

Zusammenfassung

Beinahe alle zellulären Prozesse hängen von fein abgestimmten Protein-Protein-Wechselwirkungen ab. Ein nicht unwesentlicher Teil dieser Wechselwirkungen wird durch eine relativ kleine Anzahl sequentiell und strukturell konservierter Protein-Interaktionsdomänen über meist konservierte Wechselwirkungsmechanismen vermittelt. Einige dieser Wechselwirkungen sind auch interessante Angriffspunkte für neue pharmakologische Interventionsstrategien.

In dieser Arbeit wurden qualitative und quantitative Wechselwirkungsmodelle auf der Sequenz-, Struktur- und Komplexstrukturebene erstellt, um die Bindungs- und Spezifitätsmechanismen zu verstehen und neue potentielle Wechselwirkungen für Protein-Interaktionsdomänen (WW- und PDZ-Domänen) vorherzusagen. Diese statistischen Modelle wurden auf der Basis experimenteller Wechselwirkungsdaten aus den Screenings von 42 WW-Domänen bzw. 3 PDZ-Domänen mit Peptidbibliotheken trainiert.

Für WW-Domänen konnte auf Sequenzebene ein Klassifizierungssystem entwickelt werden, welches zum ersten Mal die umfassende Klassifizierung sowohl der WW-Domänen als auch ihrer prolinreichen Liganden allein an Hand ihrer Sequenzen in die folgenden 6 Spezifitätsgruppen erlaubt: die Y-Spezifitätsgruppe ist durch das $xPPxY$ -Erkennungsmotiv charakterisiert, die R_0 -Gruppe durch das $(P/F/I/V)P(P/G)PPPR$ -Motiv, die R_1 -Gruppe durch das $PPPRGPPP$ -Motiv, die L-Gruppe durch das $PPLPP$ -Motiv, die Phosphoserin(poS)/Phosphothreonin(poT)-Gruppe durch das $(poT/poS)P$ -Motiv und die poly-P-Gruppe durch das $(P/I/V/L)PPPPP$ -Motiv. Da für 5 der 6 Spezifitätsgruppen die spezifitätsbestimmenden Reste auch in den Domänen identifiziert wurden, konnten 66% aller 482 bekannten WW-Domänen (SMART-Datenbank, Stand: 15.11.2001) einer der Spezifitätsgruppen zugeordnet werden. Die vorhergesagte Tyrosin-Spezifität für 3 WW-Domänen mit bislang unbekannter Spezifität konnte anschließend experimentell bestätigt werden.

Für Wechselwirkungsmodelle auf Struktur- und Komplexstrukturebene wurden die 3D-Strukturen aller 42 in dieser Arbeit experimentell untersuchten WW-Domänen durch Homo-

logie-Modellierung generiert. Darüber hinaus wurden Komplexstrukturmodelle für jede der 6 Spezifitätsgruppen auf der Basis systematischer Analysen der Erkennungsmotive (Substitutionsanalysen) entwickelt. Damit konnte erstmals eine in sich konsistente Hypothese über den Mechanismus der Bindung argininhaltiger Liganden durch WW-Domänen der R_a- und R_b-Spezifitätsgruppen vorgeschlagen werden.

Auf der Basis dieser modellierten Strukturen der WW-Domänen wurde ein quantitatives Struktur-Aktivitäts-Modell der Tyrosin-Spezifität mit Hilfe der *Comparative-Molecular-Field-Analyse* (CoMFA) erstellt. Dieses CoMFA-Modell ermöglicht ausgehend von der Struktur einer Domänen die Vorhersage der Affinität gegenüber tyrosinhaltigen Liganden.

Auf der Basis der modellierten Strukturen für WW-Domänen/PPxY-Liganden-Komplexen wurde mit Hilfe der *Comparative-Binding-Energy-Analyse* (COMBINE) ein verbessertes quantitatives Struktur-Aktivitäts-Modell der Tyrosin-Spezifität erstellt. Die explizite Repräsentation des Liganden in diesem COMBINE-Modell ermöglichte insbesondere das Design eines Liganden mit erhöhter Affinität gegenüber der ersten WW-Domäne der NEDD4-ähnlichen Ubiquitin-Ligase γ RSP5 aus Hefe. Für die Threonin-zu-Aspartat-Mutation in Position -5 relativ zum Tyrosin in dem Peptid $\text{G}\mathbf{T}_{-5}\text{PPPPYTVG}$ wurde eine beinahe dreifach gesteigerte Affinität vorhergesagt. Diese signifikante Steigerung wurde anschließend experimentell bestätigt. Interessanterweise befindet sich innerhalb des Erkennungsmotivs in dem für γ RSP5 bekannten Wechselwirkungspartner YM95_YEAST ebenfalls ein Aspartat in dieser Position, was die *in vivo* Relevanz der Vorhersage unterstreicht.

Schließlich wurde die Methode der *Quantitativen Spezifitäts-Profil* (QSP) entwickelt, die es erstmals erlaubt, die Spezifität einer Protein-Interaktionsdomäne in Form einer Liganden-sequenz-abhängigen Affinitätsfunktion über den gesamten Liganden-Sequenzraum zu quantifizieren. Damit kann nicht nur die Spezifität in einer intuitiven Form (Termschema) visualisiert werden, sondern die QSP-Modelle ermöglichen vor allem die Vorhersage der Affinitäten für alle potentiellen peptidischen Liganden. Exemplarisch wurden QSP-Modelle für die drei PDZ-Domänen aus hAF6, hERBIN und mSNA1 erstellt (<http://www.fmp-berlin.de/nmr/pdz>). Mit ihrer Hilfe wurden die bislang unbekannt optimalen peptidischen Liganden (Superbinder) für jede der drei PDZ-Domänen vorhergesagt. Auch diese konnten anschließend experimentell bestätigt werden. Darüber hinaus ermöglichen QSP-Modelle auch die Quantifizierung der Selektivität konkurrierender Domänen. Für die drei PDZ-Domänen konnten dadurch sowohl signifikante Unterschiede in der Selektivität als auch eine unerwartet große Überlappung der Liganden-Sequenzräume festgestellt werden.