ist, sind mehrere Pools mit unterschiedlichen Bindungspartnern zu erwarten. Um die Funktionen von ADAP zu differenzieren, muss daher die örtliche und zeitliche Auflösung der Lokalisierungsuntersuchungen von ADAP erhöht werden.

Abkürzungsverzeichnis

μg	Mikrogramm
Å	Ångstrom
ADAP	<i>Adhesion and Degranulation promoting Adapter Protein</i>
As.	Aminosäure/Aminosäuren
Abb.	Abbildung
AMBA	30% Acrylamid/N,N'-methylen-bis-acrylamidlösung
APS	Ammoniumpersulfat
Bcl	<i>B-cell lymphoma/leukemia</i>
BHK	baby hamster kidney
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
ca.	circa
Carma	<i>Caspase recruitment domain-containing MAGUK [membrane-associated guanylate kinase] homolog</i>
Cbl-c	<i>Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
Crk	<i>chicken retrovirus kinase</i>
CRKL	<i>Crk like</i>
Csk	<i>c-Src kinase</i>
DAP	dümmster anzunehmender Pipettierfehler
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	1,4-Dithiotreitol
ECL	enhanced chemiluminescence (verstärkte Chemilumineszenz)

Abkürzungsverzeichnis

<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein (verstärkt grün fluoreszierendes Protein)
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
ESI	<i>Electro Spray Ionization</i> – Elektrospray-Ionisierung
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> oder <i>et aliae</i>
EVH1	<i>Ena/Vasp homology</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fyb	<i>Fyn binding protein</i>
g	Gramm
GFP	green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)
Gl.	Gleichung
g_{max}	Normalfallbeschleunigung ($9,80665 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$, als Grundlage zur Bestimmung der maximalen relativen Zentrifugalkraft eines Rotors)
Grb2	<i>Growth factor receptor bound protein 2</i>
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HIP55	<i>HPK[Hematopoietic progenitor kinase]1-interacting protein of 55 kDa</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Itk	<i>IL2 inducible T-cell kinase</i>
kb	Kilobasenpaare
K_d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton (äquivalent zu $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$)
kV	Kilovolt
l	Liter

LAT	<i>Linker for activation of T-cells</i>
LB	Luria-Bertani
LFA	<i>leukocyte function-associated antigen</i>
LUV	<i>large unilamellar vesicles</i>
m	milli
M	Molarität in mol·l ⁻¹
m/v	Masse pro Volumen
mA	Milliampère
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisierung
Malt	<i>Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein</i>
Mena	<i>mammalian Enabled</i>
mg	Milligramm
min.	Minute
ml	Milliliter
MLV	multilamellare Vesikel
mM	millimolar (mmol·l ⁻¹)
M _r	Molekulargewicht
ms	Millisekunde
MW	Molekulargewicht
Nck	<i>Non catalytic region of tyrosine kinase</i>
ng	Nanogramm
NLS	<i>nuclear localization signal</i> (Kernlokalisationsignal)
O-GlcNAc	O-verknüpftes N-Acetyl-D-glucosamin
OD	optische Dichte
PA	<i>phosphatidic acid</i> / Phosphatidat
PAG	<i>Phosphoprotein associated with glycosphingolipid enriched microdomains</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Saline
PC	Phosphatidylcholin
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phosphatidylethanolamin
PIP	Phosphatidylinositolphosphat

Abkürzungsverzeichnis

PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
POPC / POPS	Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin / -serin
PS	Phosphatidylserin
PTPN	<i>Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type</i>
PTPRC	<i>Protein tyrosine phosphatase receptor type C</i>
Rap1	<i>Ras related protein</i>
RAPL	<i>Regulator for cell adhesion and polarization enriched in lymphoid tissues</i> oder RASSF5
RIAM	<i>RAP1 interacting adapter molecule</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> – reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDF	<i>Stromal cell-derived factor</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> -Ovarienzelllinie
SFK	<i>Src family kinase(s)</i>
SHIP	<i>SH2 containing inositol phosphatase</i>
SHP	<i>SH2 containing protein tyrosine phosphatase</i>
SKAP55	<i>src kinase associated phosphoprotein of 55 kDa</i>
SLAP	<i>SLP-76-associated phosphoprotein of 130 kDa</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TLR	<i>Toll-like-Rezeptoren</i>
TOF	Time of flight (Flugzeitanalyse)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
U·min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VASP	<i>Vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
v/v	Volumen pro Volumen (Volumenprozent)
WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
ZAP-70	<i>70 kDa ζ associated protein</i>

Zusammenfassung

ADAP (*Adhesion and Degranulation promoting Adaptor Protein*) moduliert in T-Lymphozyten und anderen Immunzellen die Integrin-vermittelte Adhäsion und ist an Signalwegen beteiligt, die zur Ausschüttung von Interleukin-2 führen. Das Protein enthält zwei helikal erweiterte SH3-Domänen (hSH3^N und hSH3^C), die mit sauren Phospholipiden interagieren können, sowie lineare Protein-Interaktionsmotive. Die durch prolinreiche Sequenzen vermittelte Wechselwirkung mit SKAP55 ist konstitutiv, während die Rekrutierung der SH2-Domänen-enthaltenden Proteine SLP-76 und der Kinase Fyn phosphorylierungsabhängig nach T-Zell-Stimulation stattfinden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine *in vitro*-Rekonstitution von ADAP-Domänen und der Fyn-Kinase erreicht, die es erlaubte neue, potenziell funktionsrelevante Tyrosinphosphorylierungsstellen mittels Massenspektrometrie zu identifizieren. Einige der durch Fyn phosphorylierbaren Tyrosine liegen innerhalb der gefalteten hSH3-Domänen und NMR-Experimente zeigten, dass es zu strukturellen Änderungen in der hSH3^C-Domäne nach Phosphorylierung eines zwischen β -Faltblatt und α -Helix liegenden Tyrosins kommt. In massenspektrometrischen Untersuchungen des zellulären Proteins konnte zudem die bisher unbekannte Phosphorylierungsstelle Ser⁵⁵⁸ identifiziert werden. Unter Berücksichtigung der besonderen Regulation der Src-Familien-Kinasen und der Tatsache, dass ADAP phosphorylierungsabhängig an Fyn bindet, wurde die ADAP-Phosphorylierungskinetik untersucht. Die quantitative Analyse der ADAP-Phosphorylierung durch Fyn lieferte reproduzierbare Daten, die einen vorhergesagten Feedback-Mechanismus der Kinase-Aktivität durch ADAP-Phosphorylierung unter den gewählten Bedingungen nicht bestätigen konnten.

In einem zweiten experimentellen Teil dieser Arbeit wurden Bindungseigenschaften von ADAP jenseits der etablierten Protein-Protein-Wech-

Zusammenfassung

selwirkungen untersucht. So konnte gezeigt werden, dass die Bindung von hSH3^N an Lipidvesikel unter gleichen Bedingungen ungefähr siebenmal schwächer ist als die Bindung von hSH3^C oder ADAP voller Länge. ADAP-hSH3^N ändert seine Struktur in Abhängigkeit von der Redox-Umgebung. Es konnte eine Cys₂→Ser₂-Mutante gewonnen werden, die strukturell der reduzierten Form der hSH3^N-Domäne sehr ähnlich ist. Versuche mit mutiertem und Wildtyp-hSH3^N unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen zeigten, dass die Bindung an Lipide nicht signifikant von den Redoxbedingungen beeinflusst wird. Die Variation der Acylreste von Lipiden zeigte keinen klaren Einfluss auf die Bindung. Für hSH3^C konnte demonstriert werden, dass PI(4,5)P₂ nicht kooperativ bindet.

Die publizierte Interaktion zwischen ADAP und Carma1 wurde im Hinblick auf die möglicherweise direkt interagierenden Protein-Domänen untersucht. Es wurden erste Hinweise gefunden, dass die Carma1-PDZ-Domäne und die ADAP-hSH3^N-Domäne zentral an der für den NFκB-Signalweg wichtigen Protein-Komplexbildung beteiligt sind.

Abstract

ADAP (*Adhesion and Degranulation promoting Adaptor Protein*) modulates integrin-dependent adhesion in T-lymphocytes and other immune cells and is involved in signaling pathways that lead to the release of IL-2. The protein contains linear protein interaction motifs and two helically extended SH3 domains (hSH3^N and hSH3^C) which can interact with acidic phospholipids. The proline rich sequence-dependent interaction with SKAP55 is constitutive while the recruitment of SH2 domain containing proteins SLP-76 and kinase Fyn occurs phosphorylation dependent after stimulation of T-cells.

Within this work an *in vitro*-reconstitution of ADAP domains and Fyn kinase was achieved which permitted identification of new, potentially functional tyrosine phosphorylation sites by mass spectrometry. Some of the Fyn-phosphorylatable tyrosines are located within the folded domains and NMR experiments showed that structural changes occur in the hSH3^C domain after phosphorylation of a tyrosine that is situated between the β -strand and the α -helix. In addition, mass spectrometric investigations on cellular protein identified the hitherto unknown phosphorylation site Ser⁵⁵⁸. ADAP phosphorylation kinetics were investigated considering the distinctive regulatory mechanisms of Src family kinases. Quantitative analysis of ADAP phosphorylation by Fyn yielded reproducible results that could not confirm a predicted feedback mechanism of kinase activity by ADAP phosphorylation under the chosen conditions.

Binding properties of ADAP beyond the established protein-protein interactions were explored in a second experimental part of this work. It could be demonstrated that hSH3^N binding to lipid vesicles is approximately seven times weaker than of hSH3^C or full length ADAP under the same conditions. ADAP hSH3^N changes its structure dependent on the redox environment. A Cys₂→Ser₂-mutant was created that closely

Abstract

resembles the reduced form of the hSH3^N domain. Experiments with mutated and wild type hSH3^N under reducing and oxidizing conditions demonstrated that lipid binding is not influenced significantly by redox conditions. Varying acyl chains of lipids did not show a clear effect on binding. It could be demonstrated for hSH3^C that PI(4,5)P₂ does not bind in a cooperative manner.

The published interaction between ADAP and Carma1 was investigated with regard to a possibly direct interaction between protein domains. Initial evidence of a central role of Carma1 PDZ domain and ADAP hSH3^N domain for formation of this important protein complex in NFκB signaling was found.

Literaturverzeichnis

- Abtahian, Farhad, Bezman, Natalie, Clemens, Regina, Sebzda, Eric, Cheng, Lan, Shattil, Sanford J, Kahn, Mark L, & Koretzky, Gary A. 2006. Evidence for the requirement of ITAM domains but not SLP-76/Gads interaction for integrin signaling in hematopoietic cells. *Mol Cell Biol*, **26**(18), 6936–6949.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**(3), 403–410.
- Arstila, T. P., Casrouge, A., Baron, V., Even, J., Kanellopoulos, J., & Kourilsky, P. 1999. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science*, **286**(5441), 958–961.
- Badour, Karen, Zhang, Jinyi, Shi, Fabio, Leng, Yan, Collins, Michael, & Siminovitch, Katherine A. 2004. Fyn and PTP-PEST-mediated regulation of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) tyrosine phosphorylation is required for coupling T cell antigen receptor engagement to WASp effector function and T cell activation. *J Exp Med*, **199**(1), 99–112.
- Bajénoff, Marc, Egen, Jackson G, Koo, Lily Y, Laugier, Jean Pierre, Brau, Frédéric, Glaichenhaus, Nicolas, & Germain, Ronald N. 2006. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity*, **25**(6), 989–1001.
- Begitt, A., Meyer, T., van Rossum, M., & Vinkemeier, U. 2000. Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(19), 10418–10423.
- Bhandari, V., Lim, K. L., & Pallen, C. J. 1998. Physical and functional interactions between receptor-like protein-tyrosine phosphatase alpha and p59fyn. *J Biol Chem*, **273**(15), 8691–8698.
- Biffen, M., McMichael-Phillips, D., Larson, T., Venkitaraman, A., & Alexander, D. 1994. The CD45 tyrosine phosphatase regulates specific pools of antigen receptor-associated p59fyn and CD4-associated p56lck tyrosine in human T-cells. *EMBO J*, **13**(8), 1920–1929.

- Bivona, Trever G, Wiener, Heidi H, Ahearn, Ian M, Silletti, Joseph, Chiu, Vi K, & Philips, Mark R. 2004. Rap1 up-regulation and activation on plasma membrane regulates T cell adhesion. *J Cell Biol*, **164**(3), 461–470.
- Bjellqvist, B., Hughes, G. J., Pasquali, C., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J. C., Frutiger, S., & Hochstrasser, D. 1993. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis*, **14**(10), 1023–1031.
- Black, D. S., Marie-Cardine, A., Schraven, B., & Bliska, J. B. 2000. The Yersinia tyrosine phosphatase YopH targets a novel adhesion-regulated signalling complex in macrophages. *Cell Microbiol.*, **2**(5), 401–414.
- Boerth, N. J., Judd, B. A., & Koretzky, G. A. 2000a. Functional association between SLAP-130 and SLP-76 in Jurkat T cells. *J.Biol.Chem.*, **275**(7), 5143–5152.
- Boerth, N. J., Sadler, J. J., Bauer, D. E., Clements, J. L., Gheith, S. M., & Koretzky, G. A. 2000b. Recruitment of SLP-76 to the membrane and glycolipid-enriched membrane microdomains replaces the requirement for linker for activation of T cells in T cell receptor signaling. *J Exp Med*, **192**(7), 1047–1058.
- Boggon, T. J., & Eck, M. J. 2004. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene*, **23**(48), 7918–27.
- Bonello, Grégory, Blanchard, Nicolas, Montoya, Maria C, Aguado, Enrique, Langlet, Claire, He, Hai-Tao, Nunez-Cruz, Selena, Malissen, Marie, Sanchez-Madrid, Francisco, Olive, Daniel, Hivroz, Claire, & Collette, Yves. 2004. Dynamic recruitment of the adaptor protein LAT: LAT exists in two distinct intracellular pools and controls its own recruitment. *J Cell Sci*, **117**(Pt 7), 1009–1016.
- Brdicka, T., Pavlistová, D., Leo, A., Bruyns, E., Korínek, V., Angelisová, P., Scherer, J., Shevchenko, A., Hilgert, I., Cerný, J., Drbal, K., Kuramitsu, Y., Kornacker, B., Horejsí, V., & Schraven, B. 2000. Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation. *J Exp Med*, **191**(9), 1591–1604.
- Brill, L. M., Salomon, A. R., Ficarro, S. B., Mukherji, M., Stettler-Gill, M., & Peters, E. C. 2004. Robust phosphoproteomic profiling of tyrosine phosphorylation sites from human T cells using immobilized metal affinity chromatography and tandem mass spectrometry. *Anal.Chem.*, **76**(10), 2763–2772.

- Cammarota, G., Scheirle, A., Takacs, B., Doran, D. M., Knorr, R., Bannwarth, W., Guardiola, J., & Sinigaglia, F. 1992. Identification of a CD4 binding site on the beta 2 domain of HLA-DR molecules. *Nature*, **356**(6372), 799–801.
- Chan, Betty, Lanyi, Arpad, Song, Hyun Kyu, Griesbach, Jan, Simarro-Grande, Maria, Poy, Florence, Howie, Duncan, Sumegi, Janos, Terhorst, Cox, & Eck, Michael J. 2003. SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nat Cell Biol*, **5**(2), 155–160.
- Cheng, S. H., Espino, P. C., Marshall, J., Harvey, R., Merrill, J., & Smith, A. E. 1991. Structural elements that regulate pp59c-fyn catalytic activity, transforming potential, and ability to associate with polyomavirus middle-T antigen. *J Virol*, **65**(1), 170–179.
- Combs, J., Kim, S. J., Tan, S., Ligon, L. A., Holzbaur, E. L., Kuhn, J., & Poenie, M. 2006. Recruitment of dynein to the Jurkat immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Sep 21.
- Cooper, Jonathan A, & Qian, Hong. 2008. A mechanism for SRC kinase-dependent signaling by noncatalytic receptors. *Biochemistry*, **47**(21), 5681–5688.
- Coppolino, M. G., Krause, M., Hagendorff, P., Monner, D. A., Trimble, W., Grinstein, S., Wehland, J., & Sechi, A. S. 2001. Evidence for a molecular complex consisting of Fyb/SLAP, SLP-76, Nck, VASP and WASP that links the actin cytoskeleton to Fcγ receptor signalling during phagocytosis. *J.Cell Sci.*, **114**(Pt 23), 4307–4318.
- da Silva, A. J., Yamamoto, M., Zalvan, C. H., & Rudd, C. E. 1992. Engagement of the TcR/CD3 complex stimulates p59fyn(T) activity: detection of associated proteins at 72 and 120-130 kD. *Mol Immunol*, **29**(12), 1417–1425.
- da Silva, A. J., Janssen, O., & Rudd, C. E. 1993. T cell receptor zeta/CD3-p59fyn(T)-associated p120/130 binds to the SH2 domain of p59fyn(T). *J.Exp.Med.*, **178**(6), 2107–2113.
- da Silva, A. J., Rosenfield, J. M., Mueller, I., Bouton, A., Hirai, H., & Rudd, C. E. 1997a. Biochemical analysis of p120/130: a protein-tyrosine kinase substrate restricted to T and myeloid cells. *J.Immunol.*, **158**(5), 2007–2016.
- da Silva, A. J., Li, Z., de Vera, C., Canto, E., Findell, P., & Rudd, C. E. 1997b. 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.U.S.A*, **94**(14), 7493–7498.

Literaturverzeichnis

- Das, B., Shu, X., Day, G. J., Han, J., Krishna, U. M., Falck, J. R., & Broek, D. 2000. Control of intramolecular interactions between the pleckstrin homology and Dbl homology domains of Vav and Sos1 regulates Rac binding. *J Biol Chem*, **275**(20), 15074–15081.
- DeLano, W.L. 2002. *The PyMOL Molecular Graphics System*. World Wide Web <http://www.pymol.org>. PyMol.
- Deleuil, Fabienne, Mogemark, Lena, Francis, Matthew S, Wolf-Watz, Hans, & Fällman, Maria. 2003. Interaction between the Yersinia protein tyrosine phosphatase YopH and eukaryotic Cas/Fyb is an important virulence mechanism. *Cell Microbiol*, **5**(1), 53–64.
- Devadas, S., Zaritskaya, L., Rhee, S. G., Oberley, L., & Williams, M. S. 2002. Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression. *J Exp Med*, **195**(1), 59–70.
- DiNitto, J. P., Cronin, T. C., & Lambright, D. G. 2003. Membrane recognition and targeting by lipid-binding domains. *Sci STKE*, **2003**(213), re16.
- Dluzniewska, J., Zou, L., Harmon, I. R., Ellingson, M. T., & Peterson, E. J. 2007. Immature hematopoietic cells display selective requirements for adhesion- and degranulation-promoting adaptor protein in development and homeostasis. *Eur J Immunol*, Oct 18.
- Dröge, Wulf. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, **82**(1), 47–95.
- Duan, Lei, Reddi, Alagarsamy Lakku, Ghosh, Amiya, Dimri, Manjari, & Band, Hamid. 2004. The Cbl family and other ubiquitin ligases: destructive forces in control of antigen receptor signaling. *Immunity*, **21**(1), 7–17.
- Duke-Cohan, J. S., Kang, H., Liu, H., & Rudd, C. E. 2006. Regulation and function of SKAP-55 non-canonical motif binding to the SH3c domain of ADAP. *J Biol Chem*, Feb 6.
- Dustin, M. L., & Springer, T. A. 1989. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature*, **341**(6243), 619–624.
- Dustin, M. L., Bivona, T. G., & Philips, M. R. 2004. Membranes as messengers in T cell adhesion signaling. *Nat Immunol*, **5**(4), 363–72.

- Eguchi, H., Ikuta, T., Tachibana, T., Yoneda, Y., & Kawajiri, K. 1997. A nuclear localization signal of human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator/hypoxia-inducible factor 1beta is a novel bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex. *J Biol Chem*, **272**(28), 17640–17647.
- Ewing, Rob M, Chu, Peter, Elisma, Fred, Li, Hongyan, Taylor, Paul, Climie, Shane, McBroom-Cerajewski, Linda, Robinson, Mark D, O'Connor, Liam, Li, Michael, Taylor, Rod, Dharsee, Moyez, Ho, Yuen, Heilbut, Adrian, Moore, Lynda, Zhang, Shudong, Ornatsky, Olga, Bukhman, Yury V, Ethier, Martin, Sheng, Yinglun, Vasilescu, Julian, Abu-Farha, Mohamed, Lambert, Jean-Philippe, Duewel, Henry S, Stewart, Ian I, Kuehl, Bonnie, Hogue, Kelly, Colwill, Karen, Gladwish, Katharine, Muskat, Brenda, Kinach, Robert, Adams, Sally-Lin, Moran, Michael F, Morin, Gregg B, Topaloglou, Thodoros, & Figeys, Daniel. 2007. Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol Syst Biol*, **3**, 89.
- Ficarro, Scott B, Salomon, Arthur R, Brill, Laurence M, Mason, Daniel E, Stettler-Gill, Michelle, Brock, Ansgar, & Peters, Eric C. 2005. Automated immobilized metal affinity chromatography/nano-liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry platform for profiling protein phosphorylation sites. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **19**(1), 57–71. ADAP 398.
- Filipp, Dominik, Zhang, Jenny, Leung, Bernadine L, Shaw, Andrey, Levin, Steven D, Veillette, Andre, & Julius, Michael. 2003. Regulation of Fyn through translocation of activated Lck into lipid rafts. *J Exp Med*, **197**(9), 1221–1227.
- Fleischer, Tracey C, Weaver, Connie M, McAfee, K. Jill, Jennings, Jennifer L, & Link, Andrew J. 2006. Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes. *Genes Dev*, **20**(10), 1294–1307.
- Fostel, L. V., Dluzniewska, J., Shimizu, Y., Burbach, B. J., & Peterson, E. J. 2006. ADAP is dispensable for NK cell development and function. *Int Immunol*, Jun 14.
- Fujii, Y., Wakahara, S., Nakao, T., Hara, T., Ohtake, H., Komurasaki, T., Kitamura, K., Tatsuno, A., Fujiwara, N., Hozumi, N., Ra, C., Kitamura, D., & Goitsuka, R. 2003. Targeting of MIST to Src-family kinases via SKAP55-SLAP-130 adaptor complex in mast cells. *FEBS Lett.*, **540**(1-3), 111–116.
- Gaide, O., Favier, B., Legler, D. F., Bonnet, D., Brissoni, B., Valitutti, S., Bron, C., Tschopp, J., & Thome, M. 2002. CARMA1 is a critical lipid

Literaturverzeichnis

- raft-associated regulator of TCR-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol*, **3**(9), 836–43.
- Ganju, R. K., Hatch, W. C., Avraham, H., Ona, M. A., Druker, B., Avraham, S., & Groopman, J. E. 1997. RAFTK, a novel member of the focal adhesion kinase family, is phosphorylated and associates with signaling molecules upon activation of mature T lymphocytes. *J Exp Med*, **185**(6), 1055–1063.
- Geng, L., Raab, M., & Rudd, C. E. 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.*, **163**(11), 5753–5757.
- Geng, L., Pfister, S., Kraeft, S. K., & Rudd, C. E. 2001. Adaptor FYB (Fyn-binding protein) regulates integrin-mediated adhesion and mediator release: differential involvement of the FYB SH3 domain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **98**(20), 11527–11532.
- Goddard, T.D., & Kneller, D. G. 2001. SPARKY 3. University of California, San Francisco.
- Griffiths, E. K., Krawczyk, C., Kong, Y. Y., Raab, M., Hyduk, S. J., Bouchard, D., Chan, V. S., Kozieradzki, I., Oliveira-Dos-Santos, A. J., Wakeham, A., Ohashi, P. S., Cybulsky, M. I., Rudd, C. E., & Penninger, J. M. 2001. Positive regulation of T cell activation and integrin adhesion by the adapter Fyb/Slap. *Science*, **293**(5538), 2260–2263.
- Gros, Piet, Milder, Fin J, & Janssen, Bert J C. 2008. Complement driven by conformational changes. *Nat Rev Immunol*, **8**(1), 48–58.
- Guan, K. L., & Dixon, J. E. 1991. Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal Biochem*, **192**(2), 262–267.
- Hamid, N., Gustavsson, A., Andersson, K., McGee, K., Persson, C., Rudd, C. E., & Fällman, M. 1999. YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages. *Microb.Pathog.*, **27**(4), 231–242.
- Hara, Hiromitsu, Wada, Teiji, Bakal, Chris, Kozieradzki, Ivona, Suzuki, Shinobu, Suzuki, Nobutaka, Nghiem, Mai, Griffiths, Emily K, Krawczyk, Connie, Bauer, Birgit, D'Acquisto, Fulvio, Ghosh, Sankar, Yeh, Wen Chen, Baier, Gottfried, Rottapel, Robert, & Penninger, Josef M. 2003. The MAGUK family protein CARD11 is essential for lymphocyte activation. *Immunity*, **18**(6), 763–775.

- Hara, Hiromitsu, Bakal, Christopher, Wada, Teiji, Bouchard, Denis, Rotapel, Robert, Saito, Takashi, & Penninger, Josef M. 2004. The molecular adapter Carma1 controls entry of I κ B kinase into the central immune synapse. *J Exp Med*, **200**(9), 1167–1177.
- 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**(4), 603–10.
- Heuer, K., Arbusova, 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**(4), 1025–35.
- Heuer, K., Sylvester, M., Kliche, S., Pusch, R., Thiemke, K., Schraven, B., & Freund, C. 2006. Lipid-binding hSH3 domains in immune cell adapter proteins. *J Mol Biol*, **361**(1), 94–104.
- Horton, Paul, Park, Keun-Joon, Obayashi, Takeshi, Fujita, Naoya, Harada, Hajime, Adams-Collier, C. J., & Nakai, Kenta. 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res*, **35**(Web Server issue), W585–W587.
- 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, S. S. 2007. Defining the specificity space of the human src-homology 2 domain. *Mol Cell Proteomics*, Oct 22.
- Huang, Y., Norton, D. D., Precht, P., Martindale, J. L., Burkhardt, J. K., & Wange, R. L. 2005. Deficiency of ADAP/Fyb/SLAP-130 destabilizes SKAP55 in Jurkat T cells. *J.Biol.Chem.*, **280**(25), 23576–23583.
- Hunter, A. J., Ottoson, N., Boerth, N., Koretzky, G. A., & Shimizu, Y. 2000. Cutting edge: a novel function for the SLAP-130/FYB adapter protein in beta 1 integrin signaling and T lymphocyte migration. *J.Immunol.*, **164**(3), 1143–1147.
- Ibarrola, Nieves, Kalume, Dario E, Gronborg, Mads, Iwahori, Akiko, & Pandey, Akhilesh. 2003. A proteomic approach for quantitation of phosphorylation using stable isotope labeling in cell culture. *Anal Chem*, **75**(22), 6043–6049.
- Imbert, V., Peyron, J. F., Farahi Far, D., Mari, B., Auberger, P., & Rossi, B. 1994. Induction of tyrosine phosphorylation and T-cell activation by vanadate peroxide, an inhibitor of protein tyrosine phosphatases. *Biochem J*, **297** (Pt 1)(Jan 1), 163–73.

- IUBC. 1985. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB). Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences. Recommendations 1984. *Eur J Biochem*, **150**(1), 1–5.
- Jakus, Z., Fodor, S., Abram, C. L., Lowell, C. A., & Mocsai, A. 2007. Immunoreceptor-like signaling by beta 2 and beta 3 integrins. *Trends Cell Biol*, **17**(10), 493–501.
- Kang, H., Freund, C., Duke-Cohan, J. S., Musacchio, A., Wagner, G., & Rudd, C. E. 2000. SH3 domain recognition of a proline-independent tyrosine-based RKxxYxxY motif in immune cell adaptor SKAP55. *EMBO J*, **19**(12), 2889–2899.
- Kasirer-Friede, A., Cozzi, M. R., Mazzucato, M., De Marco, L., Ruggeri, Z. M., & Shattil, S. J. 2004. Signaling through GP Ib-IX-V activates alpha IIb beta 3 independently of other receptors. *Blood*, **103**(9), 3403–3411.
- Kasirer-Friede, A., Moran, P. B., Nagrampa-Orje, J., Swanson, K., Ruggeri, Z. M., Schraven, B., Neel, B. G., Koretzky, G. A., & Shattil, S. J. 2006. ADAP is required for normal alphaIIbbeta3 activation by VWF/GP Ib-IX-V and other agonists. *Blood*, Sep 26.
- Kawakami, T., Pennington, C. Y., & Robbins, K. C. 1986. Isolation and oncogenic potential of a novel human src-like gene. *Mol Cell Biol*, **6**(12), 4195–4201.
- Kim, Ji-Eun, & White, Forest M. 2006. Quantitative analysis of phosphotyrosine signaling networks triggered by CD3 and CD28 costimulation in Jurkat cells. *J Immunol*, **176**(5), 2833–2843.
- Kim, Peter W, Sun, Zhen-Yu J, Blacklow, Stephen C, Wagner, Gerhard, & Eck, Michael J. 2003. A zinc clasp structure tethers Lck to T cell coreceptors CD4 and CD8. *Science*, **301**(5640), 1725–1728.
- Kliche, S., Breitling, D., Togni, M., Pusch, R., Heuer, K., Wang, X., Freund, C., Kasirer-Friede, A., Menasche, G., Koretzky, G. A., & Schraven, B. 2006. The ADAP/SKAP55 Signaling Module Regulates T-Cell Receptor-Mediated Integrin Activation through Plasma Membrane Targeting of Rap1. *Mol Cell Biol*, **26**(19), 7130–44.
- Koga, S., Yogo, K., Yoshikawa, K., Samori, H., Goto, M., Uchida, T., Ishida, N., & Takeya, T. 2005. Physical and functional association of c-Src and adhesion and degranulation-promoting adaptor protein (ADAP) in osteoclastogenesis in vitro. *J.Biol.Chem.*

- Krause, M., Sechi, A. S., Konradt, M., Monner, D., Gertler, F. B., & Wehl- and, J. 2000. Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton. *J.Cell Biol.*, **149**(1), 181–194.
- Kwon, J., Qu, C. K., Maeng, J. S., Falahati, R., Lee, C., & Williams, M. S. 2005. Receptor-stimulated oxidation of SHP-2 promotes T-cell adhesion through SLP-76-ADAP. *EMBO J.*
- Ladbury, J. E., Lemmon, M. A., Zhou, M., Green, J., Botfield, M. C., & Schlessinger, J. 1995. Measurement of the binding of tyrosyl phosphopeptides to SH2 domains: a reappraisal. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **92**(8), 3199–3203.
- Ladbury, J. E., Hensmann, M., Panayotou, G., & Campbell, I. D. 1996. Alternative modes of tyrosyl phosphopeptide binding to a Src family SH2 domain: implications for regulation of tyrosine kinase activity. *Biochemistry*, **35**(34), 11062–11069.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(5259), 680–685.
- Lafuente, Esther M, van Puijenbroek, André A F L, Krause, Matthias, Carman, Christopher V, Freeman, Gordon J, Berezovskaya, Alla, Constantine, Erica, Springer, Timothy A, Gertler, Frank B, & Boussiotis, Vassiliki A. 2004. RIAM, an Ena/VASP and Profilin ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion. *Dev Cell*, **7**(4), 585–595.
- Ley, S. C., Marsh, M., Bebbington, C. R., Proudfoot, K., & Jordan, P. 1994. Distinct intracellular localization of Lck and Fyn protein tyrosine kinases in human T lymphocytes. *J Cell Biol*, **125**(3), 639–649.
- Li, Lei, Wu, Chenggang, Huang, Haiming, Zhang, Kaizhong, Gan, Jacob, & Li, Shawn S-C. 2008. Prediction of phosphotyrosine signaling networks using a scoring matrix-assisted ligand identification approach. *Nucleic Acids Res*, **36**(10), 3263–3273.
- Liang, X. Q., Lu, Y., Wilkes, M., Neubert, T. A., & Resh, M. D. 2004. The N-terminal SH4 region of the Src family kinase Fyn is modified by methylation and heterogeneous fatty acylation - Role in membrane targeting, cell adhesion, and spreading. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(9), 8133–8139.
- Lin, H., Hutchcroft, J. E., Andoniou, C. E., Kamoun, M., Band, H., & Bierer, B. E. 1998. Association of p59(fyn) with the T lymphocyte

- costimulatory receptor CD2. Binding of the Fyn Src homology (SH) 3 domain is regulated by the Fyn SH2 domain. *J.Biol.Chem.*, **273**(31), 19914–19921.
- Liu, J., Kang, H., Raab, M., da Silva, A. J., Kraeft, S. K., & Rudd, C. E. 1998. FYB (FYN binding protein) serves as a binding partner for lymphoid protein and FYN kinase substrate SKAP55 and a SKAP55-related protein in T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **95**(15), 8779–8784.
- Marie-Cardine, A., Hendricks-Taylor, L. R., Boerth, N. J., Zhao, H., Schraven, B., & Koretzky, G. A. 1998. Molecular interaction between the Fyn-associated protein SKAP55 and the SLP-76-associated phosphoprotein SLAP-130. *J.Biol.Chem.*, **273**(40), 25789–25795.
- Marie-Cardine, A., Kirchgessner, H., & Schraven, B. 1999. Molecular alterations of the Fyn-complex occur as late events of human T cell activation. *Eur.J.Immunol.*, **29**(4), 1175–1187.
- Marie-Cardine, Anne, Bruyns, Eddy, Eckerskorn, Christoph, Kirchgessner, Henning, Meuer, Stefan C., & Schraven, Burkhardt. 1997. Molecular Cloning of SKAP55, a Novel Protein That Associates with the Protein Tyrosine Kinase p59fyn in Human T-lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, **272**(26), 16077–16080.
- McGuffin, L. J., Bryson, K., & Jones, D. T. 2000. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, **16**(4), 404–405.
- Medeiros, R. B., Dickey, D. M., Chung, H., Quale, A. C., Nagarajan, L. R., Billadeau, D. D., & Shimizu, Y. 2005. Protein kinase D1 and the beta 1 integrin cytoplasmic domain control beta 1 integrin function via regulation of Rap1 activation. *Immunity*, **23**(2), 213–26.
- Medeiros, R. B., Burbach, B. J., Mueller, K. L., Srivastava, R., Moon, J. J., Highfill, S., Peterson, E. J., & Shimizu, Y. 2007. Regulation of NF-kappaB activation in T cells via association of the adapter proteins ADAP and CARMA1. *Science*, **316**(5825), 754–8.
- Menasche, G., Kliche, S., Chen, E. J., Stradal, T. E., Schraven, B., & Koretzky, G. 2007. RIAM Links the ADAP/SKAP-55 Signaling Module to Rap1 Facilitating TCR-Mediated Integrin Activation. *Mol Cell Biol*, Apr 2.
- Monks, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N., & Kupfer, A. 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*, **395**(6697), 82–86.

- Moog-Lutz, C., Peterson, E. J., Lutz, P. G., Eliason, S., Cave-Riant, F., Singer, A., Di Gioia, Y., Dmowski, S., Kamens, J., Cayre, Y. E., & Koretzky, G. 2001. PRAM-1 is a novel adaptor protein regulated by retinoic acid (RA) and promyelocytic leukemia (PML)-RA receptor alpha in acute promyelocytic leukemia cells. *J Biol Chem*, **276**(25), 22375–81.
- Mueller, K. L., Thomas, M. S., Burbach, B. J., Peterson, E. J., & Shimizu, Y. 2007. Adhesion and Degranulation-Promoting Adapter Protein (ADAP) Positively Regulates T Cell Sensitivity to Antigen and T Cell Survival. *J Immunol*, **179**(6), 3559–69.
- Mulhern, T. D., Shaw, G. L., Morton, C. J., Day, A. J., & Campbell, I. D. 1997. The SH2 domain from the tyrosine kinase Fyn in complex with a phosphotyrosyl peptide reveals insights into domain stability and binding specificity. *Structure*, **5**(10), 1313–1323.
- Musacchio, A., Noble, M., Pauptit, R., Wierenga, R., & Saraste, M. 1992. Crystal structure of a Src-homology 3 (SH3) domain. *Nature*, **359**(6398), 851–855.
- Musci, M. A., Hendricks-Taylor, L. R., Motto, D. G., Paskind, M., Kamens, J., Turck, C. W., & Koretzky, G. A. 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**(18), 11674–11677.
- Neelamegham, S., Taylor, A. D., Burns, A. R., Smith, C. W., & Simon, S. I. 1998. Hydrodynamic shear shows distinct roles for LFA-1 and Mac-1 in neutrophil adhesion to intercellular adhesion molecule-1. *Blood*, **92**(5), 1626–1638.
- Nichols, Kim E, Haines, Kathleen, Myung, Peggy S, Newbrough, Sally, Myers, Erin, Jumaa, Hassan, Shedlock, Devon J, Shen, Hao, & Koretzky, Gary A. 2004. Macrophage activation and Fcγ receptor-mediated signaling do not require expression of the SLP-76 and SLP-65 adaptors. *J Leukoc Biol*, **75**(3), 541–552.
- Niebuhr, K., Ebel, F., Frank, R., Reinhard, M., Domann, E., Carl, U. D., Walter, U., Gertler, F. B., Wehland, J., & Chakraborty, T. 1997. A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *EMBO J*, **16**(17), 5433–5444.
- Nishida, Noritaka, Xie, Can, Shimaoka, Motomu, Cheng, Yifan, Walz, Thomas, & Springer, Timothy A. 2006. Activation of leukocyte be-

Literaturverzeichnis

- ta2 integrins by conversion from bent to extended conformations. *Immunity*, **25**(4), 583–594.
- Obenauer, John C, Cantley, Lewis C, & Yaffe, Michael B. 2003. Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res*, **31**(13), 3635–3641.
- Okabe, S., Tauchi, T., Ohyashiki, K., & Broxmeyer, H. E. 2006. Stromal-cell-derived factor-1/CXCL12-induced chemotaxis of a T cell line involves intracellular signaling through Cbl and Cbl-b and their regulation by Src kinases and CD45. *Blood Cells Mol Dis*, Feb 23.
- Palacios, Emil H, & Weiss, Arthur. 2004. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene*, **23**(48), 7990–8000.
- Papayannopoulos, V., Co, C., Prehoda, K. E., Snapper, S., Taunton, J., & Lim, W. A. 2005. A polybasic motif allows N-WASP to act as a sensor of PIP(2) density. *Mol. Cell*, **17**(2), 181–191.
- Paul, W. E., & Seder, R. A. 1994. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*, **76**(2), 241–251.
- Pazdrak, Konrad, Young, Travis W, Stafford, Susan, Olszewska-Pazdrak, Barbara, Straub, Christof, Starosta, Vitaliy, Brasier, Allan, & Kurosky, Alexander. 2008. Cross-talk between ICAM-1 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor signaling modulates eosinophil survival and activation. *J Immunol*, **180**(6), 4182–4190.
- Peterson, E. J. 2003. The TCR ADAPts to integrin-mediated cell adhesion. *Immunol.Rev.*, **192**, 113–121.
- Peterson, E. J., Woods, M. L., Dmowski, S. A., Derimanov, G., Jordan, M. S., Wu, J. N., Myung, P. S., Liu, Q. H., Pribila, J. T., Freedman, B. D., Shimizu, Y., & Koretzky, G. A. 2001. Coupling of the TCR to integrin activation by Slap-130/Fyb. *Science*, **293**(5538), 2263–2265.
- Pintar, A., Hensmann, M., Jumel, K., Pitkeathly, M., Harding, S. E., & Campbell, I. D. 1996. Solution studies of the SH2 domain from the fyn tyrosine kinase: secondary structure, backbone dynamics and protein association. *Eur Biophys J*, **24**(6), 371–380.
- Piotukh, Kirill, Kosslick, Daniela, Zimmermann, Jurgen, Krause, Eberhard, & Freund, Christian. 2007. Reversible disulfide bond formation of intracellular proteins probed by NMR spectroscopy. *Free Radical Biology and Medicine*, **43**(9), 1263–1270.

- Pizon, V., Desjardins, M., Bucci, C., Parton, R. G., & Zerial, M. 1994. Association of Rap1a and Rap1b proteins with late endocytic/phagocytic compartments and Rap2a with the Golgi complex. *J Cell Sci*, **107** (Pt 6)(Jun), 1661–1670.
- Raab, M., Kang, H., da Silva, A., Zhu, X., & Rudd, C. E. 1999. FYN-T-FYB-SLP-76 interactions define a T-cell receptor zeta/CD3-mediated tyrosine phosphorylation pathway that up-regulates interleukin 2 transcription in T-cells. *J.Biol.Chem.*, **274**(30), 21170–21179.
- Reedquist, K. A., Ross, E., Koop, E. A., Wolthuis, R. M., Zwartkruis, F. J., van Kooyk, Y., Salmon, M., Buckley, C. D., & Bos, J. L. 2000. The small GTPase, Rap1, mediates CD31-induced integrin adhesion. *J Cell Biol*, **148**(6), 1151–1158.
- Rush, John, Moritz, Albrecht, Lee, Kimberly A, Guo, Ailan, Goss, Valerie L, Spek, Erik J, Zhang, Hui, Zha, Xiang-Ming, Polakiewicz, Roberto D, & Comb, Michael J. 2005. Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat Biotechnol*, **23**(1), 94–101.
- Salazar, C., & Hofer, T. 2003. Allosteric regulation of the transcription factor NFAT1 by multiple phosphorylation sites: a mathematical analysis. *J.Mol.Biol.*, **327**(1), 31–45.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**(12), 5463–5467.
- Semba, K., Nishizawa, M., Miyajima, N., Yoshida, M. C., Sukegawa, J., Yamanashi, Y., Sasaki, M., Yamamoto, T., & Toyoshima, K. 1986. yes-related protooncogene, syn, belongs to the protein-tyrosine kinase family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**(15), 5459–5463.
- Seykora, John T, Mei, Lijuan, Dotto, G. Paolo, & Stein, Paul L. 2002. 'Srcasm: a novel Src activating and signaling molecule. *J Biol Chem*, **277**(4), 2812–2822.
- Shaw, A. S., & Dustin, M. L. 1997. Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity*, **6**(4), 361–369.
- Shimaoka, Motomu, Xiao, Tsan, Liu, Jin-Huan, Yang, Yuting, Dong, Yicheng, Jun, Chang-Duk, McCormack, Alison, Zhang, Rongguang, Joachimiak, Andrzej, Takagi, Junichi, Wang, Jia-Huai, & Springer, Timothy A. 2003. Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation. *Cell*, **112**(1), 99–111.

Literaturverzeichnis

- Smith, A., Stanley, P., Jones, K., Svensson, L., McDowall, A., & Hogg, N. 2007. The role of the integrin LFA-1 in T-lymphocyte migration. *Immunol Rev*, **218**(Aug), 135–46.
- Smith, L. J., Sutcliffe, M. J., Redfield, C., & Dobson, C. M. 1991. Analysis of phi and chi 1 torsion angles for hen lysozyme in solution from ¹H NMR spin-spin coupling constants. *Biochemistry*, **30**(4), 986–996.
- Studier, F. W. 2005. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif*, **41**(1), 207–34.
- Suetsugu, Shiro, Hattori, Mitsuharu, Miki, Hiroaki, Tezuka, Tohru, Yamamoto, Tadashi, Mikoshiba, Katsuhiko, & Takenawa, Tadaomi. 2002. Sustained activation of N-WASP through phosphorylation is essential for neurite extension. *Dev Cell*, **3**(5), 645–658.
- Sugie, K., Jeon, M. S., & Grey, H. M. 2004. Activation of naive CD4 T cells by anti-CD3 reveals an important role for Fyn in Lck-mediated signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **101**(41), 14859–14864.
- Suzuki, J., Yamasaki, S., Wu, J., Koretzky, G. A., & Saito, T. 2007. The actin cloud induced by LFA-1-mediated outside-in signals lowers the threshold for T-cell activation. *Blood*, **109**(1), 168–75.
- Tadokoro, Seiji, Shattil, Sanford J, Eto, Koji, Tai, Vera, Liddington, Robert C, de Pereda, Jose M, Ginsberg, Mark H, & Calderwood, David A. 2003. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science*, **302**(5642), 103–106.
- Takagi, Junichi, Petre, Benjamin M, Walz, Thomas, & Springer, Timothy A. 2002. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell*, **110**(5), 599–511.
- Takahashi, Tetsuya, Yamashita, Hiroshi, Nagano, Yoshito, Nakamura, Takeshi, Ohmori, Hiromitsu, Avraham, Hava, Avraham, Shalom, Yasuda, Mineo, & Matsumoto, Masayasu. 2003. Identification and characterization of a novel Pyk2/related adhesion focal tyrosine kinase-associated protein that inhibits alpha-synuclein phosphorylation. *J Biol Chem*, **278**(43), 42225–42233.
- Tian, J., Pabst, O., Romermann, D., Skubich, S., Forster, R., Beckmann, J., Chen, J. H., & Hoffmann, M. W. 2007. Inactivation of T-Cell Receptor-Mediated Integrin Activation Prolongs Allograft Survival in ADAP-Deficient Mice. *Transplantation*, **84**(3), 400–406.

- Timms, J. F., Swanson, K. D., Marie-Cardine, A., Raab, M., Rudd, C. E., Schraven, B., & Neel, B. G. 1999. SHPS-1 is a scaffold for assembling distinct adhesion-regulated multi-protein complexes in macrophages. *Curr.Biol.*, **9**(16), 927–930.
- Tohyama, Yumi, Katagiri, Koko, Pardi, Ruggero, Lu, Chafen, Springer, Timothy A, & Kinashi, Tatsuo. 2003. The critical cytoplasmic regions of the alphaL/beta2 integrin in Rap1-induced adhesion and migration. *Mol Biol Cell*, **14**(6), 2570–2582.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**(9), 4350–4354.
- Tsujikawa, Kazutake, Ichijo, Tomoko, Moriyama, Kazuki, Tadotsu, Noriko, Sakamoto, Kazuhiro, Sakane, Naoki, ichiro Fukada, So, Furukawa, Tatsuhiko, Saito, Haruo, & Yamamoto, Hiroshi. 2002. Regulation of Lck and Fyn tyrosine kinase activities by transmembrane protein tyrosine phosphatase leukocyte common antigen-related molecule. *Mol Cancer Res*, **1**(2), 155–163.
- van Kooyk, Y., van Vliet, S. J., & Figdor, C. G. 1999. The actin cytoskeleton regulates LFA-1 ligand binding through avidity rather than affinity changes. *J Biol Chem*, **274**(38), 26869–26877.
- van Paridon, P. A., de Kruijff, B., Ouwerkerk, R., & Wirtz, K. W. 1986. Polyphosphoinositides undergo charge neutralization in the physiological pH range: a ³¹P-NMR study. *Biochim Biophys Acta*, **877**(1), 216–219.
- Veale, M., Raab, M., Li, Z., da Silva, A. J., Kraeft, S. K., Weremowicz, S., Morton, C. C., & Rudd, C. E. 1999. Novel isoform of lymphoid adaptor FYN-T-binding protein (FYB-130) interacts with SLP-76 and up-regulates interleukin 2 production. *J.Biol.Chem.*, **274**(40), 28427–28435.
- Vincenti, Flavio, & Luggen, Michael. 2007. T cell costimulation: a rational target in the therapeutic armamentarium for autoimmune diseases and transplantation. *Annu Rev Med*, **58**, 347–358.
- Wolven, A., Okamura, H., Rosenblatt, Y., & Resh, M. D. 1997. Palmitoylation of p59fyn is reversible and sufficient for plasma membrane association. *Mol Biol Cell*, **8**(6), 1159–73.
- Wu, J. N., & Koretzky, G. A. 2004. The SLP-76 family of adapter proteins. *Semin Immunol*, **16**(6), 379–93.

- Wu, J. N., Jordan, M. S., Silverman, M. A., Peterson, E. J., & Koretzky, G. A. 2004. Differential requirement for adapter proteins Src homology 2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa and adhesion- and degranulation-promoting adapter protein in Fcepsilon-RI signaling and mast cell function. *J.Immunol.*, **172**(11), 6768–6774.
- Wu, J. N., Gheith, S., Bezman, N. A., Liu, Q. H., Fostel, L. V., Swanson, A. M., Freedman, B. D., Koretzky, G. A., & Peterson, E. J. 2006. Adhesion- and degranulation-promoting adapter protein is required for efficient thymocyte development and selection. *J Immunol*, **176**(11), 6681–9.
- Wu, Liangtang, Yu, Zhenbao, & Shen, Shi-Hsiang. 2002. SKAP55 recruits to lipid rafts and positively mediates the MAPK pathway upon T cell receptor activation. *J Biol Chem*, **277**(43), 40420–40427.
- Xue, Yu, Ren, Jian, Gao, Xinjiao, Jin, Changjiang, Wen, Longping, & Yao, Xuebiao. 2008. GPS 2.0: Prediction of kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol Cell Proteomics*, May.
- Yablonski, D., Kuhne, M. R., Kadlecsek, T., & Weiss, A. 1998. Uncoupling of nonreceptor tyrosine kinases from PLC-gamma1 in an SLP-76-deficient T cell. *Science*, **281**(5375), 413–416.
- Yasuda, Koubun, Nagafuku, Masakazu, Shima, Takaki, Okada, Masato, Yagi, Takeshi, Yamada, Takenao, Minaki, Yasuko, Kato, Akiko, Tani-Ichi, Shizue, Hamaoka, Toshiyuki, & Kosugi, Atsushi. 2002. Cutting edge: Fyn is essential for tyrosine phosphorylation of Csk-binding protein/phosphoprotein associated with glycolipid-enriched microdomains in lipid rafts in resting T cells. *J Immunol*, **169**(6), 2813–2817.
- Yuan, M., Mogemark, L., & Fällman, M. 2005a. Fyn binding protein, Fyb, interacts with mammalian actin binding protein, mAbp1. *FEBS Lett.*, **579**(11), 2339–2347.
- Yuan, M., Deleuil, F., & Fällman, M. 2005b. Interaction between the Yersinia Tyrosine Phosphatase YopH and Its Macrophage Substrate, Fyn-Binding Protein, Fyb. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **9**(3-4), 214–23.
- Zahedi, René P, Lewandrowski, Urs, Wiesner, Julia, Wortelkamp, Stefanie, Moebius, Jan, Schütz, Claudia, Walter, Ulrich, Gambaryan, Stepan, & Sickmann, Albert. 2008. Phosphoproteome of resting human platelets. *J Proteome Res*, **7**(2), 526–534.
- Zamoyska, Rose, Basson, Albert, Filby, Andrew, Legname, Giuseppe, Lovatt, Matthew, & Seddon, Benedict. 2003. The influence of the src-family kinases, Lck and Fyn, on T cell differentiation, survival and activation. *Immunol Rev*, **191**(Feb), 107–118.

- Zhang, W., Tribble, R. P., & Samelson, L. E. 1998. LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity*, **9**(2), 239–246.
- Zhu, Minghua, Shen, Shudan, Liu, Yan, Granillo, Olivia, & Zhang, Weiguo. 2005. Cutting Edge: Localization of linker for activation of T cells to lipid rafts is not essential in T cell activation and development. *J Immunol*, **174**(1), 31–35.
- Zimmermann, J., & Freund, C. 2005. NMR assignment of the reduced and oxidized forms of the human ADAP hSH3-1 domain. *J.Biomol.NMR*, **32**(1), 94.
- Zimmermann, J., Kuhne, R., Sylvester, M., & Freund, C. 2007. Redox-regulated conformational changes in an SH3 domain. *Biochemistry*, **46**(23), 6971–7.
- Zou, Liangxing, Mendez, Felipe, Martin-Orozco, Natalia, & Peterson, Erik J. 2008. Defective positive selection results in T cell lymphopenia and increased autoimmune diabetes in ADAP-deficient BDC2.5-C57BL/6 mice. *Eur J Immunol*, **38**(4), 986–994.

Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit

Heuer, K., Sylvester, M., Kliche, S., Pusch, R., Thiemke, K., Schraven, B., & Freund, C. 2006. Lipid-binding hSH3 domains in immune cell adapter proteins. *J Mol Biol*, **361**(1), 94–104.

*Beitrag: Kosedimentation von ADAP-Domänen mit Lipidvesikeln.
Bestimmung des apparenten K_d -Wertes für hSH3^N an PC:PS:PI(4,5)P₂=
50:48:2. Untersuchung der Abhängigkeit der PI(4,5)P₂-Bindung
von hSH3^C.*

Zimmermann, J., Kühne, R., Sylvester, M., & Freund, C. 2007. Redox-regulated conformational changes in an SH3 domain. *Biochemistry*, **46**(23), 6971–7.

*Beitrag: Untersuchung des Einflusses der Redox-Bedingungen
auf die Lipidbindungseigenschaften von ADAP-hSH3^N.*

Danksagung

Mein Dank gilt Priv.-Doz. Dr. Christian Freund für die Überlassung des Themas, die intensive und interessierte Betreuung der Arbeit und stete Gesprächsbereitschaft.

Ich danke Frau Prof. Dr. Petra Knaus für die Begutachtung dieser Arbeit und Herrn Prof. Dr. Ferdinand Hucho für die Unterstützung.

Den derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Freund danke ich für die angenehme Zusammenarbeit und den intensiven Austausch. Insbesondere danke ich den ehemaligen Kollegen Dr. Matthias Heinze und Dr. Michael Kofler für das fachliche Interesse und den fachfremden Spaß.

Vielen Dank an Katharina Thiemke und Kathrin Motzny für die erstklassige experimentelle und logistische Unterstützung.

Allen Kooperationspartnern, die an den Ergebnissen beteiligt waren danke ich für die gute Zusammenarbeit. Insbesondere danke ich

- den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Massenspektrometrie (Dr. Eberhard Krause) für die Analysen: Dr. Clementine Klemm, Dr. Michael Schümann, Heidemarie Lerch und Heike Stephanowitz.
- Dr. Andreas Schlosser (ZBSA, Freiburg) für weitere massenspektrometrische Daten.
- Dr. Carlos Salazar und Prof. Dr. Thomas Höfer (DKFZ, Heidelberg) für interessante Einblicke in die Systembiologie.
- Dr. Stefanie Kliche für viele Hinweise zum biologischen Kontext von ADAP, für wichtige Materialien und die Zusammenarbeit bei biologischen Assays.

Dank an alle, die diese Arbeit durch Hinweise und Korrekturvorschläge verbessert haben!

Meinen Eltern danke ich besonders für die geduldige Unterstützung sowie Katharina und Elias für die unterstützende Geduld.

Die Forschung darf nicht behindert werden!