

**Proteomische, biochemische und
biophysikalische Untersuchungen zu
phosphorylierungsabhängigen Interaktionen
des Immunzellproteins ADAP**

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

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Diplom-Biochemiker Benno Kuropka

aus Berlin

2014

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von September 2010 bis November 2014 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin unter Anleitung von Herrn Dr. Eberhard Krause und Herrn Prof. Dr. Christian Freund angefertigt.

1. Gutachter: **Dr. Eberhard Krause**
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)
Massenspektrometrie
Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin

2. Gutachter: **Prof. Dr. Christian Freund**
Freie Universität Berlin
Institut für Chemie und Biochemie
Proteinbiochemie
Thielallee 63, 14195 Berlin

Disputation am: 20.02.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Das angeborene Immunsystem.....	1
1.1.2	Das adaptive Immunsystem	3
1.1.3	Extravasation und Migration von T-Zellen	5
1.1.4	Die immunologische Synapse.....	6
1.1.5	Aktivierung des T-Zellrezeptors und Genregulation	7
1.1.6	Integrinaktivierung und Regulation des Aktin-Zytoskeletts.....	10
1.1.7	Das Adapterprotein ADAP in T-Zellen	14
1.2	Proteomanalyse mittels Massenspektrometrie	20
1.2.1	Affinitäts-Massenspektrometrie (AP-MS)	21
1.2.2	Quantitative Massenspektrometrie	23
1.3	Zielsetzung	25
2	Material und Methoden	27
2.1	Chemikalien, Pufferlösungen und Medien	27
2.2	Peptide und Expressionskonstrukte	27
2.3	Zellkultur und Expression rekombinanter Proteine	28
2.3.1	Kultivierung von Insektenzellen	28
2.3.2	Kultivierung von Jurkat T-Zellen und SILAC-Markierung.....	29
2.3.3	Präparation von primären humanen T-Zellen.....	29
2.3.4	Expression in <i>E. coli</i>	29
2.3.5	Expression von His-FYN und His-ADAP in SF21-Insektenzellen.....	30
2.4	Proteinbiochemische Methoden	31
2.4.1	Zellaufschluss und Affinitätschromatographie.....	31
2.4.2	Größenausschlusschromatographie.....	32
2.4.3	SDS-PAGE.....	32
2.4.4	Western-Blot	33
2.4.5	<i>In vitro</i> -Phosphorylierung mit FYN-Kinase	34
2.5	Pulldown-Experimente	34
2.5.1	Allgemeine Durchführung	34
2.5.2	Immobilisierung über Thiolgruppen.....	35
2.5.3	Immobilisierung über GST	35
2.5.4	<i>Pulldown</i> mit SILAC-Markierung.....	36
2.5.5	<i>Pulldown</i> mit ¹⁸ O-Markierung.....	36
2.6	Enzymatische Spaltung von Proteinen	36
2.6.1	Tryptische in-Gel-Spaltung	37
2.6.2	Tryptische in-Gel-Spaltung (¹⁸ O-Markierung).....	37
2.6.3	Tryptische <i>on-bead</i> -Spaltung	38
2.6.4	Spaltung von Proteinen mit Elastase.....	38
2.7	Biophysikalische Charakterisierung der ADAP-ZAP70-Interaktion	38
2.7.1	Strukturelle Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie.....	38
2.7.2	Quantitative Charakterisierung mittels <i>Microscale Thermophoresis</i> (MST)	39
2.8	Massenspektrometrische Proteinanalytik	40
2.8.1	NanoLC-ESI-MS/MS	40
2.8.2	Identifizierung von Proteinen über eine Datenbanksuche	41
2.8.3	Quantifizierung von SILAC-markierten Proteinen	41
2.8.4	Quantifizierung von ¹⁸ O-markierten Proteinen.....	42
2.8.5	Identifizierung und Quantifizierung von Proteinphosphorylierungen.....	42

2.9 Nachweis der ADAP-ZAP70-Interaktion im zellulären Kontext	42
2.9.1 Co-Immunopräzipitationen und Western-Blot-Analysen	42
2.10 Pulldown-Strategie mit Sortase A-vermittelter Immobilisierung	43
2.10.1 Immobilisierung und <i>Pulldown</i> -Experiment	43
2.10.2 Elution und tryptische in-Lösung-Spaltung	44
2.10.3 2-D RP-RP LC-MS/MS	44
2.10.4 Quantifizierung der Sortase A-vermittelten Ligation mittels MALDI-MS	44
2.10.5 Optimierungsversuche zur Sortase A-vermittelten Ligation	45
3 Ergebnisse	47
3.1 Untersuchungen zur FYN-Kinase vermittelten ADAP-Phosphorylierung	47
3.2 Identifizierung phosphorylierungsabhängiger ADAP-Interaktionspartner	49
3.2.1 <i>Pulldown</i> -Experimente mit den Peptiden ADAP-Y571 und ADAP-Y462	51
3.2.2 <i>Pulldown</i> -Experimente mit der ADAP-hSH3 ^N -Domäne	54
3.2.3 <i>Pulldown</i> -Experimente mit ADAP-600 und ADAP-dbl	58
3.3 Biophysikalische Charakterisierung der ADAP-ZAP70-Interaktion	61
3.3.1 Strukturelle Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie	61
3.3.2 Quantitative Charakterisierung mittels <i>Microscale Thermophoresis</i> (MST)	66
3.4 Co-Immunopräzipitation des ADAP-ZAP70-Komplexes	67
3.5 Sortase A-vermittelte Immobilisierung von Peptiden und Proteinen	68
3.5.1 Optimierung der Sortase A-vermittelten Kopplungsreaktion	71
3.5.2 Absolute Quantifizierung der Matrixbeladung.....	73
3.5.3 Anwendung der Sortase A-vermittelten Immobilisierungsmethodik	74
4 Diskussion	79
4.1 ADAP-Phosphorylierung durch FYN-Kinase	79
4.2 Phosphorylierungsabhängige ADAP-Interaktionspartner	82
4.2.1 Interaktionspartner von ADAP-Y462	82
4.2.2 Interaktionspartner von ADAP-Y571	83
4.2.3 Interaktionspartner von ADAP-600 und ADAP-dbl.....	86
4.2.4 Übersicht phosphorylierungsabhängiger ADAP-Interaktionspartner	88
4.3 Charakterisierung und Validierung der ADAP-ZAP70-Interaktion	90
4.4 Funktionelle Bedeutung der ADAP-ZAP70-Interaktion	93
4.5 Sortase A-vermittelte Immobilisierung für <i>Pulldown</i>-Experimente	97
5 Zusammenfassung	101
6 Zusammenfassung (Englisch)	102
7 Literaturverzeichnis	103
8 Anhang	115
8.1 Abkürzungsverzeichnis	115
8.2 Abbildungsverzeichnis	118
8.3 Tabellenverzeichnis	118
8.4 Publikationen	119
9 Danksagung	121

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem gehört mit einer Masse von 2-3 kg zu den größeren Organen, wobei sich Immunzellen und lymphatische Gewebe über den gesamten Organismus verteilen. Seine Funktion besteht vor allem im Schutz vor Krankheiten, indem es pathogene Strukturen wie z.B. Viren und Mikroorganismen sowie entartete Zellen erkennt und bekämpft. Eine entscheidende Grundlage hierfür ist die Fähigkeit zur Unterscheidung von körpereigenen und körperfremden Strukturen. Störungen des Immunsystems sind die Ursache zahlreicher Krankheiten. So ist ein hyperaktives Immunsystem beispielsweise verantwortlich für schwere Autoimmunkrankheiten wie Diabetes Typ 1 oder Multiple Sklerose. Darüber hinaus sind allergische Reaktionen auf harmlose Umweltstoffe wie Pflanzenpollen oder Tierhaare stark verbreitet. Eine Schwächung des Immunsystems (z.B. durch angeborene Gendefekte oder eine HIV-Infektion) führt hingegen zu einem verminderten Schutz vor Infektionen, die darüber hinaus meist schwerer verlaufen.

Das Immunsystem wird in das angeborene sowie das adaptive („erworbene“) Immunsystem unterteilt. Das evolutionär ältere angeborene Immunsystem dient als erste Verteidigungslinie, indem es Pathogene meist innerhalb weniger Stunden erkennt und zerstört. Gelingt dies nicht, kommt es durch das adaptive Immunsystem innerhalb von mehreren Tagen zu einer hochspezifischen Immunantwort gegen den jeweiligen Erreger. Dabei kooperieren das angeborene und das adaptive Immunsystem auf zellulärer Ebene effektiv miteinander.

Zusätzlich unterscheidet man klassisch die humorale Immunität, die sich auf die Wirkungsweise von Antikörpern und anderer löslicher Faktoren bezieht, von der zellvermittelten Immunität, die sich mit der Wirkung von Immunzellen beschäftigt.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Ein großer Teil von Pathogenen wird bereits effektiv durch unspezifische Mechanismen des angeborenen Immunsystems erfolgreich abgewehrt. Hierzu gehören natürliche Barrieren wie beispielsweise die Epithelzellschicht der Haut, die Schleimhäute der Atemwege sowie die sauren Bedingungen im Magen. Zudem verfügen die Schleimhäute des Dünndarms sowie andere Körperflüssigkeiten (z.B. Tränenflüssigkeit, Speichel, Schweiß) über eine Reihe humoraler Faktoren, die der Abwehr von Pathogenen dienen. Hierunter befinden sich beispielsweise antimikrobielle kationische Peptide (z.B. Defensine) und Enzyme (z.B. Lysozym), die bakterielle Zellwände angreifen und zerstören. Die angeborene Abwehr von Viren erfolgt vor allem durch eine Reihe von

Gewebshormonen, die als Interferone bezeichnet werden und von infizierten Immunzellen sezerniert werden.

Neben den beschriebenen humoralen Faktoren verfügt das angeborene Immunsystem ebenfalls über eine Reihe von verschiedenen Zelltypen, die zur Gruppe der Leukozyten (weiße Blutzellen) gehören. Hierunter befinden sich die Makrophagen, die Erreger durch Phagozytose aufnehmen und enzymatisch zerstören. Den größten Teil der Leukozyten machen die Granulozyten aus, die im Gegensatz zu den Makrophagen über einen polymorphen Kern verfügen. Granulozyten werden bei einer Infektion verstärkt im Knochenmark gebildet und migrieren ebenfalls über den Blutkreislauf in das entzündete Gewebe, wo sie Erreger entweder durch Phagozytose aufnehmen oder durch die Sekretion von toxischen Substanzen (z.B. Sauerstoffradikale) bekämpfen.

Eine besonders schnelle Reaktion auf Pathogene wird durch Mastzellen vermittelt, die vor allem in der Haut und den Schleimhäuten lokalisiert sind. Sie enthalten eine große Zahl an Granula, die mit toxischen und entzündungsfördernden Stoffen wie Histamin gefüllt sind. Bei einem Antigenkontakt werden diese innerhalb von Sekunden in großen Mengen freigesetzt und lösen so die charakteristischen Symptome einer Allergie aus. Die Erkennung von Antigenen erfolgt über Antikörper der Klasse E, die über Oberflächenrezeptoren der Mastzellen gebunden werden. Eine ebenfalls wichtige Rolle bei der schnellen, angeborenen Immunantwort spielen die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die virusinfizierte sowie entartete Zellen erkennen und zerstören. Ein weiterer wichtiger Zelltyp des angeborenen Immunsystems sind die folliculären dendritischen Zellen (*follicular dendritic cells*, fDCs), die in den B-Zell-Follikeln der sekundären lymphatischen Organe wie den Lymphknoten und der Milz lokalisiert sind. Sie besitzen eine fein verzweigte Struktur und unterstützen die angeborene Immunantwort, indem sie Antigene aus dem Lymphstrom aufnehmen und diese unprozessiert über Fc (*fragment crystallisable*)-Rezeptoren oder Komplement-Rezeptoren den B-Lymphozyten präsentieren.

Die Erkennung von Pathogenen durch die Zellen des angeborenen Immunsystems verläuft über evolutionär konservierte Strukturen auf der Oberfläche von Pathogenen (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs). Hierunter befinden sich beispielsweise die Lipopolysaccharide auf der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, das Protein Flagellin, welches zum Aufbau des bakteriellen Flagellums dient, sowie bakterielle DNA, die sich durch eine höhere Anzahl von CpG-Motiven auszeichnet. Im Laufe der Evolution entwickelten sich auf den Zellen der angeborenen Immunabwehr eine Reihe von Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs). Die Erkennung von Pathogenen durch diese PRRs führt zur Aktivierung der Immunzellen und der Auslösung einer Immunantwort. Wichtige Vertreter der PRRs sind die TLRs (*toll-like-receptors*), die evolutionär hochkonserviert sind und ursprünglich in der Taufliege *D. melanogaster* entdeckt wurden [1].

Ein weiterer wichtiger Teil des angeborenen Immunsystems stellt das Komplementsystem dar, einem komplexen System aus mehr als 25 Serumproteinen. Es erkennt Zuckerstrukturen auf der Oberfläche körperfremder Zellen und reagiert mit einer schnellen kaskadenartigen Aktivierung zahlreicher Proteasen, die über verschiedene Mechanismen zu einer Zerstörung des Erregers führen. Darüber hinaus kann das Komplementsystem auch durch Antikörper aktiviert werden, sofern diese einen Erreger (Antigen) gebunden haben, wodurch eine Verbindung zum adaptiven Immunsystem hergestellt wird.

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Die Hauptakteure des adaptiven Immunsystems sind die B-Zellen und die T-Zellen, welche zur Gruppe der Lymphozyten gehören und wie alle Zellen des Immunsystems von pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks abstammen. Ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal der Zellen des angeborenen Immunsystems ist die Tatsache, dass einzelne Zellen sich jeweils in ihrem Antigenrezeptor unterscheiden. Diese molekulare Variabilität der adaptiven Immunabwehr ermöglicht die Erkennung und Bekämpfung einer Vielzahl von Antigenen, die durch die konservierten Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems nicht erkannt werden. B- und T-Zellen bilden darüber hinaus die Grundlage für das Immungedächtnis. Nach einer primären Immunantwort bleiben einige Zellen als sogenannte Gedächtniszellen über Jahrzehnte erhalten und ermöglichen bei erneutem Kontakt mit demselben Erreger eine deutlich schnellere und effektivere Immunantwort [2].

B-Zellen reifen im Knochenmark heran und sind für die Produktion von Antikörpern (humorale Immunantwort) verantwortlich. Jede B-Zelle verfügt über einen B-Zellrezeptor (BCR), der einem auf der Zellmembran verankerten Antikörper entspricht. Durch eine zufällige Rekombination von Gensegmenten (somatische Rekombination) unterscheiden sich B-Zellen in der Spezifität ihres BCR. Erkennt dieser ein Antigen mit hoher Affinität, kommt es zu einer starken Proliferation der entsprechenden B-Zelle (klonale Expansion). Ein Teil der entstandenen Klone differenziert zu Plasmazellen, die daraufhin große Mengen des antigenspezifischen Antikörpers herstellen und in löslicher Form sezernieren. Die löslichen Antikörper binden ihr Antigen mit hoher Affinität und lösen daraufhin vielfältige Effektormechanismen aus. B-Zellen können verschiedene Klassen von Antikörpern mit derselben Spezifität sezernieren, die sich in ihrer Effektorfunktion unterscheiden. So sind Antikörper bzw. Immunglobuline (Ig) der Klasse M (IgM) sehr effektiv bei der Komplementaktivierung und Opsonierung, während IgA und IgG vor allem die Bindung von Antigenen an ihre Zielstrukturen blockieren (Neutralisation). IgE wirkt als erworbener Mastzellrezeptor und ist an der Auslösung von allergischen Reaktionen beteiligt.

Um Reaktionen gegen Selbstantigene zu vermeiden, werden autoreaktive B-Zellen bereits während der Reifung im Knochenmark deletiert. Für eine vollständige Aktivierung von B-Zellen ist neben der Antigenbindung in der Regel ein kostimulatorisches Signal durch T-Zellen nötig, welche zuvor durch die spezifische Erkennung desselben Antigens aktiviert wurden.

Heranreifende T-Zellen (Thymozyten) verlassen das Knochenmark bereits in einem frühen Entwicklungsstadium und reifen im Thymus heran. Abhängig von ihrer Funktion unterscheidet man T-Helferzellen (T_H -Zellen), zytotoxische T-Zellen und regulatorische T-Zellen [3]. Während T_H -Zellen die Immunantwort durch Aktivierung anderer Immunzellen sowie durch Ausschüttung von Zytokinen regulieren, sind zytotoxische T-Zellen auf die Eliminierung von virusinfizierten und entarteten Zellen spezialisiert [4]. Regulatorische T-Zellen wiederum spielen eine wichtige Rolle bei der Suppression der Immunreaktion. T_H -Zellen werden zusätzlich in T_H1 - und T_H2 -Zellen unterteilt, die vor allem an der Aktivierung von Makrophagen (T_H1) bzw. B-Zellen (T_H2) beteiligt sind. Zudem wurde der Subtyp T_H17 entdeckt, der das Interleukin 17 produziert und unter anderem bei Autoimmunreaktionen von Bedeutung ist [5]. Die Unterscheidung der verschiedenen T-Zelltypen und ihrer Entwicklungsstadien erfolgt anhand von charakteristischen Differenzierungsmarkern (*cluster of differentiation*, CD), die auf der Oberfläche der Zellen exprimiert werden. So lassen sich T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen beispielsweise anhand ihrer Oberflächenrezeptoren CD4 ($CD4^+$ -T-Zellen) und CD8 ($CD8^+$ -T-Zellen) voneinander unterscheiden.

T-Zellen erkennen Antigene über ihren T-Zellrezeptor (*T cell receptor*, TCR), der während ihrer Reifung exprimiert wird und analog zum BCR der B-Zellen durch somatische Rekombination eine einzigartige Spezifität aufweist. Thymozyten, deren TCR mit hoher Affinität an die im Thymus präsentierten Selbstantigene bindet, werden durch induzierte Apoptose entfernt. Da auf diese Weise die nicht-bindenden T-Zellen selektiert werden, spricht man von negativer Selektion, welche die Grundlage für die Selbsttoleranz des adaptiven Immunsystems darstellt. Zusätzlich werden T-Zellen entfernt, deren TCR eine zu geringe Affinität für die antigenpräsentierenden MHC (*major histocompatibility complex*)-Moleküle aufweist. Durch diese positive Selektion wird sichergestellt, dass eine Antigenerkennung durch den TCR (im Gegensatz zum BCR) nur erfolgen kann, wenn diese über MHC-Moleküle präsentiert werden. Dieses Konzept wird als MHC-Restriktion bezeichnet. Es wurde 1974 von Rolf Zinkernagel und Peter Doherty entdeckt und 1996 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet [6, 7]. Nur etwa 1-2 % der T-Zellen überstehen die Selektionsprozesse im Thymus und verlassen ihn als reife naive T-Zellen.

1.1.3 Extravasation und Migration von T-Zellen

Nach ihrer Reifung in den primären lymphatischen Organen (Knochenmark, Thymus) gelangen die naiven Immunzellen zunächst in den Blutkreislauf. Von dort emigrieren sie über die Kapillarwände in das Gewebe der sekundären lymphatischen Organe (Lymphknoten, Milz und Schleimhäute), wo sie mit den Antigenen in Kontakt kommen. Diese zielgerichtete Migration wird auch *homing* genannt. Naive T-Zellen können die Blutbahn hierbei nur über spezielle Gefäßwände der Lymphknoten verlassen, die als HEVs (*high endothelial venules*) bezeichnet werden. Dieser mehrstufige Vorgang wird als Extravasation bezeichnet und gliedert sich in folgende Stufen: Rollen, Integrinaktivierung, feste Adhäsion und Diapedese (Abbildung 1) [8, 9].

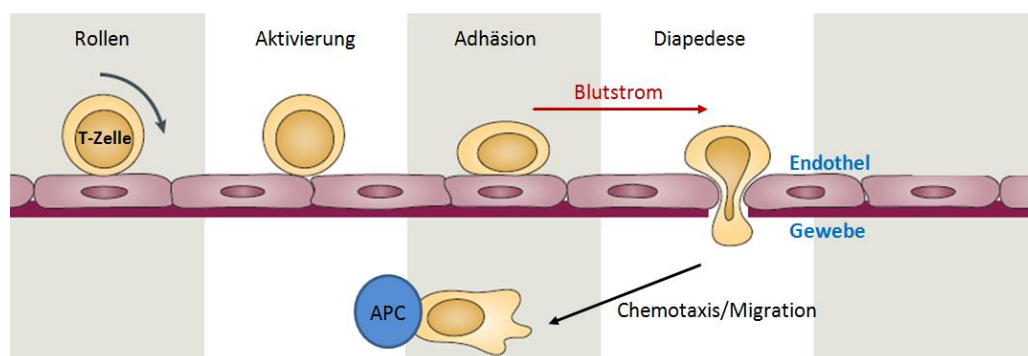


Abbildung 1: Extravasation von T-Zellen. Naive T-Zellen verlassen den Blutkreislauf über einen mehrstufigen Prozess. Das Selektin-abhängige Rollen verlangsamt ihre Bewegung gegen die Scherkräfte des Blutstroms. Die chemokinvermittelte Integrinaktivierung ermöglicht daraufhin eine feste Adhäsion an das Endothel und die Transmigration (Diapedese) in das Gewebe. Dort migrieren die T-Zellen zufällig oder entlang eines Chemokingradienten und untersuchen APCs nach einem passenden Antigen. Abbildung modifiziert ausgehend von [10].

Das Rollen entlang der Endothelzellen gegen die Scherkräfte des Blutstroms wird über Adhäsionsmoleküle, die Selektine, vermittelt. Auf der Oberfläche von T-Zellen wird beispielsweise L-Selektin exprimiert, während auf den Endothelzellen E- und P-Selektine exprimiert werden [11, 12]. Die Selektine gehen kurze reversible Interaktionen mit komplexen Kohlenhydratstrukturen auf der gegenüberliegenden Membranoberfläche ein (z.B. P-Selektin mit PSGL-1, *P-selektin glycoprotein ligand-1*) [13]. Die rollende Bewegung ermöglicht es den T-Zellen, auf Chemokine zu reagieren, die von den HEVs der Lymphknoten über Glykosaminoglykane präsentiert werden. Die Chemokinerkennung führt dann über den *inside-out*-Signalweg (siehe Abschnitt 1.1.6) zur Aktivierung von Integrinen wie LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*) und VLA-4 (*very late antigen 4*) auf der Oberfläche der T-Zelle [14]. LFA-1 bindet fest an Liganden der ICAM (*intercellular adhesion molecule*)-Familie (ICAM 1-5), während VLA-4 an VCAM (*vascular cell adhesion molecule for VLA-4*) bindet. Hierdurch wird eine feste Adhäsion der T-Zellen an das Endothel ermöglicht, gefolgt von der Transmigration (Diapedese) in die T-Zell-Zone des Lymphknotens [15]. Während der Diapedese kommt es zu starken Formveränderungen der T-Zellen und einer temporären Öffnung der Zell-Zell-

Verbindungen (*tight junctions*) zwischen den Endothelzellen [10]. Im Lymphknoten treten die T-Zellen mit der Lymphe in Kontakt, in der Antigene aus dem extrazellulären Gewebe herantransportiert und von antigenpräsentierenden Zellen (APCs, *antigen presenting cells*) präsentiert werden. Die Kolokalisation von naiven T-Zellen mit den APCs (z.B. dendritische Zellen) in der T-Zell-Zone des Lymphknotens wird durch die Ausschüttung der Chemokine CCL19 (*CC motif chemokine ligand 19*) und CCL21 sichergestellt. Diese werden von beiden Zellarten über den Chemokinrezeptor CCR7 (*CC motif chemokine receptor 7*) erkannt, wobei dies gleichzeitig ihre Motilität erhöht [16, 17]. Die T-Zellen scannen daraufhin eine hohe Anzahl an APCs auf der Suche nach passenden Antigenen. T-Zellen, welche über ihren TCR kein passendes Antigen erkennen, verlassen den Lymphknoten nach einiger Zeit über efferente Lymphgefäße und gelangen wieder in das Blutsystem. Der Zyklus beginnt von neuem. Im Falle einer erstmaligen Antigenerkennung durch eine naive T-Zelle (*priming*) bildet sie eine stabile Verbindung (immunologische Synapse) mit der entsprechenden APC aus. Dies führt zur Aktivierung von T-Zellen, die daraufhin stark proliferieren (klonale Expansion). Die entstandenen Klone differenzieren in T-Effektorzellen und verlassen den Lymphknoten über efferente Lymphgefäße in den Blutkreislauf. Im Vergleich zu naiven T-Zellen können T-Effektorzellen durch die Expression entsprechender Rezeptoren nun auch in peripheres Gewebe (z.B. bei einer Entzündung) durch Extravasation emigrieren, um dort bei erneutem Antigenkontakt ihre Effektorfunktionen auszuführen [18].

1.1.4 Die immunologische Synapse

Die Aktivierung des TCRs führt über den *inside-out*-Signalweg zur Aktivierung des Intergrins LFA-1 (siehe Abschnitt 1.1.6), wodurch eine stabile Verbindung zwischen T-Zelle und APC hergestellt wird [19]. An der Kontaktstelle kann sich hierbei eine mikroskopisch sichtbare, supramolekulare Struktur ausbilden, die erstmals 1999 beschrieben wurde und als immunologische Synapse (IS) bezeichnet wird [20]. Sie besteht aus drei konzentrischen Ringen: cSMAC (*central supramolecular activation cluster*), pSMAC (*peripheral SMAC*) und dSMAC (*distal SMAC*), die sich in ihrer Proteinzusammensetzung unterscheiden (Abbildung 2). Der cSMAC enthält vor allem den TCR-CD3-Komplex, den Korezeptor CD28 sowie die Serin/Threonin-Kinase PKC θ (*protein kinase C theta*). Der pSMAC enthält das Integrin LFA-1 sowie Komponenten des Aktin-Zytoskeletts. Die Ausbildung der IS geht mit einer Polarisierung der T-Zelle einher. Dabei kommt es zu einer starken Aktin-Polymerisation in Richtung der Kontaktstelle zur APC, vermittelt durch die Aktin-Regulatoren WASP (*wiskott-aldrich syndrome protein*), WAVE2 (*WASP family member 2*) und den ARP2/3 (*actin related protein 2/3*)-Komplex [21]. Der dSMAC enthält die Tyrosinphosphatase CD45 und das antiadhäsiv wirkende Leukosialin (CD43) [22-24].

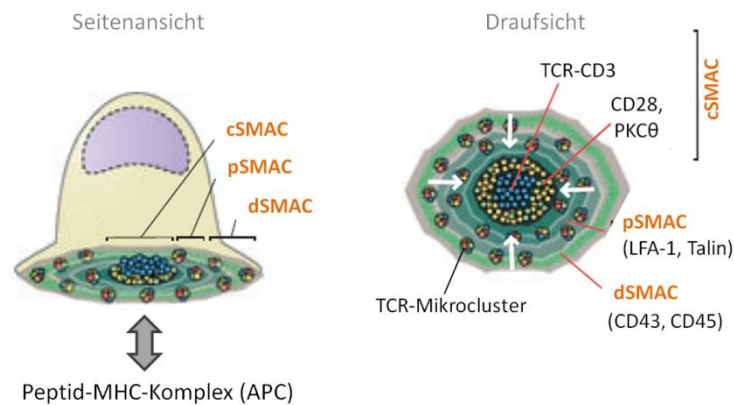


Abbildung 2: Schematische Darstellung der immunologischen Synapse. Die Erkennung von Peptid-MHC-Komplexen führt zu einer konzentrischen Ausbreitung der T-Zelle auf der Oberfläche der APC. Nach etwa zehn Minuten bildet sich eine stabile immunologische Synapse aus. Im cSMAC akkumulieren der TCR-CD3-Komplex, Korezeptoren und PKC θ , die von einem Ring (pSMAC) aus LFA-1 und TALIN umgeben sind. Im dSMAC akkumulieren CD43 und CD45. Zudem bilden sich hier aktive TCR-Mikrocluster bestehend aus dem TCR-CD3-Komplex, Korezeptoren, Kinasen und Adapterproteinen, die in Richtung cSMAC migrieren. Abbildung modifiziert ausgehend von [25].

Die Funktion der IS und des cSMACs für die Aktivierung des TCRs ist umstritten. So bildet sich beim Kontakt zwischen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen und dendritischen Zellen (im Gegensatz zu B-Zellen oder künstlichen Lipiddoppelmembranen) keine IS aus [25]. Stattdessen kommt es an mehreren Kontaktpunkten zur Ausbildung sogenannter multifokaler immunologischer Synapsen, die ebenfalls zur Aktivierung der T-Zelle führen [26]. Untersuchungen mit künstlichen Lipiddoppelschichten zeigten zudem, dass sich aktive TCR-Mikrocluster, bestehend aus dem TCR-CD3-Komplex, Korezeptoren, Kinasen und verschiedenen Adapterproteinen, im dSMAC bilden und dann aktinabhängig in Richtung des aktinfreien cSMAC migrieren (Abbildung 2). Während der Migration verlieren die Mikrocluster Tyrosinkinasen sowie Adapterproteine, wodurch es im cSMAC zu einer Akkumulierung des TCR-CD3-Komplexes, PKC θ (*protein kinase C theta*) und CD28 kommt [27, 28]. Eine mögliche Funktion des cSMAC könnte daher in der Abschaltung des Signalweges liegen, indem aktive TCR-Mikrocluster durch Internalisierung entfernt werden [25]. Bei zytotoxischen T-Zellen spielt die Ausbildung der IS darüber hinaus eine mögliche Rolle bei der gerichteten Ausschüttung von zytotoxischen Granula [29].

1.1.5 Aktivierung des T-Zellrezeptors und Genregulation

Die spezifische Erkennung von Antigenen durch naive T-Zellen erfolgt über ihren variablen TCR. Dieser besteht in der Regel aus einer α - und einer β -Kette und ist stets mit weiteren Transmembranproteinen assoziiert (Abbildung 3A). Hierzu gehören ein ζ -Homodimer sowie der CD3-Komplex, der aus einem $\gamma\epsilon$ -Heterodimer und einem $\delta\epsilon$ -Heterodimer besteht [30]. Über die

Korezeptoren CD4 oder CD8 wird sichergestellt, dass der TCR ausschließlich Peptidantigene erkennt, die von APCs im Komplex mit MHC-Molekülen präsentiert werden (MHC-Restriktion). MHC-Moleküle der Klasse I präsentieren auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers zytosolische Peptide, die über proteasomalen Abbau aus zelleigenen oder viralen Proteinen gebildet wurden. Ihre Erkennung erfolgt durch zytotoxische T-Zellen über den CD8-Korezeptor. MHC-Moleküle der Klasse II präsentieren auf professionellen APCs (DCs und Makrophagen) Peptide von extrazellulären Proteinen, die über Endozytose aktiv aufgenommen wurden. Ihre Erkennung durch T_H-Zellen erfolgt über den CD4-Korezeptor. Für eine vollständige Aktivierung von T_H-Zellen muss zusätzlich eine Bindung ihres CD28-Korezeptors an den B7.1-Rezeptor (CD80) der APC erfolgen.

Die zytoplasmatischen Ketten des CD3-Komplexes sowie des ζζ-Homodimers verfügen über ITAM-Motive (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) mit dem Sequenzmotiv YxxL/I-X₆₋₈-YxxL/I [31]. Nach Aktivierung des TCR-CD3-Komplexes werden die ITAM-Motive durch die Tyrosinkinase LCK (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) an beiden Tyrosinresten phosphoryliert (Abbildung 3B) [32, 33]. Dies geschieht bevorzugt in cholesterin- und glykosphingolipidreichen Mikrodomänen (*lipid rafts*) der Zellmembran, da LCK dort aufgrund von Lipidmodifikationen in höherer Konzentration vorliegt. Die Phosphorylierung der ITAM-Motive wird zudem durch die Interaktion von LCK mit dem CD4- bzw. CD8-Korezeptor begünstigt [34].

ZAP70-Aktivierung

Die phosphorylierten ITAM-Motive des ζζ-Homodimers werden mit hoher Spezifität und Affinität von zwei SH2 (*src homology 2*)-Domänen (TandemSH2, tSH2) der Tyrosinkinase ZAP70 (*zeta chain-associated kinase of 70 kDa*) gebunden. Dies löst strukturelle Veränderungen in der ZAP70-tSH2-Domäne aus, woraufhin ZAP70 durch die SRC-Kinasen LCK und FYN sowie durch Autophosphorylierung in *trans* phosphoryliert wird (Abbildung 3C) [35, 36]. Phosphorylierungen der Tyrosinreste 492 und 493 im Aktivierungsloop der ZAP70-Kinasedomäne führen daraufhin zu einer Konformationsänderung, die eine Aktivierung der Kinase zur Folge hat [37]. Zusätzlich bewirken Phosphorylierungen der Tyrosinreste 315 und 319 im Übergang zwischen tSH2-Domäne und Kinasedomäne (Interdomäne B) wahrscheinlich die Aufhebung einer autoinhibitorischen Konformation [38, 39]. Darüber hinaus wurden SH2-Domänen-abhängige Bindungen von VAV1, LCK sowie Adapterproteinen der CRK (*CT10 regulator of kinase*)-Familie an pY315 bzw. pY319 nachgewiesen, die ebenfalls für die Aktivierung und Funktion der Kinase von Bedeutung sind [40-43].

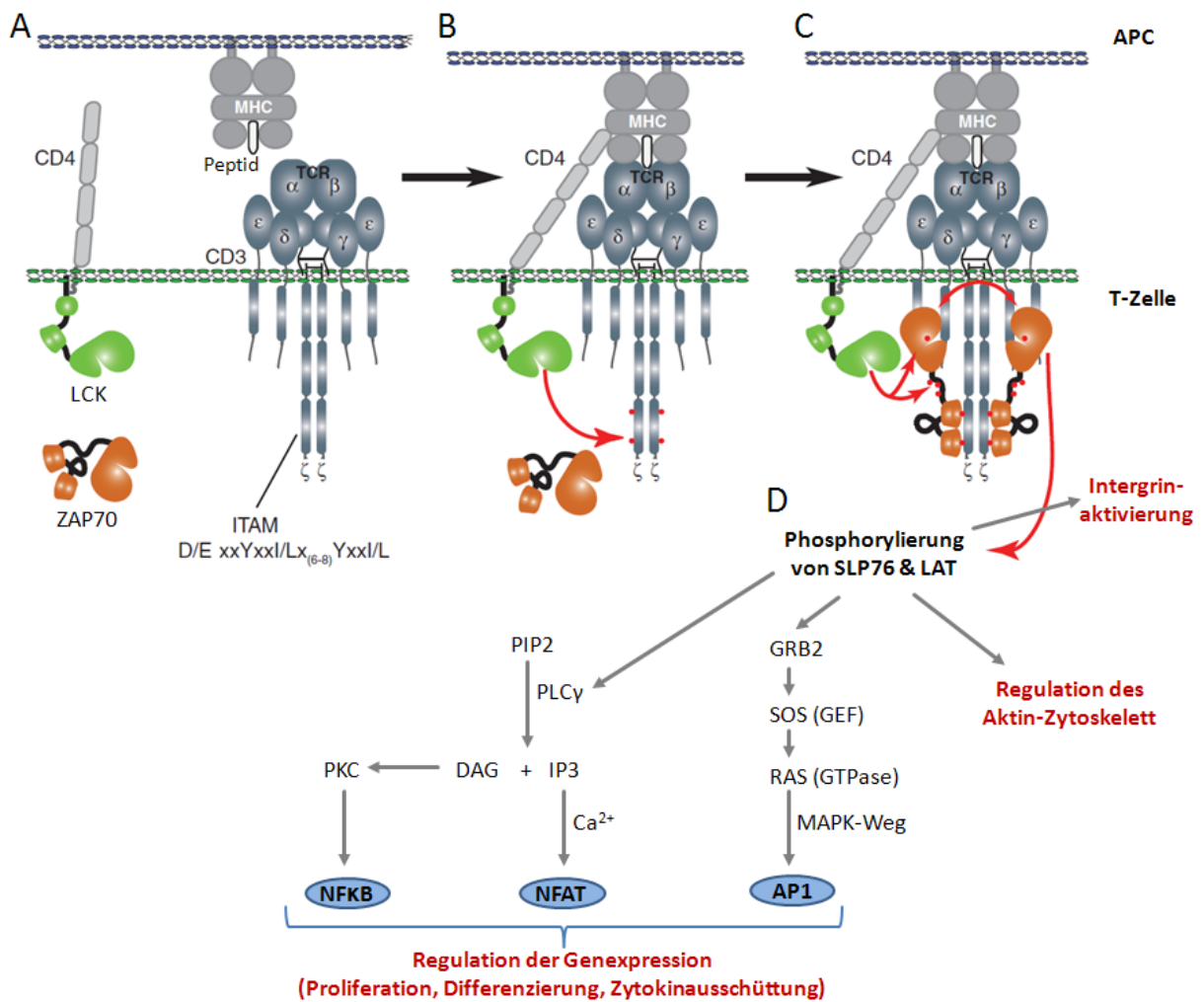


Abbildung 3: Aktivierung des TCRs und Signaltransduktion. (A,B) Die Erkennung des MHC-Peptid-Komplexes durch den TCR und CD4 führt zur Phosphorylierung (rote Pfeile/Punkte) der ITAM-Motive des ζζ-Homodimers durch die CD4-assoziierte Tyrosinkinase LCK. (C) Die Tyrosinkinase ZAP70 bindet daraufhin über ihre Tandem-SH2-Domäne an die doppelt phosphorylierten ITAM-Motive und wird durch LCK- und Autophosphorylierung aktiviert. ZAP70 phosphoryliert die Adapterproteine LAT und SLP76. (D) Daraufhin bildet sich ein Signalsosom bestehend aus LAT, SLP76, GRB2, GADS und PLCγ. Über unterschiedliche Signalwege werden daraufhin die Transkriptionsfaktoren NFκB, NFAT und AP1 aktiviert. Zudem kommt es über andere Signalwege zur Aktivierung von Integrinen sowie Änderungen im Aktin-Zytoskelett. Abbildung modifiziert ausgehend von [44].

Regulation der Genexpression

Die Aktivierung der Kinasedomäne von ZAP70 führt zur Phosphorylierung des Transmembran-Adapterproteins LAT (*linker for activation of T cells*) sowie des zytosolischen Adapterproteins SLP76 (*SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa*). Durch die Rekrutierung weiterer Adapterproteine assembliert sich daraufhin ein membranständiger Proteinkomplex, der über verschiedene Signalwege die Genexpression, Integrinaktivierung und Aktin-Polymerisation steuert (Abbildung 3D) [45-49].

Adapterproteine haben selbst keine enzymatische Aktivität, stattdessen fungieren sie als Gerüst für die räumlich und zeitlich gesteuerte Rekrutierung weiterer Faktoren [50, 51]. Hierzu verfügen sie meist über eine Reihe von modular aufgebauten Proteinbindungsdomänen sowie über zahlreiche

Erkennungsmotive. So binden SH2-Domänen beispielsweise an phosphorylierte Tyrosinreste [52], während SH3-Domänen prolinreiche Sequenzen erkennen [53]. PH (*pleckstrin homology*)-Domänen hingegen binden spezifisch an Phosphoinositide und begünstigen damit eine membranständige Lokalisation [54].

An phosphoryliertes LAT binden die Adapterproteine GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) und GADS (*grb2-related adaptor downstream of shc*) sowie die Phospholipase C gamma (PLC γ) jeweils über ihre SH2-Domäne [55-57], wobei GADS und PLC γ zudem über ihre SH3-Domänen an SLP76 binden [55, 58, 59]. PLC γ spaltet das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Diacylglycerol (DAG) und IP₃ (*inositol 1,4,5-trisphosphate*) (Abbildung 3D). Diacylglycerol aktiviert die Serin/Threonin-Kinase Proteinkinase C (PKC), wodurch ein Signalweg zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (*nuclear factor kappa B*) ausgelöst wird. IP₃ hingegen wirkt als *second messenger* und führt zur Ausschüttung von Calciumionen (Ca²⁺) aus dem endoplasmatischen Retikulum. Diese binden Calmodulin, woraufhin die Phosphatase Calcineurin aktiviert wird, die den Transkriptionsfaktor NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) durch Dephosphorylierung aktiviert. Das Adapterprotein GRB2 bindet den GTP-Austauschfaktor SOS (*son of sevenless*), wodurch die GTPase RAS (*rat sarcoma*) aktiviert wird. Dies führt über den MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-Signalweg zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP1 (*activator protein 1*). Transkriptionsfaktoren wie NF κ B, NFAT und AP1 ändern daraufhin das Expressionsprofil der T-Zelle und regulieren auf diese Weise Proliferation, Differenzierung und Zytokinausschüttung (z.B. Interleukin-2) [57].

Neben der Regulation der Genexpression führt die Stimulation des TCRs zur Integrinaktivierung sowie zu Änderungen im Aktin-Zytoskelett, die in den folgenden Abschnitten beschrieben werden.

1.1.6 Integrinaktivierung und Regulation des Aktin-Zytoskeletts

Die große Bedeutung der Integrinaktivierung für die Funktion des Immunsystems wird bei Erbkrankheiten wie LAD (*leukocyte adhesion deficiency*) deutlich, bei denen Mutationen in Genen der Komponenten der Integrinaktivierung oder in den Integrinen selbst zu einer starken Immundefizienz führen [60]. Integrine sind heterodimere Transmembranproteine aus einer α - und einer β -Untereinheit. Insgesamt sind 24 Integrine bekannt, die durch Kombination aus 18 α - und 8 β -Untereinheiten gebildet werden [61]. Das Integrin LFA-1 (α L β 2-Integrin) vermittelt die Adhäsion und Migration von T-Zellen und ist an der Extravasation sowie der Ausbildung der immunologischen Synapse beteiligt. Man unterscheidet drei Konformationen, welche sich in ihrer Affinität zu ICAM-1 unterscheiden: eine geknickte Konformation mit geringer Affinität sowie zwei gestreckte Konformationen mit mittlerer bzw. hoher Affinität (Abbildung 4) [62, 63]. Die Interaktion mit ICAM-1

wird über die α -Domäne der α -Untereinheit vermittelt, die ausschließlich in den gestreckten Konformationen exponiert wird [64].

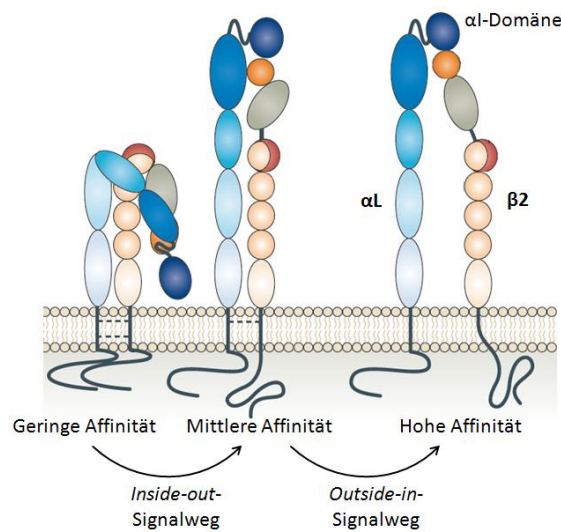


Abbildung 4: Die Konformationen des Integrins LFA-1. Das Integrin LFA-1 setzt sich aus einer α L- und einer β 2-Untereinheit zusammen. Man unterscheidet drei Konformationen anhand ihrer Bindungsaffinität zu ICAM-1. In der geschlossenen Konformation mit geknickten Kopfgruppen ist die Affinität gering. In der gestreckten Konformation mit aneinanderliegenden Untereinheiten liegt die Affinität im mittleren Bereich. In der gestreckten Konformation mit separierten Untereinheiten ist die Affinität am höchsten. Der Übergang zwischen den Konformationen wird durch den *inside-out*- sowie den *outside-in*-Signalweg beeinflusst. Abbildung modifiziert ausgehend von [65].

Aktivierung der Integrine (*inside-out*-Signalweg)

Die Aktivierung von LFA-1 nach Stimulation des T-Zell- oder Chemokinrezeptors erfolgt über den *inside-out*-Signalweg, bei dem Signalprozesse aus dem Zellinneren zu Konformationsänderungen von LFA-1 führen, wodurch eine Bindung an den Liganden ICAM-1 ermöglicht wird [65]. Die Signaltransduktion ist stark vereinfacht in Abbildung 5 dargestellt, wobei die Zusammensetzung der dargestellten Proteinkomplexe zeitlich und räumlich hochdynamisch ist. Im Vergleich zur Signaltransduktion über Chemokinrezeptoren, ist die TCR-vermittelte Signaltransduktion deutlich besser untersucht. Die hier dargestellte Stimulation des Chemokinrezeptors CXCR4 durch die Bindung seines Liganden SDF-1 (*stromal cell-derived factor 1* oder CXCL12) ist beispielsweise an der gerichteten Migration (Chemotaxis) von T-Zellen beteiligt [16, 66].

Ein entscheidender Faktor für die Aktivierung von LFA-1 ist die Rekrutierung und Aktivierung der kleinen GTPase RAP1 (*RAS proximity 1*) an der Plasmamembran (Abbildung 5). RAP1 gelangt nach Stimulation des T-Zell- oder Chemokinrezeptors über vesikuläre Transportprozesse an die Plasmamembran und wird durch die GTP-Austauschfaktoren C3G (*CRK SH3-binding guanine-nucleotide-releasing protein*) und CALDAG-GEF1 (*Ca²⁺ and DAG-regulated GEF1*) aktiviert [67-69]. Diese wiederum werden nach Rezeptorstimulation durch Aktivierung von Phospholipasen der Gruppe C (z.B. PLC γ) und der hierüber vermittelten Erzeugung von DAG und Ca²⁺ rekrutiert und

aktiviert (Abbildung 5) [70, 71]. RAP1 ist aufgrund einer irreversiblen Geranylgeranyl-Lipidmodifizierung an die Membran gebunden und kann so zwischen der Plasmamembran sowie endo- und exozytotischen Recycling-Vesikeln wechseln [72].

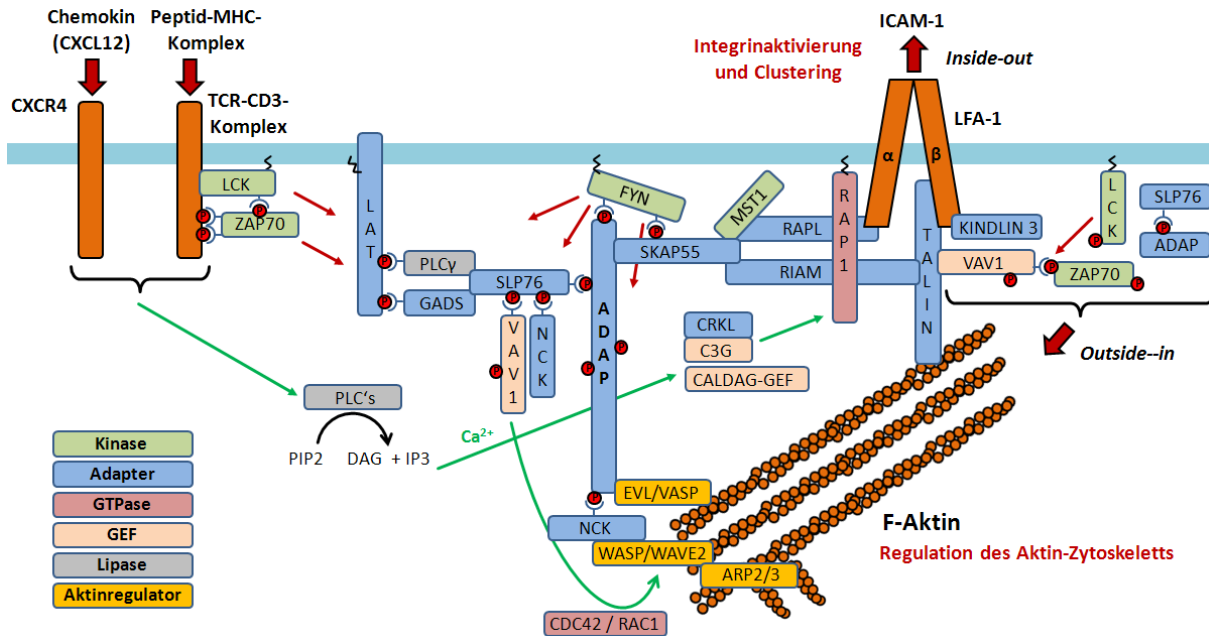


Abbildung 5: Schematische Darstellung des *inside-out/outside-in*-Signalweges in T-Zellen. Die Stimulation des TCRs (über einen Peptid-MHC-Komplex) oder des Chemokinrezeptors CXCR4 (über das Chemokin CXCL12) führt über den *inside-out*-Signalweg zur Aktivierung des Integrins LFA-1 und der Bindung an ICAM-1. Über den *outside-in*-Signalweg wird die Ligandenbindung durch Stabilisierung der hochaffinen Konformation von LFA-1 verstärkt. Die Signaltransduktion wird durch einen rezeptorproximalen, membranständigen Signalkomplex vermittelt, der sich aus Kinasen, Adapterproteinen, GTPasen, GTP-Austauschfaktoren (GEFs), Aktinregulatoren und Lipasen zusammensetzt. Der Signalweg ist durch die Aktivierung von Tyrosinkinasen und der Phosphorylierung von zahlreichen Substratproteinen gekennzeichnet (rote Pfeile/Phosphatgruppen). Die phosphorylierten Tyrosinreste vermitteln zahlreiche Interaktionen, indem sie die Bindung von Proteinen über ihre SH2-Domänen ermöglichen. Aktivierende Signale sind durch grüne Pfeile gekennzeichnet.

Die Rekrutierung von RAP1 ist darüber hinaus abhängig von einem membranständigen Signalkomplex, der sich vor allem aus zahlreichen Adapterproteinen assembliert (Abbildung 5). Nach Stimulation des TCRs (siehe Abschnitt 1.1.5) binden zunächst das Adapterprotein GADS und die Phospholipase PLC γ über ihre SH2-Domänen an phosphoryliertes LAT (Abbildung 5) [55-57]. Über ihre SH3-Domänen binden GADS und PLC γ zudem an prolinreiche Sequenzen im Adapterprotein SLP76, wobei die Interaktion zwischen GADS und SLP76 konstitutiv ist [55, 58, 59]. SLP76 bindet über eine SH2-Domäne an das Adapterprotein ADAP (*adhesion and degranulation promoting adaptor protein*), welches durch die Tyrosinkinase FYN phosphoryliert wird und zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen vermittelt (siehe Abschnitt 1.1.7). ADAP ist Teil eines Moduls, bestehend aus den Adapterproteinen ADAP, SKAP55 (*SRC kinase-associated phosphoprotein of 55 kDa*) und RIAM (*RAP1 GTP-interacting adaptor molecule*), das eine zentrale Rolle bei der Assemblierung des membranständigen *inside-out*-Signalkomplexes spielt [8, 73]. Die Rekrutierung und Aktivierung von

RAP1 wird über die direkte Interaktion zwischen SKAP55 und RIAM sowie zwischen RIAM und RAP1 begünstigt [74-76]. Eine membranständige Lokalisation des Komplexes wird vermutlich über die PH-Domäne von SKAP55 unterstützt [77]. SKAP55 wird zudem von dem Adapterprotein RAPL (*regulator of adhesion and cell polarization enriched in lymphoid tissues*) über dessen C-terminale *coiled-coil*-Domäne gebunden, die alternativ an die Serin/Threonin-Kinase MST1 (*mammalian STE20-like protein kinase 1*) bindet. RAPL bindet neben RIAM ebenfalls direkt an RAP1 sowie zusätzlich an die α -Untereinheit von LFA-1 und ist gemeinsam mit MST1 essentiell für die Rekrutierung und Aktivierung von LFA-1 [78]. Über RIAM wird zudem das zytosolische Protein TALIN an die Plasmamembran rekrutiert. TALIN bindet über seine FERM (*four-point-one ezrin radixin moesin*)-Subdomänen an die Plasmamembran (PIP2) sowie an hochkonservierte NPxY/F-Motive der β -Untereinheit von LFA-1 und ist so an dessen Aktivierung beteiligt [79-81]. Weiterhin verfügt TALIN über eine Aktin-bindende ROD-Domäne und stellt somit eine Verbindung zwischen LFA-1 und dem Aktin-Zytoskelett her. Die Bindung zwischen TALIN und LFA-1 und dessen Aktivierung wird zudem durch das Adapterprotein KINDLIN3 beeinflusst, welches über ein NPLF-Motiv ebenfalls an die β -Untereinheit von LFA-1 bindet [82]. Mutationen im Gen von KINDLIN3 führen zu einem Adhäsionsdefekt, der eine schwere Immundefizienz (LAD Typ 3) zur Folge hat [83, 84].

Regulation des Aktin-Zytoskeletts

Parallel zur Integrinaktivierung kommt es über den *inside-out*-Signalweg zu Veränderungen im Aktin-Zytoskelett, die eine Ausbildung der IS und die Ausbreitung der T-Zelle auf der Oberfläche der APC ermöglichen (siehe Abschnitt 1.1.4). Hierfür ist eine gerichtete Polymerisation von Aktin erforderlich, die unter anderem durch SLP76 über eine Rekrutierung von VAV1 vermittelt wird (Abbildung 5) [85-88]. VAV1 ist ein GTP-Austauschfaktor der Rho-GTPasen CDC42 und RAC1, die daraufhin WAVE2 und WASP aktivieren [21, 89-91]. Diese wiederum binden den ARP2/3 Komplex, der als Ausgangspunkt für die Ausbildung verzweigter Aktinfilamente (F-Aktin) dient [91]. Eine weitere Verbindung zum Aktin-Zytoskelett wird über das Adapterprotein NCK (*non-catalytic region of tyrosine kinase*) vermittelt, indem es über seine SH2-Domäne mit ADAP und SLP76 sowie über seine SH3-Domäne mit dem Aktin-Regulator WASP interagiert [92-95]. Zudem rekrutiert ADAP Proteine der ENA/VASP-Familie (EVL, VASP, Mena), die das Wachstum von Aktinfilamenten kontrollieren und vor allem in fokalen Adhäsionen, Zell-Zell-Kontakten und dynamischen Membranregionen wie Zellfortsätzen (Lamellipodien) lokalisiert sind [96, 97].

Aktivierung der Integrine (*outside-in*-Signalweg)

Die beschriebene Signaltransduktion des *inside-out*-Signalweges führt zum Übergang von LFA-1 in die gestreckte Konformation mit einer mittleren Affinität für ICAM-1. Der Übergang in die hochaffine

Konformation, die durch eine Separierung der α - und β -Untereinheit gekennzeichnet ist (siehe Abbildung 4), wird erst durch die Bindung an seinen Liganden ICAM-1 ausgelöst. Da das Signal von außen (über LFA-1) registriert wird, bezeichnet man die hierüber vermittelte Signaltransduktion als *outside-in*-Signalweg. Die Bindung von LFA-1 an ICAM-1 führt hierbei zunächst zu einer Aktivierung der Tyrosinkinasen LCK und ZAP70, die bereits im Komplex mit LFA-1 vorliegen (Abbildung 5) [98, 99]. Daraufhin bildet sich ein Signalkomplex, der die hochaffine Konformation von LFA-1 begünstigt. Die Komponenten dieses Komplexes sind nicht im Detail bekannt. Wichtige Funktionen spielen die Proteine TALIN, RAPL und KINDLIN3, die vermutlich teilweise noch durch den *inside-out*-Signalweg an LFA-1 gebunden sind [65, 82]. So konnte gezeigt werden, dass die Bindung von TALIN an ein zweites NPXY-Motiv in der β -Untereinheit von LFA-1 zum Übergang in die hochaffine Konformation führt. TALIN liegt teilweise im Komplex mit VAV1 vor, wodurch die vollständige Integrinaktivierung (gezeigt für $\alpha 4\beta 1$) zunächst gestört ist [100]. Erst die Phosphorylierung von VAV1 durch ZAP70 führt zur Dissoziation des Komplexes und der Integrinaktivierung durch TALIN. Durch eine über TALIN vermittelte Verankerung von LFA-1 mit dem Aktin-Zytoskelett ist LFA-1 nach Ligandenbindung zudem einer Zugkraft senkrecht zur Membran ausgesetzt, die zur Stabilisierung der hochaffinen Konformation beiträgt. Durch laterale Scherkräfte (z.B. im Blutstrom) kann die Separierung der Untereinheiten und somit die hochaffine Konformation von LFA-1 auch ohne Ligandenbindung erreicht werden [101, 102]. Der *outside-in*-Signalweg führt neben der Integrinaktivierung (Affinitätsregulation) zusätzlich zur aktinabhängigen Bildung von LFA-1-Mikroclustern (Aviditätsregulation), wodurch die Adhäsion der T-Zelle zusätzlich verstärkt wird [103]. Baker *et al.* konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die Integrinaktivierung (über ICAM-1 und Fibronectin) nach CXCR4-Stimulation zur Bildung von membranständigen SLP76-ADAP-Mikroclustern führt (Abbildung 5) [104]. Die Interaktion der beiden Adapterproteine ist hierbei für die Adhäsion essentiell. In den SLP76-Mikroclustern konnten außerdem phosphoryliertes LCK und ZAP70 nachgewiesen werden.

1.1.7 Das Adapterprotein ADAP in T-Zellen

Das Adapterprotein ADAP (*adhesion and degranulation promoting adapter protein*) wurde Ende der 90-er Jahre von den Gruppen um Koretzky und Rudd als erstes kloniert und charakterisiert [105, 106]. Dabei zeigte sich, dass ADAP in T-Zellen vor allem für die integrinabhängige Adhäsion sowie in Mastzellen zudem für die Ausschüttung (Degranulation) von inflammatorischen Mediatoren wichtig ist [107]. Zudem wurde ADAP als Interaktionspartner des Adapterproteins SLP76 sowie der Tyrosinkinase FYN beschrieben, wobei ADAP gleichzeitig Substrat von FYN ist [105, 106, 108-110]. ADAP wird daher alternativ als SLAP130 (*SLP-76-associated phosphoprotein of 130 kDa*) oder

FYB120/130 (*FYN binding protein*) bezeichnet. Die Interaktionen werden über phosphorylierte Tyrosinreste von ADAP vermittelt, die von den SH2-Domänen von FYN und SLP76 gebunden werden. ADAP wird vor allem in T-Zellen sowie anderen hämatopoetischen Zellen mit Ausnahme von B-Zellen und Erythrozyten exprimiert [76, 106]. Durch alternatives Splicing entstehen zwei Isoformen mit einer Länge von 783 (FYB-120, SLAP130, O15117) bzw. 829 Aminosäuren (FYB-130, O15117-2). Die längere Variante enthält einen Einschub von 46 Aminosäuren (nach Aminosäureposition 635, Abbildung 6) und wird vermehrt in reifen T-Zellen, die kürzere Isoform stärker in Thymozyten exprimiert [109]. ADAP liegt vor allem im Zytoplasma vor und zeigt nach Aktivierung des TCRs eine membranständige Lokalisation an der Kontaktstelle zwischen T-Zelle und anti-CD3-beschichteten *beads*, wobei eine Kolokalisation mit WASP, NCK und SLP76 nachgewiesen werden konnte [97]. Darüber hinaus verfügt ADAP über zwei putative Kernlokalisationssequenzen (NLS, *nuclear localization sequence*) im Bereich der Aminosäuren 467-505 sowie 674-700 (Abbildung 6) [105, 109]. Eine leichte Kernlokalisierung von ADAP konnte in COS-Zellen und murinen T-Zell-Hybridomzellen mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden [108, 111]. Eine mögliche Funktion von ADAP im Zellkern ist bisher nicht bekannt.

ADAP-Knockout

Untersuchungen an T-Zellen von ADAP-Knockout-Mäusen durch zwei unabhängige Gruppen zeigten übereinstimmende Defekte in der TCR-vermittelten Aktivierung von β 1- und β 2-Integrinen sowie der Clusterbildung von LFA-1, was sich vor allem auf die Fähigkeit zur zellulären Adhäsion sowie der Konjugatbildung auswirkte [8, 73]. Auch bei der chemokinvermittelten Aktivierung von LFA-1 (nach CCR7-Stimulation durch CCL21) wurden Defekte beobachtet, die sich vor allem in einer gestörten Adhäsion und Migration *in vitro* äußerten [112]. Zudem konnte *in vivo* eine gestörte Migration in die Lymphknoten (*homing*) nachgewiesen werden sowie eine verminderte Bewegungsgeschwindigkeit innerhalb der Lymphknoten. Die Gesamtzahl an T-Zellen in ADAP-Knockout-Mäusen ist zudem reduziert, was auf Defekte in der positiven und negativen Selektion während ihrer Reifung zurückzuführen ist [73, 113]. Neben Defekten bei der Integrinregulation führt der ADAP-KO zudem zu einer gestörten Proliferation sowie einer verminderten Produktion der Zytokine Interleukin-2 und Interferon- γ nach TCR-Stimulation. Zusätzlich wurde eine verminderte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 sowie von CD25 (α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors) beobachtet [8, 73]. Medeiros *et al.* konnten zeigen, dass ADAP die Genexpression über die MAP-Kinase JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und den Transkriptionsfaktor NF κ B reguliert (siehe unten) [114]. In Transplantationsmodellen zeigten ADAP-Knockout-Mäuse eine verminderte Abstoßungsreaktion von transplantiertem Fremdgewebe (Allograft), was auf eine gestörte Migration, Aktivierung und Proliferation der T-Zellen zurückgeführt werden kann [115, 116].

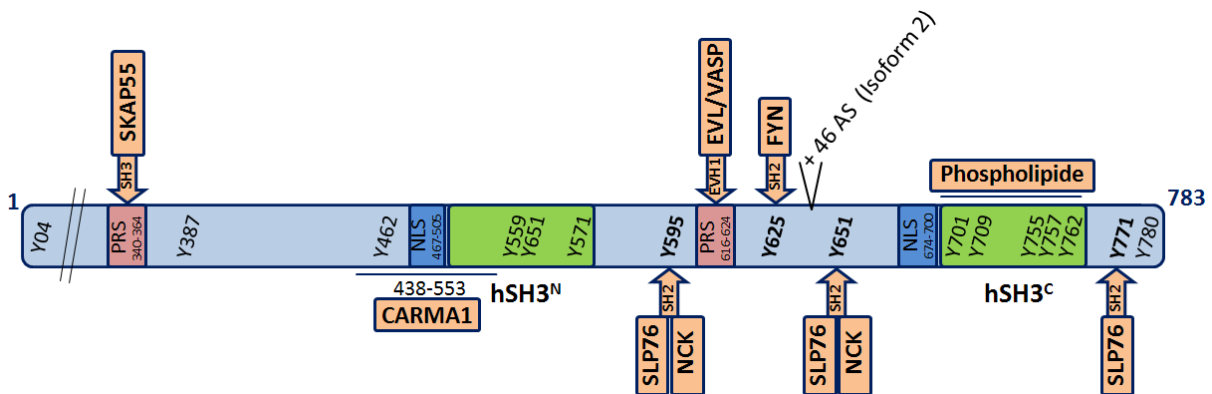


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Adapterproteins ADAP mit bekannten Bindungsmotiven. Das Adapterprotein ADAP (Isoform 1, O15117-1) ist überwiegend unstrukturiert (hellblau) mit Ausnahme von zwei strukturierten hSH3-Domänen (grün). Es verfügt über Kernlokalisationssequenzen (NLS; dunkelblau), prolinreiche Sequenzen (PRS; rot) und 16 Tyrosinreste. Bekannte Interaktionspartner und ihre Bindungsdomänen sind oberhalb und unterhalb von ADAP dargestellt.

hSH3-Domänen

ADAP besteht überwiegend aus intrinsisch unstrukturierten Regionen mit Ausnahme von zwei hSH3 (*helical extended SH3 domain*)-Domänen (Abbildung 6). Dabei handelt es sich um unkonventionelle SH3-Domänen, die neben der charakteristischen SH3-Struktur jeweils über eine amphipathische α -Helix an ihrem N-Terminus stabilisiert werden [117, 118]. Eine Entfernung dieser α -Helices führt zu Defekten in der stimulationsabhängigen Adhäsion und Migration von T-Zellen [119]. Aufgrund zahlreicher Interaktionen der α -Helix mit dem β -Faltblatt der SH3-Struktur sowie des Fehlens eines konservierten Tryptophanrestes zeigen die hSH3-Domänen keine für SH3-Domänen typische Bindung an prolinreiche Sequenzen (PRS) [53, 117]. Bei der C-terminalen hSH3-Domäne (hSH3^C) in ADAP werden an der Schnittstelle stattdessen basische Seitenketten exponiert, die eine Bindung an negativ geladene Kopfgruppen der Phospholipide PIP2 und PIP3 ermöglichen [119, 120]. Die Funktion der hSH3^C-Domäne könnte daher in der Lokalisation von ADAP an die Zellmembran bestehen. Die N-terminale hSH3-Domäne (hSH3^N) zeigt hingegen nur eine sehr schwache Lipidbindung [119]. Sie verfügt jedoch über zwei benachbarte und gut zugängliche Cysteinreste, die unter oxidierenden Bedingungen eine intramolekulare Disulfidbrücke ausbilden. Mit Hilfe von NMR-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Oxidation dieser Cysteinreste zu einer reversiblen Konformationsänderung führt [118]. Zudem konnte das Redoxpotential auf einen Wert von -201 mV (bei pH 7,0) bestimmt werden [121], so dass eine Funktion der hSH3^N-Domäne als redoxsensitiver Schalter denkbar ist. Das Redoxpotential in T-Zellen ändert sich nach Aktivierung des TCRs, indem verschiedene ROS (*reactive oxygen species*) wie beispielsweise Wasserstoffperoxid durch die Aktivierung einer NADPH-Oxidase erzeugt werden [122]. Die kontrollierte Produktion von ROS führt in T-Zellen beispielsweise zu einer oxidationsabhängigen Inaktivierung der Tyrosinphosphatase SHP-2

(*SH2 containing protein tyrosine phosphatase-2*) [123]. Da SHP-2 als negativer Regulator der Integrinaktivierung fungiert, indem sie die Phosphorylierung von ADAP und VAV1 reduziert, führt ihre reversible Inaktivierung zu einer Zunahme der zellulären Adhäsion.

Prolinreiche Sequenzen

Neben den beiden Strukturdomänen verfügt ADAP in den intrinsisch unstrukturierten Regionen über mehrere PRS. Eine PRS mit dem Sequenzmotif F⁶¹⁶PPPPDDDI befindet sich im unstrukturierten Bereich zwischen den beiden hSH3-Domänen und wird über die EVH1 (*Ena/VASP homology 1*)-Domänen von EVL und VASP gebunden (siehe Abschnitt 1.1.6) [96, 97, 124]. Eine weitere PRS zwischen den Aminosäuren 340-364 vermittelt die Interaktion mit der SH3-Domäne des Adapterproteins SKAP55 und dessen Homolog SKAP-HOM (Abbildung 6) [125, 126]. Die Bindung führt zur Stabilisierung von SKAP55, indem sie es vor dem proteolytischen Abbau durch das Proteasom schützt [127]. Untersuchungen zur Stöchiometrie und Struktur des ADAP-SKAP55-Komplexes mittels verschiedener Methoden deuten auf einen Komplex aus zwei ADAP- und zwei SKAP55-Molekülen hin, die eine ringförmige Struktur ausbilden [128]. Das ADAP-SKAP55-Modul ist wichtig für die Adhäsion und Konjugatbildung von T-Zellen, da es entscheidend an der Aktivierung der Integrine über den *inside-out*-Signalweg (siehe Abschnitt 1.1.6) beteiligt ist [74, 129]. Die PH-Domäne von SKAP55 bindet hierbei spezifisch an PIP3 und begünstigt somit vermutlich eine membranständige Lokalisation des ADAP-SKAP55-Moduls [77, 130, 131]. Kliche *et al.* konnten zeigen, dass zwei distinkte ADAP-SKAP55-Pools vorliegen, die gemeinsam die Affinität und Avidität von LFA-1 nach Stimulation des Chemokinrezeptors CCR7 regulieren [112, 132]. Ein Pool, bestehend aus ADAP-SKAP55-RAPL-MST1-RAP1, bindet dabei an die α -Untereinheit von LFA-1, während ein zweiter Pool, bestehend aus ADAP-SKAP55-RIAM-MST1-KINDLIN3-TALIN-RAP1, an die β -Untereinheit bindet.

Bindung an CARMA1 und TAK1

Während etwa 70 % der ADAP-Moleküle im Komplex mit SKAP55 vorliegen und für die Integrinaktivierung wichtig sind, existieren etwa 30 % der ADAP-Moleküle unabhängig von SKAP55 [77, 130]. Burbach *et al.* konnten zeigen, dass dieser ADAP-Pool an der Regulation des Transkriptionsfaktors NF κ B beteiligt ist [77]. Die Aktivierung von NF κ B nach T-Zellaktivierung wird über Interaktionen mit CARMA1 (*caspase recruitment domain membrane-associated guanylate kinase protein 1*) und der Serin/Threonin-Kinase TAK1 (*transforming growth factor- β -activated protein kinase*) vermittelt [114, 133]. Eine direkte Interaktion zwischen ADAP und CARMA1 mit rekombinanten murinen Proteinen konnte in *Pulldown*-Experimenten nachgewiesen werden, wobei die Bindungsstelle auf einen Bereich zwischen den Aminosäuren 426-541 (entspricht 438-553 in der humanen ADAP-Sequenz) eingegrenzt werden konnte (Abbildung 6) [114]. Im selben Bereich liegt

eine putative NLS sowie eine multimerbildende Sequenz (Aminosäuren 460-503), die zudem eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von Coiled-Coil-Strukturen aufweist [128]. Die Interaktion mit TAK1 war abhängig von den Aminosäuren 691-708 (entspricht 655-672 in humaner ADAP-Sequenz), wobei eine direkte ADAP-TAK1-Interaktion nicht nachgewiesen wurde [133].

Die Bindung von ADAP und CARMA1 ist wichtig für die Ausbildung des CBM-Komplexes bestehend aus CARMA1, BCL10 (*B-cell CLL-lymphoma 10*) und MALT1 (*mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1*), wobei CARMA1 und TAK1 durch PKC θ phosphoryliert werden [134-136]. Der CBM-Komplex aktiviert daraufhin den IKK (*inhibitor of kappa B kinase*)-Komplex über dessen Ubiquitinierung durch die E3-Ligase TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*). Zudem wird der IKK-Komplex über die Phosphorylierung durch TAK1 aktiviert. Der aktivierte IKK-Komplex phosphoryliert I κ B α (*inhibitor of kappa B α*), wodurch dieser ubiquitiniert und degradiert wird. Der freigesetzte Transkriptionsfaktor NF κ B transloziert daraufhin in den Zellkern, wo er die Transkription zahlreicher Zielgene initiiert.

Darüber hinaus konnte in naiven ADAP-defizienten murinen T-Zellen gezeigt werden, dass die Interaktionen mit CARMA1 und TAK1 den ubiquitinvermittelten Abbau von Cyclin E regulieren und so für den korrekten Ablauf des Zellzyklus von Bedeutung sind [137]. Die CARMA1-Bindungsstelle ist außerdem für die MAPK-abhängige Induktion von CDK2 (*cyclin-dependent kinase*) von Bedeutung. Cyclin E und CDK2 bilden einen Komplex, der den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus steuert.

Tyrosinphosphorylierungen

ADAP verfügt insgesamt über 16 Tyrosinreste. Die Phosphorylierung einiger Tyrosinreste nach TCR-Stimulation vermittelt Interaktionen mit den SH2-Domänen der Adapterproteine SLP76 und NCK (Y⁵⁹⁵DDV, Y⁶⁵¹DDV) sowie der Tyrosinkinase FYN (Y⁶²⁵DGI) (Abbildung 6) [93, 95, 105, 106, 108, 109, 138, 139]. NCK bindet zudem an SLP76 und ist über die Rekrutierung von WASP an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt [139, 140]. Die Interaktion von ADAP und SLP76 ist sowohl für die Entwicklung von T-Zellen als auch für die Aktivierung von peripheren T-Zellen (Interleukin-2 Produktion, Proliferation) von Bedeutung [105, 108, 109, 141, 142]. Zudem konnte ein Einfluss der ADAP-SLP76-Interaktion auf die Bildung von Mikroclustern nach Integrinaktivierung über den *outside-in* Signalweg festgestellt werden [104].

In *Pulldown*-Experimenten mit phosphorylierten ADAP-Peptiden (Y595, Y625, Y771) konnten die Interaktionen mit SLP76, FYN und NCK bestätigt werden [143]. Zudem wurden jeweils die Proteine SLP76, NCK, CRK, GADS, PIK3R1 und PLC γ 1 phosphorylierungsabhängig angereichert, während CRKL (Y625, Y771), FER/FYN (Y625) und RASA1 (Y595) nur von bestimmten ADAP-Peptiden angereichert wurden. In funktionellen Studien wurde zudem kürzlich gezeigt, dass drei SLP76-Bindungsstellen in

ADAP (Y595, Y651 und Y771) für die stimulationsabhängige Ausbildung von SLP76-Mikroclustern verantwortlich sind [144]. In biophysikalischen Untersuchungen wurden die Bindungsaffinitäten eines phosphorylierten ADAP-Konstruktes (570-690) mit isolierten SH2-Domänen von RASA1, SLP76 und FYN untersucht, wobei die Affinitäten im niedrigen mikromolaren Bereich lagen [145].

Zusätzlich zu den bereits charakterisierten Positionen konnten Phosphorylierungen der Tyrosinreste 559, 571, 755, 757 und 780 unter anderem nach *in vitro*-Phosphorylierung mit FYN-Kinase nachgewiesen werden [93, 138, 146]. Punktmutationen der Tyrosinreste 595/651, 755, 771 und 780 zu Phenylalanin und Überexpression dieser ADAP-Konstrukte in Jurkat T-Zellen führte zu Defekten in der Adhäsion sowie der chemokinvermittelten Migration.

Die Phosphorylierung an Y571 wurde zudem in zahlreichen phosphoproteomischen Studien nachgewiesen [124, 146-154]. Dabei konnte in der murinen Mastzelllinie MCP5 eine starke Zunahme der Y571-Phosphorylierung fünf Minuten nach Stimulation des Mastzellrezeptors (FcεRI) detektiert werden [148]. In Jurkat T-Zellen konnte ebenfalls eine deutliche Phosphorylierung von Y571 bestätigt werden, wobei die Stimulation des TCRs in unterschiedlichen Studien zu einem unwesentlichen [150] oder deutlichen Anstieg [147, 149, 151] der Y571-Phosphorylierung innerhalb von 3-10 Minuten führte. Eine Entfernung der Tyrosinkinase ZAP70 (Jurkat P116 Zelllinie) [150] oder des Adapterproteins SLP76 (Jurkat J14) [147] führte interessanterweise zu einer Erhöhung der Y571-Phosphorylierung, was für eine ZAP70- bzw. SLP76-unabhängige Phosphorylierung von Y571 spricht. Eine Kostimulation über den CD3- oder den CD28-Korezeptor hatte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Y571 [153]. Der Tyrosinrest Y571 ist am Rand der strukturierten hSH3^N-Domäne im Übergang zum unstrukturierten Bereich lokalisiert [118], wobei eine Funktion der hSH3^N-Domäne im Hinblick auf einen möglichen Interaktionspartner bisher nicht bekannt ist. Es ist daher denkbar, dass die stimulationsabhängige Phosphorylierung von Y571 die Bindungseigenschaften der hSH3^N-Domäne durch eine Konformationsänderung moduliert oder selbst die Bindung eines bisher nicht bekannten Proteins ermöglicht. Hierbei könnte die Nähe von Y571 zur dreidimensionalen Struktur einen Einfluss auf die Auswahl eines potentiellen Bindungspartners ausüben.

1.2 Proteomanalyse mittels Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) hat sich zu einer der wichtigsten Methoden zur Analyse von Proteinen entwickelt [155, 156]. Vor allem die Entwicklung der schonenden Ionisierungstechniken MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionization*) und ESI (*electrospray ionization*) [157, 158], die 2002 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurden, sowie die Fortschritte in der Genomanalytik, einschließlich der Entschlüsselung des Humangenoms, waren dafür erforderlich. Beim MALDI-Prozess erfolgt die Ionisation der Probenmoleküle aus einer festen Matrix mit Hilfe eines Laserimpulses. Beim ESI-Prozess hingegen werden die Probenmoleküle in einer Lösung versprüht und unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes desolvatisiert und ionisiert. Die Ionisierung mittels ESI ermöglicht eine direkte Kopplung an Flüssigchromatographie-Systeme (*liquid chromatography*, LC) zur Trennung komplexer Peptidgemische, wie sie aus der enzymatischen Spaltung komplexer Proteinproben hervorgehen. Die Trennung erfolgt anhand ihrer Hydrophobizität an sogenannten Umkehrphasen (*reversed phase LC*, RP-LC) mit Flussraten im Nanoliterbereich (nanoLC).

Nach der Ionisierung in der Ionenquelle gelangen die Peptidionen in die Analysatoreinheit des Massenspektrometers, in der sie anhand ihres Masse/Ladungs-Verhältnisses (m/z) getrennt werden. Als Analysatoren werden vor allem Quadrupole, Flugzeitanalysatoren (*time of flight*, TOF), Ionenfallen und Orbitalfallen (Orbitrap) eingesetzt [155]. Die Detektion erfolgt in der Regel über eine separate Detektoreinheit (z.B. durch Sekundärelektronenvervielfacher) oder bei der Orbitrap über das mathematische Verfahren der Fourier-Transformation [159].

Die Kombination von zwei Massenanalysatoren wird als Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) bezeichnet und ermöglicht es, Informationen über die Primärstruktur von Peptiden zu erhalten. Der typische massenspektrometrische Messablauf zur Analyse komplexer Peptidgemische gliedert sich in mehrere Teile: Zunächst werden die m/z -Verhältnisse aller Peptidionen bestimmt (MS-Spektrum oder *survey scan*). Daraufhin erfolgt die separate Isolierung einzelner (meist der intensivsten) Peptidionen und deren Fragmentierung über kollisionsinduzierte Dissoziation (*collision induced dissociation*, CID). Anschließend werden die Fragmentionen detektiert (MS/MS-Spektrum). Dieser Zyklus wiederholt sich während der gesamten Messung, bis der LC-Gradient beendet ist. Moderne Massenspektrometer sind in der Lage bis zu 20 MS/MS-Spektren pro Sekunde aufzuzeichnen, so dass je nach Komplexität der Probe mehrere Tausend Spektren generiert werden können. Für die Identifizierung der Peptide werden zunächst Peaklisten erstellt, die alle detektierten Peptidmassen (MS) mit ihren jeweiligen Fragmentmassen (MS/MS) enthalten. Die Identifizierung erfolgt anschließend durch einen computergestützten Abgleich der experimentell bestimmten Massen mit den Massen, die über eine theoretische Spaltung (*in silico*) aller Proteine aus einer Proteinsequenzdatenbank erzeugt wurden. Als Ergebnis der Datenbanksuche erhält man eine

Auflistung aller identifizierten Peptidsequenzen, wobei eine Zuordnung der Peptide zu passenden Proteinsequenzen erfolgt.

Die Messung komplexer Peptidgemische nach enzymatischer Spaltung von Proteinen wird auch als *shotgun proteomics* oder *bottom-up*-Verfahren bezeichnet. Demgegenüber wird die Analyse intakter Proteine oder ganzer Proteinkomplexe mittels MS als *top-down*-Verfahren bezeichnet [160].

1.2.1 Affinitäts-Massenspektrometrie (AP-MS)

Eine Vielzahl von zellulären Prozessen wird über Protein-Protein-Interaktionen vermittelt. Um die Funktion eines Proteins aufzuklären ist es daher unverzichtbar, seine Interaktionspartner zu ermitteln. Als eine Methode der Wahl hat sich die Affinitäts-Massenspektrometrie (*affinity-purification followed by mass spectrometry*, AP-MS) durchgesetzt [161]. Hierbei werden potentielle Interaktionspartner zunächst über spezifische Wechselwirkungen angereichert und anschließend mittels Massenspektrometrie identifiziert.

Eine häufige Methode zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels AP-MS stellt die Immunopräzipitation (IP) dar. Dabei wird ein Antikörper eingesetzt, der spezifisch an das endogene Köderprotein bindet, so dass eine Isolierung des Köderproteins (IP) und seiner Interaktionspartner (Co-IP) unter nahezu nativen Bedingungen möglich ist. Die Immobilisierung des Antikörpers erfolgt meist über nicht-kovalente Interaktionen mit einer speziellen Agarosematrix (Protein A/G-Agarose) oder kovalent durch eine chemische Vernetzung an die Trägermatrix. Sofern kein spezifischer Antikörper für das Köderprotein vorliegt oder die Antikörperbindung die gewünschte Interaktion stört, können alternativ Antikörper gegen verschiedene Epitop-*tags* (z.B. *Flag-tag*, *HA-tag*) eingesetzt werden. Das Köderprotein (mit *tag*) wird in diesem Fall meist über eine Transfektion in den Zellen überexprimiert, so dass es in großen Mengen im Vergleich zur endogenen Proteinvariante vorliegt. Die unphysiologisch hohen Mengen des Köderproteins können hierbei jedoch leicht zu falsch-positiven Interaktionen führen.

Neben der Antikörper-basierten Affinitätschromatographie können Köderproteine auch direkt über einen *tag* immobilisiert werden. Bei diesem als *Pulldown* bezeichneten Verfahren werden exogene Köderproteine an einer entsprechenden Trägermatrix immobilisiert, bevor die Inkubation mit einer flüssigen Phase (z.B. Zelllysat oder Gewebehomogenisat) erfolgt. Die Anreicherung der Interaktionspartner erfolgt in mehreren Waschrufen, indem ein Großteil der unspezifischen Proteine entfernt wird. Zur Identifizierung der gebundenen Proteine mittels MS werden diese zunächst von der Trägerphase eluiert. Häufig verwendet man hierfür SDS-Probenpuffer, um das Proteingemisch anschließend mittels SDS-PAGE zu fraktionieren. Daraufhin wird die gesamte Gelspur in einzelne Banden geschnitten und mit Hilfe der Protease Trypsin in Peptide gespalten. Die Analyse

der Peptide erfolgt mittels nanoLC-MS/MS. Alternativ können die Proteine auch direkt am Trägermaterial durch Zugabe von Trypsin in Peptide gespalten werden. Aufgrund der höheren Komplexität des Peptidgemisches erfolgt hierbei in der Regel ein zusätzlicher Fraktionierungsschritt auf Peptidebene [162], bevor eine Analyse mittels nanoLC-MS/MS erfolgt. Das *Pulldown*-Verfahren ermöglicht eine hohe Flexibilität, da auf diese Weise verschiedene rekombinant hergestellte Proteinkonstrukte oder auch synthetisch hergestellte Peptide als Köder eingesetzt werden können. Zur Immobilisierung von Proteinen eignet sich vor allem der Glutathion-S-Transferase-*tag* (*GST-tag*). Hierbei handelt es sich um ein Enzym mit einer hohen Affinität für Glutathion, so dass eine Immobilisierung an kommerziell erhältliche Glutathion-haltige Trägermaterialien möglich ist. Der *GST-tag* wirkt sich zudem meist positiv auf die Löslichkeit der Fusionsproteine aus.

Ein Nachteil aller nicht-kovalenten Immobilisierungstechniken ist die Verunreinigung der Probe mit dem eingesetzten Köderprotein (z.B. GST-Fusionsprotein oder Antikörper), da dieses bei der Elution ebenfalls von der Trägermatrix abgelöst wird. Da das Köderprotein in sehr hohem Überschuss eingesetzt wird, kann dies die Identifizierung vor allem niedrig abundanter Bindungspartner mittels MS erschweren. Dies liegt an dem begrenzten Dynamikbereich der Detektionsmethode, wobei die Peptidsignale von niedrigabundanten Interaktionspartnern von den hochabundanten Signalen des Köderproteins maskiert werden. So ist bei gelbasierten Trennverfahren eine Identifizierung von potentiellen Interaktionspartnern im Molekulargewichtsbereich des Köderproteins meist nicht möglich. Bei der tryptischen Spaltung direkt auf der Trägermatrix hingegen verteilen sich die abundanten Peptide des Köderproteins über verschiedene Fraktionen, so dass ein Diskriminierungseffekt in der nachfolgenden LC-MS/MS nicht ausgeschlossen werden kann.

Eine Entfernung der Köderproteine aus der Probe kann durch kovalente Immobilisierungstechniken verwirklicht werden. Hierbei werden chemisch aktivierte Trägermaterialien eingesetzt, die eine kovalente Quervernetzung verschiedener Köderstrukturen an den Träger ermöglichen [163]. Eine effiziente Vernetzung von Proteinen erfolgt in der Regel über primäre Amine (Lysinreste und Protein-N-Terminus) oder Thiolgruppen (Cysteinreste). Für die Amin-Kopplung werden häufig N-Hydroxysuccinimid (NHS)-aktivierte Trägermatrices eingesetzt, wobei der aktivierte NHS-Ester mit den primären Aminen unter Ausbildung einer stabilen Amidbindung reagiert [164]. Alternativ kann eine Glutathion-haltige Trägermatrix in Kombination mit dem bifunktionalen Quervernetzer Dimethylpimelimidat (DMP) eingesetzt werden [165]. Eine Vernetzung von Proteinen über die Thiolgruppen ihrer Cysteine kann beispielsweise über Maleimid- oder Iodoacetyl-funktionalisierte Trägermaterialien erreicht werden, wobei die Immobilisierung hier durch Ausbildung einer stabilen Thioetherbindung erfolgt [165].

Ein Nachteil der beschriebenen kovalenten Immobilisierungstechniken liegt in der zufälligen bzw. ungerichteten Vernetzung des Köderproteins an die Trägermatrix, wodurch die Zugänglichkeit des

Bindungsepitops eingeschränkt werden kann. Darüber hinaus kann die Vernetzung zu einer Konformationsänderung oder Entfaltung der Köderproteins führen, wodurch seine Funktion verloren gehen kann.

1.2.2 Quantitative Massenspektrometrie

Eine der größten Herausforderungen bei der Identifizierung neuer Interaktionspartner mittels AP-MS ist die Unterscheidung der tatsächlichen Interaktionspartner von Hintergrundproteinen. Hierbei kann es sich um unspezifisch bindende Proteine handeln, die durch Waschschriffe nicht vollständig entfernt wurden, oder um Proteine, die spezifisch an das Trägermaterial oder den verwendeten *tag* binden. Aufgrund der hohen Sensitivität moderner Massenanalysatoren sowie dem außerordentlich großen dynamischen Bereich der Proteinkonzentrationen in der Zelle (über etwa sieben Größenordnungen, [166]), ist eine vollständige Entfernung der Hintergrundproteine (bzw. eine Reduzierung ihrer Konzentration unterhalb des Detektionslimits) kaum erreichbar. Eine Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen spezifischen Interaktionspartnern und dem Proteinhintergrund stellt die quantitative Massenspektrometrie dar. Sie ermöglicht es, die Proteinmengen zwischen dem eigentlichen AP-MS-Experiment und einem geeigneten Kontrollexperiment zu vergleichen. Das Kontrollexperiment sollte hierbei so nah wie möglich dem eigentlichen Experiment gleichen. Geeignete Kontrollen sind daher beispielsweise die Verwendung einer zur Bindung unfähigen Punktmutante oder die Verwendung eines spezifischen Inhibitors der Bindungstasche.

Als Methode der Wahl (für Experimente mit Zellkulturen) hat sich das SILAC (*stable isotope labeling with/by amino acids in cell culture*)-Verfahren bewährt, das auf einer metabolischen Isotopenmarkierung von Proteinen bei der Kultivierung der Zellen beruht [167, 168]. Der Einbau der mit schweren Isotopen ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) markierten Aminosäuren Lysin und Arginin ermöglicht hierbei die Separierung der tryptischen Peptidsignale anhand ihrer Masse, ohne dass sich ihre physikochemischen Eigenschaften wesentlich ändern. Verwendet man nun für das eigentliche AP-MS-Experiment beispielsweise markiertes- und für das Kontrollexperiment unmarkiertes Zelllysate, können die Proben vor der MS-Analyse vereinigt werden. Die relative Quantifizierung der Proteine mit Hilfe der Massenspektrometrie erfolgt hierbei anhand des Isotopenverhältnisses (leicht/schwer) ihrer Peptidsignale mit Hilfe eines entsprechenden Algorithmus [169, 170]. Hintergrundproteine, welche unabhängig vom Köderprotein angereichert wurden, liegen in beiden Experimenten in gleicher Menge vor und weisen daher ein 1:1-Verhältnis auf. Spezifische Interaktionspartner hingegen sind im eigentlichen Experiment stärker angereichert und weisen daher Verhältnisse auf, die deutlich von 1 abweichen. Das SILAC-Verfahren wurde in den letzten Jahren in zahlreichen AP-MS-Experimenten angewendet. Eine interessante Anwendungsmöglichkeit ist die Analyse von

PTM-abhängigen Protein-Protein-Interaktionen, indem kurze synthetische Peptidsequenzen in ihrer modifizierten sowie unmodifizierten Form als Köder eingesetzt werden [171]. Auf diese Weise konnten beispielsweise phosphorylierungsabhängige Interaktionspartner des Adapterproteins ADAP sowie acetylierungsabhängige Interaktionspartner des N-terminalen Teils von Histon H4 ermittelt werden [143, 172]. Da das SILAC-Verfahren auf der metabolischen Markierung von Zellen beruht, kann es bei der Verwendung von primären Zellen oder Gewebe in der Regel nicht eingesetzt werden. Eine Ausnahme stellt die Verwendung von SILAC-markierten Organismen (z.B. Maus und Fliege) dar [173, 174], die jedoch aufgrund des hohen Preises meist nicht praktikabel ist.

Eine alternative Methode beruht auf der enzymatischen Isotopenmarkierung, bei der die tryptische Spaltung der Proteine in Anwesenheit von H_2^{16}O bzw. H_2^{18}O durchgeführt wird [175]. Die Hydrolyse in Gegenwart von H_2^{18}O führt hierbei zu einer Markierung der Peptid-Carboxylgruppe mit einem oder zwei ^{18}O -Isotopen, so dass ein charakteristischer Massenunterschied von +2 Da bzw. +4 Da erreicht wird. Eine relative Quantifizierung zwischen den unmarkierten Signalen sowie den beiden markierten Signalen erfolgt über einen speziellen Algorithmus der Firma Matrix Science (siehe Abschnitt 2.8.4), wobei die Signalintensitäten der beiden "schweren" Signale zusammengefasst werden. Der Vorteil der Quantifizierung mittels ^{18}O -Markierung liegt in ihrer einfachen Durchführung sowie den geringen Kosten. Ein Nachteil der Methode im Vergleich zur SILAC-Markierung liegt darin, dass eine Vereinigung der Proben erst nach der tryptischen Spaltung erfolgt, so dass die Quantifizierung durch äußere Einflüsse während der Präparation stärker verfälscht werden kann. Ein Vergleich der beiden Methoden zeigt eine etwas höhere Ungenauigkeit der ^{18}O -Quantifizierung, die sich auch in einer geringfügig stärkeren Streuung der Proteinverhältnisse äußert [143].

Weitere Möglichkeiten zur Isotopenmarkierung auf Peptidebene können über eine chemische Derivatisierung erfolgen. So werden beispielsweise bei der ITRAQ (*isobaric tags for relative and absolute quantitation*)-Methode die primären Amine mit unterschiedlichen isobaren Markerverbindungen (*tags*) derivatisiert, die nach Fragmentierung im MS/MS-Spektrum charakteristische Signale (Reporter-Ionen) erzeugen und so eine relative Quantifizierung ermöglichen [176]. Ein Vorteil der Methode ist die parallele Markierung von bis zu acht (8-plex) unterschiedlichen Proben. Zudem wird die Komplexität der MS-Spektren aufgrund der isobaren Markerverbindungen nicht erhöht. Bei der ICAT (*isotope-coded affinity tag*)-Methode hingegen werden die Thiolgruppen der Peptide mit isotopenmarkierten Affinitäts-*tags* derivatisiert, die eine Anreicherung sowie relative Quantifizierung der Peptidsignale im MS-Spektrum ermöglichen [177]. Da nicht alle Peptide bzw. Proteine über Cysteinreste verfügen, ist eine globale Quantifizierung mittels ICAT nicht möglich.

Darüber hinaus gibt es zahlreiche Verfahren zur markierungsfreien (*label-free*) Quantifizierung [178]. Generell sind markierungsfreie Verfahren deutlich ungenauer im Vergleich zu isotopenmarkierten Verfahren, da neben der Probenvorbereitung auch die MS-Messungen getrennt durchgeführt

werden müssen. Vor allem die mangelnde Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten während der Chromatographie sowie der Ionisierung führen hierbei zu zusätzlichen Unsicherheiten bei der Quantifizierung. Markierungsfreie Verfahren sind daher weniger geeignet, um kleinere Veränderungen der Proteinmenge zu detektieren. Zudem sind meist deutlich mehr Replikate nötig, um statistisch signifikante Veränderungen zu ermitteln. Vorteile der markierungsfreien Quantifizierung sind die einfache Durchführung sowie die theoretisch unbegrenzte Anzahl an Proben, die miteinander verglichen werden können. Ein einfaches Verfahren zur markierungsfreien Quantifizierung basiert darauf, die Anzahl der detektierten MS/MS-Spektren für jedes Protein zwischen verschiedenen Proben zu bestimmen (*spectral count*), da diese grob mit der Proteinmenge korreliert [179]. Neuere Verfahren basieren meist auf dem computergestützten Vergleich der Peptid-Intensitäten über die extrahierten Ionenchromatogramme (*extracted ion chromatogram*, XIC), wobei verschiedene Algorithmen zur Normalisierung von Signalintensitäten und Retentionszeiten verwendet werden [180].

Neben den beschriebenen Methoden zur relativen Quantifizierung kann mittels MS ebenfalls eine absolute Quantifizierung (AQUA, *absolute quantification*) durchgeführt werden, indem der Probe vor der Messung synthetische, isotoopenmarkierte Referenzpeptide zugesetzt werden [181]. Das isotoopenmarkierte Referenzpeptid muss hierbei in seiner Sequenz dem unmarkierten Peptid entsprechen, welches quantifiziert werden soll. Da die Konzentration des Referenzpeptids bekannt ist, kann die Konzentration des Peptids in der Probe durch einen Intensitätsvergleich in Kombination mit einer vorher bestimmten Kalibriergerade ermittelt werden. Da jedoch für jedes Peptid ein eigenes Referenzpeptid benötigt wird, eignet sich die Methode nicht zur Quantifizierung komplexer Peptidgemische.

1.3 Zielsetzung

Die Funktion von T-Zellen bei der Auslösung einer adaptiven Immunantwort hängt entscheidend von ihrer Fähigkeit zur Adhäsion und Migration ab. Beide Prozesse werden über Integrine vermittelt. Die stimulationsabhängige Aktivierung der Integrine wird über einen Proteinkomplex reguliert, dessen zentraler Bestandteil das Adapterprotein ADAP ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Funktion der strukturierten hSH3^N-Domäne von ADAP im Hinblick auf bisher unbekannte Interaktionspartner aufzuklären. Da ADAP nach Aktivierung des T-Zellrezeptors an zahlreichen Tyrosinresten phosphoryliert wird, sollten die Tyrosin-Phosphorylierungsstellen, insbesondere innerhalb der strukturierten hSH3^N-Domäne, zunächst massenspektrometrisch charakterisiert werden. Im nächsten Schritt sollten differentielle, SILAC-basierte *Pulldown*-Experimente durchgeführt werden. Dabei sollten sowohl synthetische

Peptide als auch rekombinante Proteindomänen von ADAP als Köder eingesetzt werden. Potentielle Interaktionspartner sollten daraufhin mittels biochemischer und biophysikalischer Methoden qualitativ und quantitativ validiert werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer verbesserten Methode für AP-MS-Experimente, mit der eine kovalente und gerichtete Immobilisierung von Köderproteinen an eine Trägermatrix erreicht werden kann. Hierdurch soll die Entfernung der Köderproteine aus der Präparation erreicht werden, um so die Identifizierung insbesondere von niedrigabundanten Interaktionspartnern zu erleichtern.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Pufferlösungen und Medien

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden in analysenreiner Qualität von den Firmen Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Schnellendorf), Merck KGaA (Darmstadt), VWR International GmbH (Darmstadt) oder AppliChem GmbH (Darmstadt) bezogen. Die Herstellung der Pufferlösungen erfolgte mit sterilem Wasser. Anschließend wurden diese autoklaviert (15 min bei 2-bar und 120°C) oder über einen Filter mit 0,2 µm Porengröße filtriert.

2.2 Peptide und Expressionskonstrukte

Alle verwendeten Peptide wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Michael Beyermann (FMP, Berlin) mit Hilfe der Standardfestphasenpeptidsynthese unter Verwendung der Fmoc-Schutzgruppe synthetisiert oder von der Firma Biosyntan (Berlin) bezogen. Die HPLC-Reinheit aller synthetischen Peptide betrug mindestens 90 %. Zusätzlich erfolgte eine Kontrolle der Peptidmassen mittels MALDI-MS (siehe Abschnitt 2.10.4).

Tabelle 1: Verwendete Peptidsequenzen. Sequenzen aus dem Adapterprotein ADAP sind unterstrichen.

Bezeichnung	Protein Start-Ende	Sequenz
ADAP-Y571	ADAP 566-579	<u>CAVEIDYDSLKLLK</u> ND-NH ₂
ADAP-pY571	ADAP 566-579	CAVEIDpYDSLKLLKND-NH ₂
ADAP-Y462-LPVTG	ADAP 459-469	Ac- <u>GETYEDIEASKGSLGSSGALP</u> VTGG
ADAP-pY462-LPVTG	ADAP 459-469	Ac- <u>GETpYEDIEASKGSLGSSGALP</u> VTGG
ADAP-Y571-LPVTG	ADAP 567-577	Ac- <u>VEIDYDSLKLLK</u> GSLGSSGALPVTGG
ADAP-pY571-LPVTG	ADAP 567-577	Ac- <u>VEIDpYDSLKLLK</u> GSLGSSGALPVTGG
Dansyl-LPKTG		Dns-LPKTGGKRR-NH ₂
Nukleophil-Peptid		GGGRGGVEGGC-NH ₂
Nukleophil-Peptid (PEG2)		GGGRG-PEG2-GVEGGC-NH ₂
Nukleophil-Peptid (2xPEG2)		GGGRG-(PEG2) ₂ -GVEGGC-NH ₂
Referenzpeptid		GSLGSSGALPV* <u>TGGGR</u>

(PEG = Polyethylenglykol, Dns = 5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonyl, V* = ¹³C₅¹⁵N₁-Valin)

Die pFastBac-Vektoren für die Expression in Insektenzellen sowie der Ausgangsvektor mit der cDNA-Sequenz von ADAP lagen in der AG Freund vor. Der Ausgangsvektor mit der Sequenz von ZAP70 wurde von Dr. Arthur Weiss (University of California, San Francisco) zur Verfügung gestellt. Das fluoreszenzmarkierte SNAP-hSH3^N-His-Konstrukt wurde von Dr. Paul Majkut (FMP, Berlin) hergestellt. Das Konstrukt zur Überexpression von Sortase A aus *S. aureus* stammt von Dr. Kirill Piotukh (FMP, Berlin).

Alle *Escherichia coli* Expressionskonstrukte wurden durch PCR-basierte Klonierung erstellt [128]. Hierbei wurde zunächst mit Hilfe geeigneter Primersequenzen der gewünschte Sequenzabschnitt der cDNA-Matrize mittels PCR amplifiziert und durch Agarose-Gelelektrophorese isoliert. Das erhaltene Insert sowie der Zielvektor wurden anschließend mit denselben Restriktionsendonukleasen behandelt, um kompatible Enden zu erhalten. Der geschnittene Zielvektor wurde zusätzlich dephosphoryliert, um eine Re-Ligation zu verhindern. Nach Isolierung mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden Insert und Zielvektor enzymatisch ligiert und anschließend über Elektroporation in elektrokompente *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert. Anschließend wurden Zellklone, die durch eine erfolgreiche Transformation eine Antibiotika-Resistenz erworben hatten, über antibiotikahaltige Agarplatten selektiert und in größerem Maßstab kultiviert. Nach Isolierung der DNA wurde diese bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg) sequenziert und bei korrekter Sequenz in sterilem Wasser bei -20°C gelagert.

Tabelle 2: Verwendete Expressionskonstrukte.

Bezeichnung	Protein Start-Ende	Vektor	MW [kDa]
His-ADAP	ADAP 1-783	pFastBac	85,4
His-FYN	ADAP 1-537	pFastBac	60,8
GST-hSH3 ^N	ADAP 486-579	pGEX-4T1	37,1
GST-ADAP-600	ADAP 486-600	pGEX-4T1	39,4
GST-ADAP-dbl	ADAP 486-783	pGEX-4T1	59,9
GST-ZAP70-tSH2	ZAP70 1-256	pGEX-4T1	55,1
GST- GYF-WT-LPVTG	CD2BP2 280-341	pGEX-4T1	33,6
GST- GYF-MUT-LPVTG	CD2BP2 280-341 (W287R/Y312A)	pGEX-4T1	33,5
His-hSH3 ^N	ADAP 486-579	pET-28a	12,4
His-ADAP-600	ADAP 486-600	pET-28a	14,7
His-hSH3 ^N -LPVTG	ADAP 486-579	pET-28a	14,8
His-ZAP70-tSH2	ZAP70 1-256	pET-28a	30,5
His-GYF-WT-LPVTG	CD2BP2 280-341	pET-28a	10,5
His-GYF-MUT-LPVTG	CD2BP2 280-341 (W287R/Y312A)	pET-28a	10,1
SNAP-hSH3 ^N -His	ADAP 486-579	pSET7-26b	32,7
SortaseA-His	Sortase A 60-206	pET-23a	17,8

2.3 Zellkultur und Expression rekombinanter Proteine

2.3.1 Kultivierung von Insektenzellen

Die rekombinante Expression der Proteine His-ADAP und His-FYN erfolgte mit Hilfe eines Baculovirus-Expressionssystems in *SF21*-Insektenzellen. Es handelt sich hierbei um eine Ovarienzelllinie, die aus der Puppe des Nachtfalters *Spodoptera frugiperda* isoliert wurde [182]. Die Zelllinie wurde von Invitrogen (Carlsbad) bezogen und nach Herstellerangaben in Spinnerflaschen bei 60-75 rpm in Suspensionskultur gehalten (Bac-to-Bac-Baculovirus-Expressionssystem, Handbuch Version D6). Die Kultivierung erfolgte bei 28°C in 40-100 mL serumfreiem SF900II-Medium (Invitrogen, Carlsbad) mit Antibiotika und Antimykotika (Invitrogen, Carlsbad) bei einer Zelldichte von 0,5-3 x 10⁶ Zellen/mL.

2.3.2 Kultivierung von Jurkat T-Zellen und SILAC-Markierung

Zur Untersuchung von Interaktionspartnern in *Pulldown*-Experimenten wurden Zelllysate aus Jurkat T-Zellen (Subklon E6.1) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine immortalisierte T-Zelllinie, die 1977 aus dem Blut eines an Leukämie erkrankten Jungen isoliert wurde [183]. Seither wurden zahlreiche Abkömmlinge dieser Zelllinie erzeugt, bei denen durch Mutation unterschiedliche Proteine des T-Zell-Signalweges zu Untersuchungszwecken entfernt wurden [184].

Die Kultivierung erfolgte in RPMI1640-Fertigmedium mit 2 g/L NaHCO₃, 2 mM ac-Ala-Gln (Biochrom, Berlin) und 10 % fötalem Kälberserum bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre. Die Zelldichte betrug hierbei 0,05-0,6 x 10⁶ Zellen/mL.

Die Markierung der Zellen über das SILAC-Verfahren [167] erfolgte über das *Pierce SILAC Protein Quantitation Kit* nach Herstellerangaben (Handbuch Version 1996.4, Thermo Scientific, Bonn). Hierbei war im Kit ausschließlich „schweres“ ¹³C₆-Lysin enthalten. Um zusätzlich auch Arginin zu markieren, wurde für die "schwere" Zellpopulation das im Kit enthaltene Arginin durch ¹³C₆, ¹⁵N₄-L-Arginin-HCl (Cortecnet, Mill Valley) substituiert. Nach acht Tagen wurde die Markierungseffizienz nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.4.3) und tryptischer in-Gel-Spaltung (siehe Abschnitt 2.6.1) massenspektrometrisch überprüft. Sie betrug für alle Versuche mindestens 95 %. Anschließend wurden jeweils 2 x 10⁶ Zellen bei 3000 g für 5 min zentrifugiert und als Pellet bei -80°C gelagert.

2.3.3 Präparation von primären humanen T-Zellen

Die Präparation von primären humanen T-Zellen für *Pulldown*-Experimente erfolgte im Labor der AG Kliche (Institut für Molekulare und Klinische Immunologie, Universität Magdeburg). Hierzu wurden zunächst die mononukleären Zellen des peripheren Blutes über eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation aus 200 mL Vollblut isoliert. Anschließend wurden alle nicht-T-Zellen (z.B. dendritische Zellen, Monozyten, NK-Zellen, B-Zellen) durch negative Selektion mit Hilfe des *Pan T Cell Isolation Kit II* (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach) entfernt. Die Ausbeute an primären T-Zellen betrug je nach Spender 1-3 x 10⁸ Zellen. Zur Regeneration wurden die Zellen in RPMI1640-Medium aufgenommen und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden jeweils 2 x 10⁶ Zellen bei 3000 g für 5 min zentrifugiert und als Pellet bei -80°C gelagert.

2.3.4 Expression in *E. coli*

Die Überexpression der GST- und His-Fusionsproteine erfolgte mit Hilfe von elektrokompetenten *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen. Hierzu wurden etwa 100 ng der Plasmide (siehe Tabelle 2) mit 50 µL

Zelllösung in eine gekühlte Elektroporationsküvette mit 1 mm Plattenabstand (Bio-Rad, München) gegeben. Direkt im Anschluss erfolgte die Transformation durch einen 1,8 kV-Puls mit Hilfe der Gene *Pulser X cell* (Bio-Rad, München). Anschließend wurden die Zellen in 1 mL 2xYT-Medium (16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, pH 7,0) überführt und zur Ausbildung der Antibiotika-Resistenz bei 37°C und 300 rpm für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurden verschiedene Volumina der Zelllösung zur Selektion auf antibiotikahaltige Agarplatten (0,1 mg/mL Ampicillin oder 0,035 mg/mL Kanamycin) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde eine Vorkultur mit 50 mL antibiotikahaltigem 2xYT-Medium durch Abstrich eines Zellklons von der Agarplatte angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 180 rpm über Nacht. Am nächsten Tag wurde die optische Dichte der Vorkultur bei 600 nm (OD_{600}) bestimmt. Anschließend wurde eine 1L-Hauptkultur mit der Vorkultur auf eine resultierende OD_{600} von 0,1 angeimpft. Bei Erreichen einer OD_{600} von 0,5-0,8 erfolgte die Induktion der Proteinexpression über den T7-Promotor durch Zugabe von 1 mM Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG) sowie einer weiteren Zugabe von 3 mM Antibiotika. Nach 3,5 h wurden die Zellen bei 3000 g für 15 min zentrifugiert und als Pellet bei -20°C gelagert. Die Expression wurde mittels SDS-PAGE vor und nach Induktion überprüft. Für die Aufnahme von ^{15}N -HSQC-Spektren erfolgte die Proteinexpression in ^{15}N -markiertem M9-Minimalmedium bei 22°C.

Tabelle 3: Komponenten zur Herstellung von 1 L M9-Minimalmedium.

Komponente	Menge	Sterilisierungsmethode	Lagerung
M9 Konzentrat (10x)	100 ml	autoklaviert	Raumtemperatur
Spurenelemente (100x)	10 ml	autoklaviert	4°C
MgSO ₄ [1M]	1 ml	autoklaviert	4°C
CaCl ₂ [1M]	0,3 ml	autoklaviert	4°C
Glukose [40 %]	10 ml	autoklaviert	Raumtemperatur
Thiamin [1mg/ml]	1,5 ml	sterilfiltriert	-20°C
Biotin [1mg/ml]	1,5 ml	sterilfiltriert	-20°C
$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$	0,75 g	sterilfiltriert	frisch einwiegen
H ₂ O	ad 1 L	sterilfiltriert	

Spurenelemente (100x): 13,4 mM EDTA, 1,8 mM FeSO₄, 0,367 mM ZnCl₂, 0,04 mM CuSO₄

M9-Konzentrat (10x): 1,8 mM FeSO₄, 0,367 mM ZnCl₂, 0,04 mM CuSO₄

2.3.5 Expression von His-FYN und His-ADAP in SF21-Insektenzellen

Die rekombinante Proteinexpression im eukaryotischen Insektenzellsystem kommt vor allem zum Einsatz, wenn eine Proteinexpression in *E. coli* aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht möglich ist oder die gewünschte Proteinfunktion (z.B. Enzymaktivität) nicht gegeben ist. Insektenzellen können im Vergleich zu Prokaryoten zahlreiche posttranslationale Modifikationen durchführen und verfügen zudem über ein komplexeres System zur Proteinfaltung und Ausbildung von Disulfidbrücken. Zudem lassen sie sich leicht mit Hilfe von Baculoviren infizieren, deren Genom vorher durch Einschleusen der gewünschten proteincodierenden Sequenz manipuliert wurde.

Die Herstellung rekombinanter Baculoviren für die Expression der Proteine His-ADAP und His-FYN in *SF21*-Insektenzellen erfolgte mit Hilfe des Bac-to-Bac-Baculovirus-Expressionssystems (Invitrogen, Carlsbad) gemäß den Herstellerangaben (Handbuch: Version D6 April 2004). Die hierfür verwendeten pFastBac-Donorvektoren lagen in der AG Freund vor (siehe Tabelle 2).

Die Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von jeweils 15-20 mL des Virusstocks zu 250 mL Zellsuspension bei einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/mL in Spinnerflaschen. Dem Medium wurden Antibiotika und Antimykotika (Invitrogen, Carlsbad) zugesetzt. Nach drei Tagen wurden die Zellen bei 500 g für 15 min zentrifugiert und als Pellet bei -20°C gelagert. Die Proteinexpression wurde mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.4.3) und Western-Blot (siehe Abschnitt 2.4.4) überprüft. Der erhaltene Virusstock wurde bei 4°C mit 5 % fötalem Kälberserum lichtgeschützt gelagert und für weitere Proteinexpressionen eingesetzt.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Zellaufschluss und Affinitätschromatographie

Der Zellaufschluss sowie die Proteinisolierung wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Die Zellpellets aus 1-2 L Kultur wurden zunächst in 10-20 mL Waschpuffer (GST-Waschpuffer bzw. His-Waschpuffer 1) resuspendiert. Diesem wurden zusätzlich eine Proteaseinhibitor-Tablette (*cOmplete EDTA-free*, Roche Diagnostics, Mannheim), 3 U/mL Benzonase (Merck KGaA, Darmstadt) sowie 5 mM MgCl_2 zugesetzt. Anschließend erfolgte der Aufschluss durch Ultraschall-Behandlung mit einem *Sonifier 250* (Branson Ultrasonics, Danbury) bei 30 % Leistung für 12 min. Daraufhin wurden unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 11000 g für 20 min entfernt und der Überstand zusätzlich mit einem $0,2 \mu\text{m}$ Spritzenfilter filtriert.

Die Isolierung von GST- und His-Fusionsproteinen aus *E. coli* erfolgte automatisiert mit dem *Profinia Affinity Chromatography Protein Purification System* (Bio-Rad, München), wobei vom Hersteller vorgepackte Säulen (*Bio-Scale Mini Profinity Cartridge IMAC/GST, 5 ml*) mit der entsprechenden Affinitätsmatrix verwendet wurden. GST-Fusionsproteine binden hierbei über ihren GST-tag an immobilisiertes Glutathion und werden nach einigen Waschsritten (GST-Waschpuffer) über einen Stufengradienten mit Glutathion (GST-Elutionspuffer) eluiert. His-Fusionsproteine binden über ihren His-tag an immobilisierte Nickelionen und werden nach einigen Waschsritten (His-Waschpuffer 2) mit einem Imidazol-Überschuss (His-Elutionspuffer) eluiert.

Die in Insektenzellen exprimierten Proteine His-FYN und His-ADAP wurden am *Äkta-Purifier-System* (GE Healthcare, München) mit einer vom Hersteller vorgepackten *HisTrapFF-Säule* isoliert. Nach Beladung der Säule wurde mit zwei Säulenvolumina Puffer A gewaschen und anschließend mit einem linear ansteigenden Imidazol-Gradienten aus Puffer A und Puffer B bis zu einem Imidazol-Gehalt von

0,5 M eluiert. Das Eluat wurde mit Hilfe eines Fraktionssammlers aufgefangen, wobei jeweils Fraktionen mit 1 mL gesammelt wurden. Die Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE untersucht und entsprechend vereinigt. Für die folgende Größenausschlusschromatographie wurden die vereinigten Eluate mit Hilfe eines Membranfilters (*Vivaspin20*, GE Healthcare, München) durch Zentrifugation bei 8000 g auf ein Volumen von 1-2 mL reduziert. Mögliche Proteinaggregate wurden im Anschluss durch Zentrifugation bei 16000 g für 5 min entfernt.

GST-Waschpuffer (2x): 300 mM NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, 10 mM EDTA, pH 7,4

GST-Elutionspuffer (2x): 40 mM Glutathion, 200 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0

His-Waschpuffer 1 (2x): 600 mM KCl, 100 mM KH₂PO₄, 10 mM Imidazol, pH 8,0

His-Waschpuffer 2 (2x): 600 mM KCl, 100 mM KH₂PO₄, 40 mM Imidazol, pH 8,0

His-Elutionspuffer (2x): 600 mM KCl, 100 mM KH₂PO₄, 500 mM Imidazol, pH 8,0

Puffer A: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM β-Mercaptoethanol, pH 8,0

Puffer B: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM β-Mercaptoethanol, 0,5 M Imidazol, pH 8,0

2.4.2 Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie werden Proteine anhand ihres hydrodynamischen Volumens voneinander getrennt. Gleichzeitig erfolgt eine Umpufferung in einen für die spätere Anwendung der Proteine geeigneten Puffer. Sofern nicht anders angegeben, wurde TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6) als Laufpuffer eingesetzt. Alle Größenausschlusschromatographien wurden mit dem *Äkta-Purifier-System* (GE Healthcare, München) durchgeführt. Für His-FYN und His-ADAP wurde die analytische Säule *Superdex 200 10/300 GL* verwendet. Für alle anderen Proteine kamen die präparativen Säulen *HiLoad 16/60 Superdex 75* oder *HiLoad 16/60 Superdex 200* zum Einsatz (GE Healthcare, München). Die Säule wurde zunächst mit zwei Säulenvolumina Laufpuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Probe injiziert und bei einer Flussrate von 0,4 mL/min chromatographiert. Das Eluat wurde mit Hilfe des Fraktionssammlers fraktioniert und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. Nach Vereinigung der Fraktionen mit dem Zielprotein wurde das Eluat über einen Membranfilter (*Vivaspin20*, GE Healthcare, München) konzentriert, bis die gewünschte Konzentration (etwa 100-500 μM) erreicht war. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte spektrophotometrisch mit dem *Nanodrop ND-1000* (Thermo Scientific, Bonn) bei einer Wellenlänge von 280 nm. Anschließend wurden die Proteinlösungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.4.3 SDS-PAGE

Die Trennung von Proteinen erfolgte mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [185]. Die Proteinproben wurden vor dem Gelauftrag mit

SDS-Probenpuffer (2x) versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Bei der Analyse von Zellpellets wurde vor dem Gelauftrag bei 16000 g für 5 min zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile und DNA zu entfernen. Die SDS-PAGE erfolgte nach Herstellerangaben mit dem *Mini-Protean Tetra Electrophoresis System* in Tris/Glycin/SDS-Laufpuffer (Bio-Rad, München). Es wurden die vom Hersteller angebotenen Gradientengele (*Mini-Protean TGX 4-20 %*) eingesetzt. Als Größenmarker wurden 10 µL *Mark12* oder *SeeBlue Plus2* (Invitrogen, Carlsbad) verwendet. Die Anfärbung der Proteine im Gel erfolgte mit dem *Bio-Safe Coomassie Stain* (Bio-Rad, München) nach Herstellerangaben.

SDS-Probenpuffer (2x): 20 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 4 % (w/v) SDS, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau, 125 mM Tris, pH 6,8

2.4.4 Western-Blot

Der Western-Blot ist eine Methode zum sensitiven und spezifischen Nachweis von Proteinen mit Antikörpern [186]. Die mittels SDS-PAGE getrennten Proteine werden dabei durch ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld zunächst vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Proteinerkennung erfolgt anschließend durch Zugabe von mono- oder polyklonalen Antikörpern, die spezifisch an das gewünschte Protein binden. Ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper bindet anschließend an den konstanten Teil des Primärantikörpers und ermöglicht so die Detektion des Zielproteins. Alternativ können Sekundärantikörper-Konjugate mit Reporterenzymen verwendet werden. Hierbei erfolgt die Detektion über eine enzymatische Lichtreaktion nach Zugabe der entsprechenden Substrate.

Der Transfer der mittels SDS-PAGE getrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte mit der *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad, München) nach Herstellerangaben. Dazu wurden Membran und Filterpapiere zunächst in Transferpuffer äquilibriert und von der Kathode zur Anode wie folgt zusammengesetzt: Schwamm, Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier, Schwamm. Der Transfer erfolgte bei 100 V für 1 h. Anschließend wurde die Membran für 1 h in Blockierpuffer geschwenkt, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper schwenkend für 2 h. Nach viermaligem Waschen mit TBS-T für jeweils 5 min wurde die Membran 1 h mit dem Sekundärantikörper schwenkend inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T und einmaligem Waschen mit TBS für jeweils 5 min erfolgte die Fluoreszenzdetektion an einem Odyssey Infrarot-Scanner (LI-COR, Nebraska).

Transferpuffer: 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 1,3 mM SDS, 20 % (v/v) Methanol, pH 9,6

TBS: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6

TBS-T: TBS mit 0,05 % (v/v) Tween-20

Blockierpuffer: TBS mit 5 % (w/v) Milchpulver

Primärantikörper: Maus anti-pTyr (CST, Cambridge) 1:2000 in TBS-T mit 5 % (w/v) Milchpulver; Maus anti-FYN (sc-434, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz) 1:200 in TBS-T mit 5 % (w/v) Milchpulver

Sekundärantikörper: Esel anti-Maus-IRDye680 (LI-COR, Nebraska) 1:10000 in Blockierpuffer

2.4.5 *In vitro*-Phosphorylierung mit FYN-Kinase

Die *in vitro*-Phosphorylierung verschiedener Konstrukte des Adapterproteins ADAP (siehe Tabelle 2) für *Pulldown*-Experimente und NMR-Untersuchungen erfolgte mit rekombinant in Insektenzellen hergestellter FYN-Kinase (siehe Abschnitt 2.3.5). Das folgende Protokoll wurde im Hinblick auf einen hohen Phosphorylierungsgrad optimiert. Dazu wurden, sofern nicht anders angegeben, 10 μ M Substratprotein mit 0,1-1 μ M FYN-Kinase (Enzym-Substrat-Verhältnis von 1:100 bis 1:10) in Kinasepuffer (50 mM Tris, 10 mM $MgCl_2$, 0,5 mM EGTA, 0,1 mM Na_3VO_4 , 150 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7,5) angesetzt. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 2 mM ATP (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) gestartet und erfolgte bei Raumtemperatur lichtgeschützt für 3-5 Tage. Das Volumen des Reaktionsansatzes sollte hierbei 300 μ L nicht überschreiten, da ansonsten geringere Phosphorylierungsgrade beobachtet wurden. Größere Ansätze wurden daher auf mehrere Reaktionsgefäße verteilt. Der Phosphorylierungsgrad wurde mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.4.3), Western-Blot (siehe Abschnitt 2.4.4) sowie massenspektrometrisch nach tryptischer in-Gel-Spaltung (siehe Abschnitt 2.6.1) überprüft.

2.5 *Pulldown*-Experimente

2.5.1 Allgemeine Durchführung

Im Folgenden wird das Standard-Protokoll für *Pulldown*-Experimente beschrieben. Alle Abweichungen von diesem Protokoll sind gesondert bei den entsprechenden Experimenten aufgeführt. Die Immobilisierung der Köderstrukturen an eine funktionalisierte Agarosematrix erfolgte bei Peptiden über die Thiolgruppe eines endständigen Cysteinrestes (siehe Abschnitt 2.5.2) und bei Proteinen über einen GST-*tag* (siehe Abschnitt 2.5.3). Zudem wurde eine kovalent gerichtete Immobilisierungsstrategie mit Hilfe des Enzyms Sortase A entwickelt, die in Abschnitt 2.10 beschrieben wird.

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Das Waschen der Agarosematrix erfolgte jeweils durch Resuspendieren in 1 mL PBS und anschließender Entfernung des Überstands durch Zentrifugation bei 700 g für 3 min. Für die Präparation des Zelllysats wurden je *Pulldown*-Experiment etwa 2×10^7 Jurkat T-Zellen oder $2,5 \times 10^7$ primäre humane T-Zellen in eiskaltem Lysepuffer resuspendiert und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Die Entfernung unlöslicher Zellbestandteile erfolgte durch Zentrifugation bei 16000 g für 10 min. Für jedes *Pulldown*-Experiment

wurden 25 μL der Agarosematrix vorgelegt. Nach viermaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit 200 μL Zelllysat über Nacht (rotierend). Am folgenden Tag wurden nicht bindende Proteine durch viermaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurde die Agarosematrix in *Ultrafree-MC* Zentrifugalfiltereinheiten (Millipore, Schwalbach) überführt und der Überstand durch Zentrifugation entfernt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit 35 μL SDS-Probenpuffer (2x) bei 95°C für 5 min. Das Eluat wurde durch Zentrifugation bei 16000 g für 5 min in ein neues Reaktionsgefäß aufgefangen und bei -20°C bis zum Gelauftrag gelagert.

PBS: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 , pH 7,4

Lysepuffer: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 0,5 mM EGTA, 1 % (v/v) NP-40, 3U/mL Benzonase (Merck KGaA, Darmstadt), 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM DTT, 1 Tablette Protease-Inhibitor / 10 mL (*cOmplete EDTA-free*, Roche Diagnostics, Mannheim), pH 7,5

2.5.2 Immobilisierung über Thiolgruppen

Zur kovalenten Immobilisierung von Peptiden über einen C- oder N-terminalen Cysteinrest wurde eine funktionalisierte Agarosematrix verwendet (*SulfoLink Coupling Resin*, Thermo Scientific, Bonn). Diese tragen auf ihrer Oberfläche Iodoacetylgruppen, die spezifisch mit freien Thiolgruppen unter Ausbildung einer stabilen Thioetherbindung reagieren. Laut Hersteller können 0,5-1 μg Peptid / μL Agarosematrix immobilisiert werden. Dies entspricht einer Beladung von etwa 10-20 nmol Peptid / 20 μL Agarosematrix.

Die Kopplung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Zunächst wurde die Agarosematrix mit Kopplungspuffer (50 mM Tris, 5 mM EDTA-Na, pH 8,5) äquilibriert und anschließend mit einer 1 mM-Peptidlösung in Kopplungspuffer für 1 h schwenkend inkubiert. Um eine vollständige Reduktion der Peptid-Thiolgruppen sicherzustellen, wurden der Peptidlösung gegebenenfalls 25 mM des Reduktionsmittels Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) zugesetzt. Nach dreimaligem Waschen mit Kopplungspuffer wurde die Agarosematrix als nächstes mit 50 mM β -Mercaptoethanol in Kopplungspuffer für 1 h schwenkend inkubiert, um nicht abgesättigte Iodoacetylgruppen zu blockieren. Anschließend folgten sechs Waschschrte mit 1 M NaCl, zwei Waschschrte mit H_2O und vier Waschschrte mit 50 % ACN in H_2O . Abschließend wurden jeweils 20-40 μL der Agarosematrix aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.5.3 Immobilisierung über GST

Die Immobilisierung von GST-Fusionsproteinen erfolgte über die nicht-kovalente Interaktion ihres GST-tags mit einer Glutathion-funktionalisierten Agarosematrix (*Glutathione Sepharose 4B*, GE Healthcare, München). Hierfür wurde die Agarosematrix zunächst durch viermaliges Waschen mit

PBS äquilibriert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 0,2-0,5 mg des GST-Fusionsproteins / 25 µL Agarosematrix in 1-2 mL PBS rotierend für 1 h. Nicht gebundenes Protein wurde im Anschluss durch viermaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Kontrolle der Proteinkopplung erfolgte mittels SDS-PAGE durch einen Vergleich der Proteinmenge im Überstand vor und nach der Kopplung.

2.5.4 *Pulldown* mit SILAC-Markierung

Bei SILAC-basierten *Pulldown*-Experimenten erfolgte die Inkubation der zu vergleichenden Köderstrukturen (z.B. Peptid und Phosphopeptid) getrennt mit Zelllysaten aus "leicht" oder "schwer" markierten Zellen (siehe Abschnitt 2.3.2). Erst vor der Elution der gebundenen Proteine erfolgte die Vereinigung der beiden Ansätze. Für alle durchgeführten SILAC-basierten *Pulldown*-Experimente wurde eine inverse Markierungsstrategie verfolgt, bei der jede Köderstruktur sowohl mit "leicht"- als auch mit "schwer"-markiertem Zelllysat inkubiert wurde. Insgesamt ergeben sich daraus für jedes vollständige SILAC-Experiment zwei unabhängige *Pulldown*-Experimente A und B, bei denen spezifische Bindungspartner entgegengesetzte (inverse) Anreicherungsfaktoren aufweisen und so von externen Kontaminationen und Konzentrationsschwankungen im Zelllysat unterschieden werden können.

2.5.5 *Pulldown* mit ¹⁸O-Markierung

Bei ¹⁸O-basierten *Pulldown*-Experimenten erfolgte die Inkubation der zu vergleichenden Köderstrukturen (z.B. Peptid und Phosphopeptid) ebenfalls getrennt, jedoch mit demselben unmarkierten Zelllysat. Die Elution und Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE erfolgte im Gegensatz zu den SILAC-Experimenten getrennt, wobei die Ansätze in benachbarten Gelspuren aufgetragen wurden. Die Markierung der Ansätze erfolgte im Anschluss während der tryptischen in-Gel-Spaltung durch Verwendung von "leichtem" bzw. "schwerem" Wasser (siehe Abschnitt 2.6.2). Erst danach wurden die Ansätze zu einem vollständigen *Pulldown*-Experiment vereinigt. Alle ¹⁸O-basierten *Pulldown*-Experimente wurden als Replikate durchgeführt, wobei eine Umkehrung der Markierung (inverse Markierungsstrategie) wie bei den SILAC-Experimenten erfolgte.

2.6 Enzymatische Spaltung von Proteinen

Die Identifizierung von Proteinen sowie die Analyse von Phosphorylierungsstellen mit Hilfe der Massenspektrometrie erfolgt anhand ihrer Peptide. Diese werden durch Spaltung der Proteine mit sequenzspezifischen Endoproteasen wie Trypsin, Lys-C, Arg C oder Asp-N erzeugt. Darüber hinaus werden weniger spezifische Endoproteasen wie Elastase, Proteinase K oder Pepsin eingesetzt.

2.6.1 Tryptische in-Gel-Spaltung

Zur Identifizierung von Proteinen im Anschluss an die SDS-PAGE erfolgte eine tryptische in-Gel-Spaltung [187]. Hierfür wurden je Gelspur 20-30 Proteinbanden mit einem Skalpell ausgeschnitten und zerkleinert. Anschließend wurde der Coomassie-Farbstoff durch Zugabe von 200 μL Entfärbelösung (50 % v/v ACN, 25 mM NH_4HCO_3) und anschließender Inkubation für 15 min bei 37°C entfernt. Nach Inkubation der Gelstücke mit 50 mM NH_4HCO_3 für 15 min bei 37°C wurden diese durch Zugabe von 100 μL ACN entwässert und anschließend in einer Vakuumzentrifuge (*Servant SPD 101 SpeedVac System*, Thermo Scientific, Bonn) getrocknet. Im Anschluss wurden die Gelstücke mit 50 ng Trypsin (Promega GmbH, Mannheim) in 5 μL 50 mM NH_4HCO_3 versetzt und kurz darauf mit weiteren 10-15 μL 50 mM NH_4HCO_3 überschichtet. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht. Am folgenden Tag wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 μL Abstopplösung (5 % v/v TFA in ACN) und Ultraschallbehandlung für 5 min beendet. Die Überstände wurden in LC-Probengefäße überführt. Die Gelstücke wurden anschließend mit 50 μL ACN für 10 min inkubiert und die Überstände ebenfalls in die LC-Probengefäße überführt. Die vereinigten Überstände wurden in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 6 μL 5 % (v/v) ACN, 0,1 % (v/v) TFA aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.6.2 Tryptische in-Gel-Spaltung (^{18}O -Markierung)

Die tryptische in-Gel-Spaltung mit ^{18}O -Markierung wurde zur Markierung der Proteine aus primären T-Zellen verwendet. Hierbei wurden die *Pulldown*-Eluate der zu vergleichenden Proben direkt nebeneinander mittels SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie angefärbt (siehe Abschnitt 2.4.3). Das Ausschneiden der Gelbanden der beiden Proben erfolgte jeweils auf gleicher Höhe. Entfärbung und Trocknung der Gelbanden erfolgte wie in Abschnitt 2.6.1 beschrieben. Anschließend erfolgte die tryptische in-Gel-Spaltung der beiden Proben getrennt in Anwesenheit von "leichtem" H_2^{16}O bzw. "schwerem" H_2^{18}O (Campo Scientific GmbH, Berlin, 97 % ^{18}O) [188]. Hierzu wurde der zum Lösen des Trypsins sowie Überschichten der Proben eingesetzte Trypsinpuffer (50 mM NH_4HCO_3) entsprechend mit "leichtem" H_2^{16}O bzw. "schwerem" H_2^{18}O angesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht. Am folgenden Tag wurden die Proben bei 95°C für 5 min inkubiert, um einen durch Trypsin katalysierten Sauerstoff-Rücktausch auszuschließen. Nach Abkühlen der Proben erfolgte die Zugabe von 10 μL Abstopplösung (0,5 % v/v TFA in ACN) und Ultraschallbehandlung für 5 min. Daraufhin wurden die Überstände korrespondierender Gelbanden aus "leichter" und "schwerer" Probe in einem LC-Probengefäß vereinigt. Die Gelstücke wurden im Anschluss mit 50 μL ACN für 10 min gewaschen und ebenfalls in das LC-Probengefäß überführt. Anschließend wurden die Proben in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 6 μL 5 % (v/v) ACN, 0,1 % (v/v) TFA aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.6.3 Tryptische *on-bead*-Spaltung

Nach viermaligem Waschen mit 50 mM NH_4HCO_3 wurde die Agarosematrix (ca. 20 μL) in *Ultrafree-MC* Zentrifugalfiltereinheiten (Millipore, Schwalbach) überführt und der Überstand durch Zentrifugation entfernt. Die tryptische Spaltung erfolgte *on-bead* durch Zugabe von 2 μg Trypsin (Promega GmbH, Mannheim) in 100 μL 50 mM NH_4HCO_3 bei 37°C über Nacht. Nach der tryptischen Spaltung wurden die Proben bei 12000 g für 5 min zentrifugiert und der Durchlauf aufgefangen.

2.6.4 Spaltung von Proteinen mit Elastase

Um eine hohe Sequenzabdeckung bei der Identifizierung von Phosphorylierungsstellen zu erhalten, wurde bei der enzymatischen in-Gel-Spaltung von ADAP neben Trypsin zusätzlich das unspezifische Enzym Elastase eingesetzt [189]. Die enzymatische Spaltung erfolgte wie in Abschnitt 2.6.1 beschrieben, wobei je Gelstück (anstelle von 50 ng Trypsin) 100 ng Elastase (Sigma-Aldrich, Schnellendorf) in 10 μL 50 mM NH_4HCO_3 eingesetzt wurden.

2.7 Biophysikalische Charakterisierung der ADAP-ZAP70-Interaktion

2.7.1 Strukturelle Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie

Zur Analyse der direkten Interaktion zwischen phosphorylierter ADAP-hSH3^N-Domäne (hSH3^N) und der TandemSH2-Domäne von ZAP70 (ZAP70-tSH2) wurden beide Konstrukte als His-Fusionsproteine sowohl unmarkiert als auch ¹⁵N-markiert in *E. coli* hergestellt (siehe Abschnitt 2.3.4). Die *in vitro*-Phosphorylierung von hSH3^N mit FYN-Kinase erfolgte wie in Abschnitt 2.4.5 beschrieben. Der Phosphorylierungsgrad an Y571 wurde massenspektrometrisch bestimmt und betrug >85 % (siehe Abschnitt 2.8.5). Die Aufnahme von ¹H¹⁵N-HSQC-Spektren erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Jana Sticht an einem *Bruker Avance III 700 MHz*-Spektrometer (Bruker GmbH, Karlsruhe). Hierfür wurden 175 μM unphosphorylierte- und 60 μM phosphorylierte ¹⁵N-hSH3^N zunächst allein sowie nach Zugabe mindestens äquimolarer Mengen ZAP70-tSH2 vermessen. Zusätzlich erfolgten Messungen mit 100 μM ¹⁵N-ZAP-tSH2 allein sowie nach Zugabe mindestens äquimolarer Mengen hSH3^N (unphosphoryliert sowie phosphoryliert). Alle Messungen erfolgten in 100 mM NaH_2PO_4 , 50 mM NaCl, 5 mM DTT, pH 6,8 mit 10 % D_2O bei einer Temperatur von 298 Kelvin. Die Umpufferung von hSN3^N nach der *in vitro*-Phosphorylierung erfolgte durch Dialyse. Für jedes HSQC-Spektrum wurden 1024 Datenpunkte in der Protonendimension und 128 Datenpunkte in der Stickstoffdimension aufgezeichnet. Es wurden 8 Scans (unphosphorylierte ¹⁵N-hSH3^N), 16 Scans (phosphorylierte ¹⁵N-hSH3^N) oder 64 Scans (¹⁵N-ZAP-tSH2) durchgeführt. Die Prozessierung und Auswertung der Spektren erfolgte mit Hilfe des *TopSpin Software Package* (Bruker GmbH, Karlsruhe) sowie der

Software *CcpNmr Analysis* [190]. Hierbei wurden die publizierten Signalzuordnungen von hSH3^N (BMRB6536, [191]) sowie die von Dr. Rutger Folmer zur Verfügung gestellten Signalzuordnungen für ZAP70-tSH2 verwendet [35]. Zur Berechnung der Unterschiede in der chemischen Verschiebung ($\Delta\delta$) wurde folgende Formel verwendet: $\Delta\delta = (\delta H^2 + (0,15 * \delta N)^2)^{0,5}$. Unterschiede wurden als signifikant definiert, sofern ihre Werte außerhalb des Mittelwertes aller eindeutig zugeordneten Signale zuzüglich Standardabweichung lagen. Die Berechnung der Linienverbreiterung (Intensitätsverlust) erfolgte anhand der Signal-Rausch-Verhältnisse (*signal-to-noise ratios*, S/N) aller nichtüberlappenden Signale mit S/N > 4. Eine Reduktion des Quotienten aus S/N mit Ligand und S/N ohne Ligand wurde als signifikant definiert, wenn sie unterhalb des Mittelwertes zuzüglich Standardabweichung lag.

2.7.2 Quantitative Charakterisierung mittels *Microscale Thermophoresis* (MST)

Die Bestimmung der Bindungsaffinität (K_D -Wert) zwischen der ADAP-hSH3^N-Domäne und ZAP70-tSH2 erfolgte mittels *Microscale Thermophoresis* (MST). Das hierfür eingesetzte fluoreszenzmarkierte SNAP-hSH3^N-His-Konstrukt wurde mittels *in vitro*-Translation von Dr. Paul Majkut (FMP, Berlin) hergestellt. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte kotranslational durch Zugabe von 15 μ L des SNAP-spezifischen Substrats BG-647 (NEB, Ipswich) während der Synthese [145, 192]. Anschließend wurde das SNAP-hSH3^N-His-Konstrukt mit FYN-Kinase *in vitro* phosphoryliert (siehe Abschnitt 2.4.5). Die selektive Phosphorylierung an Y571 wurde massenspektrometrisch bestimmt und betrug >70 % (siehe Abschnitt 2.8.5). Die Durchführung der MST-Messungen erfolgte wie von Jerabek-Willemsen *et al.* beschrieben [193]. Für jede Messung wurden 16 Proben aus einer seriellen Verdünnung von ZAP70-tSH2 (40 nM bis 100 μ M) und jeweils 25 nM SNAP-hSH3^N (phosphoryliert und unphosphoryliert) in MST-Puffer hergestellt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden die Proben in *Monolit Standard Treated Capillaries* überführt und mit einem Monolith NT.115 (NanoTemper GmbH, München) nach dem Standardprotokoll bei 20 % Laserstärke und Detektion im roten Kanal vermessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Hersteller-Software (*NT Analysis*) durch Auftragung der Fluoreszenzintensitätsdifferenz gegen die ZAP70-tSH2-Konzentration. Bei den mit Hilfe einer Ausgleichsfunktion ermittelten K_D -Werten handelt es sich um einen Durchschnitt (\pm Standardabweichung) aus drei unabhängigen Experimenten

PBS: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4

MST-Puffer: PBS mit 1,75 % (v/v) *E. coli* Extrakt (*EasyXpress Mini Kit*, Qiagen, Hilden), 0,05 % (v/v) Tween-20

2.8 Massenspektrometrische Proteinanalytik

2.8.1 NanoLC-ESI-MS/MS

Die Analyse komplexer Peptidgemische nach enzymatischer Proteinspaltung erfolgte mittels nanoLC-ESI-MS/MS. Hierzu wurde ein *Eksigent 2D Nanoflow LC-System* (Axel Semrau GmbH, Sprockhövel) verwendet, welches über die Nanosprayquelle (Proxeon, Odense) direkt mit einem LTQ-Orbitrap XL-Massenspektrometer (Thermo Scientific, Bonn) verbunden war. Die Ionisierung erfolgte über eine *PicoTip ESI Emitter*-Kapillare (New Objective, Woburn) mit einem Innendurchmesser von 20 μm und einem Öffnungsdurchmesser von 10 μm .

Zunächst wurden 5,6 μL der Probenlösung zum Entsalzen und Konzentrieren auf eine Vorsäule (Acclaim PepMap100, C18, 5 μm , 100 \AA , 300 μm i.d. x 5 mm, Thermo Scientific, Bonn) geladen und mit einer mobilen Phase aus 0,1 % TFA, 2 % ACN bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ für 5 min gespült. Anschließend wurde die Vorsäule in den analytischen Kanal geschaltet. Hier erfolgte eine chromatographische Trennung der Peptide über eine nanoLC-Säule (Acclaim PepMap100, C18, 3 μm , 100 \AA , 75 μm i.d. x 25 cm) mit einem Gradienten von 2 % bis 25 % Puffer B in 60 min und weiterem Anstieg auf 80 % bei 80 min. Die Flussrate betrug 300 nL/min. Die mobile Phase bestand aus Puffer A (0,1 % v/v FA) und Puffer B (0,1 % v/v FA in ACN).

Die Aufnahme der Spektren erfolgte im datenabhängigen Modus (*data dependent mode*). Hierbei wurden während des gesamten Messzeitraums hochaufgelöste MS-Spektren durch die Orbitrap aufgezeichnet. Der Massenbereich betrug m/z 350-1500 bei einer nominalen Auflösung von 30000. Parallel wurden MS/MS-Spektren der fünf intensivsten zwei- und dreifach geladenen Peptidionen (Top 5) in der linearen Ionenfalle gemessen. Die gewünschten Füllmengen wurden mit Hilfe der AGC-Funktion (*automatic gain control*) eingestellt und betragen 1×10^6 Ionen (Orbitrap) bzw. 2×10^4 Ionen (lineare Ionenfalle). Die maximalen Füllzeiten für die MS- und MS/MS-Messungen wurden auf 1 s (Orbitrap) bzw. 0,5 s (lineare Ionenfalle) begrenzt. Nach Isolierung der Peptidionen mit einer Isolierungsbreite von 2,2 Da erfolgte die Fragmentierung mittels CID mit Breitbandaktivierung (*wideband activation*) und einer normierten Aktivierungsenergie von 35 %. Die Messung erfolgte hierbei mit normaler Geschwindigkeit (*normal scan rate*). Bereits gemessene Peptidionen wurden für die folgenden 2 min von weiteren MS/MS-Messungen ausgeschlossen (*dynamic exclusion*).

Alternativ wurden ab 2012 die meisten Analysen mit dem leistungsstärkeren Orbitrap Elite Massenspektrometer (Thermo Scientific, Bonn), das mit einer Ultimate 3000 Ncs-3500RS LC-Anlage (Thermo Scientific, Bonn) gekoppelt war, durchgeführt. Abweichend von der oben beschriebenen Konfiguration wurde eine Vorsäule mit 3 μm -Partikeln verwendet (Acclaim PepMap100, C18, 3 μm , 100 \AA , 75 μm i.d. x 2 cm, nanoViper) sowie eine analytische Säule mit 2 μm -Partikeln (Acclaim PepMap RSLC C18, 2 μm , 100 \AA , 75 μm i.d. x 25 cm, nanoViper). Die Ionisierung erfolgte über einen

Edelstahl-Emitter (ES542, Thermo Scientific, Bonn) mit einem Innendurchmesser von 30 μm . Die nominale Auflösung für MS-Messungen betrug 60000. Die Füllmengen betragen 1×10^6 Ionen in der Orbitrap bzw. 1×10^4 Ionen in der linearen Ionenfalle. Die MS/MS-Messungen erfolgten bei hoher Geschwindigkeit (*rapid scan rate*) mit einer Top 15-Methode und einer Isolierungsbreite von 2,0 Da. Die maximale Füllzeit der linearen Ionenfalle betrug hierbei 50 ms.

2.8.2 Identifizierung von Proteinen über eine Datenbanksuche

Die experimentellen Rohdaten (*raw*-Format) wurden zunächst in das *mgf*-Format (Peaklisten) konvertiert. Anschließend erfolgte die Identifizierung der Proteine durch Abgleich der experimentell bestimmten Peptid- und Fragmentenmassen mit einer humanen Proteindatenbank (Uniprot, <http://www.uniprot.org>) mit Hilfe des Mascot-Algorithmus (Mascot-Server Version 2.2, Matrix Science, London). Hierbei wurden für MS- und MS/MS-Ionen Massenabweichungen von ± 10 ppm bzw. $\pm 0,35$ Da toleriert. Für das verwendete Enzym Trypsin waren maximal zwei Fehlsplattstellen zugelassen; als variable Modifikationen wurden stets oxidiertes Methionin, das Propionamid-Addukt von Cystein sowie eine Acetylierung des Protein N-Terminus berücksichtigt. Ein Protein wurde als identifiziert angesehen, wenn mindestens zwei Peptide seiner Sequenz identifiziert werden konnten, darunter mindestens ein einzigartiges (*unique*) Peptid.

2.8.3 Quantifizierung von SILAC-markierten Proteinen

Die Proteinidentifizierung und Quantifizierung der SILAC-basierten *Pulldown*-Experimente erfolgte mit dem integrierten Suchalgorithmus Andromeda der frei verfügbaren MaxQuant-Software (Version 1.4.1.2) [169, 170]. Hierbei wurden neben den in Abschnitt 2.8.2 genannten Parametern die markierten Aminosäuren Lys6 und Arg10 ausgewählt sowie die Optionen *requantify* und *match between runs*. Für die Proteinidentifizierung wurden mindestens zwei Peptide (*razor*) gefordert, wobei eines davon einzigartig (*unique*) sein musste. Die Falschzuordnungsrate (*false discovery rate*, FDR) für Proteine und Peptide betrug 1 % und wurde über die Identifizierungen aus einer reversen Datenbank (*decoy*-Datenbank) bestimmt. Aus den erzeugten Proteinlisten wurden zunächst alle reversen Proteineinträge und Kontaminationen entfernt. Anschließend wurden alle Proteineinträge entfernt, die nicht mit mindestens zwei Peptiden quantifiziert wurden ($\text{Ratio count} \geq 2$). Zur Darstellung der Ergebnisse wurden die normalisierten Isotopenverhältnisse verwendet.

2.8.4 Quantifizierung von ¹⁸O-markierten Proteinen

Die Proteinidentifizierung und Quantifizierung der ¹⁸O-basierten *Pulldown*-Experimente erfolgte mit der *Mascot Distiller Quantitation Toolbox* (Version 2.4.3.3, Matrix Science, London) mit integrierter Mascot-Suchmaschine (Version 2.2, Matrix Science, London). Hierbei wurde neben den allgemeinen Parametern (siehe Abschnitt 2.8.2) die ein- und zweifache ¹⁸O-Markierung als variable Modifikation des C-Terminus ausgewählt. Die Reinheit des verwendeten „schweren“ Wassers wurde gemäß den Herstellerangaben mit 97 % angegeben. Die Quantifizierung der Peptidsignale erfolgte mit folgenden, von den Standardeinstellungen abweichenden Parametern: *correlation threshold* = 0,98, *fraction threshold* = 0,5, *XIC threshold* = 0,3, *all charge state threshold* = 0,3, *max XIC width* = 25. Für die Quantifizierung wurden ausschließlich einzigartige (*unique*) Peptide verwendet. Aus den erzeugten Proteinlisten wurden alle Proteineinträge entfernt, die nicht mit mindestens zwei Peptiden quantifiziert wurden (Ratio count ≥ 2).

2.8.5 Identifizierung und Quantifizierung von Proteinphosphorylierungen

Die Identifizierung der Phosphorylierungsstellen verschiedener ADAP-Konstrukte erfolgte nach SDS-PAGE und enzymatischer in-Gel-Spaltung mittels nanoLC-ESI-MS/MS (siehe Abschnitt 2.8.1). Bei der Datenbanksuche (siehe Abschnitt 2.8.2) wurde zusätzlich phosphoryliertes Tyrosin als variable Modifikation angegeben. Die Abschätzung des Phosphorylierungsgrades erfolgte durch eine relative Quantifizierung der Signalintensitäten aller korrespondierenden Peptid/Phosphopeptid-Signale für die jeweilige Position unter Einbeziehung aller Ladungszustände [194, 195]. Die Intensitäten wurden hierbei mit Hilfe des extrahierten Ionenchromatogramms (*extracted-ion chromatogram*, XIC) mit dem Programm *Xcalibur Qualbrowser* (Thermo Scientific, Bonn) ermittelt. Intensitäten $<10^7$ wurden nicht berücksichtigt.

2.9 Nachweis der ADAP-ZAP70-Interaktion im zellulären Kontext

2.9.1 Co-Immunopräzipitationen und Western-Blot-Analysen

Die Untersuchungen zur ADAP-ZAP70-Interaktion in Jurkat T-Zellen wurden von Amelie Witte und Dr. Stefanie Kliche am Institut für Molekulare und Klinische Immunologie der Universität Magdeburg durchgeführt. Die Stimulation des T-Zellrezeptors erfolgte mit dem CD3-spezifischen Antikörper OKT3 (10 $\mu\text{g/ml}$). Die Stimulation des Chemokinrezeptors CXCR4 erfolgte über CXCL12 (100 ng/ml). Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert [74, 76, 196]. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mit einem Bradford-Assay (Carl Roth, Karlsruhe) wurden 500 μg Protein aus den Lysaten für die Präzipitation von ZAP70 (anti-ZAP70

Kaninchenserum, Cell Signaling, Cambridge) eingesetzt. Nach Auftrennung der präzipitierten Komplexe sowie einer Lysatkontrolle (50 µg) mittels SDS-PAGE erfolgte eine Western-Blot-Analyse mit den Antikörpern anti-SKAP55 [74, 76] und anti-ADAP (BD Biosciences, Franklin Lakes). Die Detektion erfolgte über einen Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Dianova, Hamburg) über die Chemolumineszenzreaktion des Luminols (Carl Roth, Karlsruhe).

2.10 *Pulldown*-Strategie mit Sortase A-vermittelter Immobilisierung

Im Zuge dieser Arbeit wurde eine neuartige *Pulldown*-Strategie entwickelt, bei der die gewünschte Köderstruktur gerichtet und kovalent mit Hilfe des Enzyms Sortase A an eine Agarosematrix ligiert wird. Das Enzym Sortase A katalysiert hierbei die Ausbildung einer Peptidbindung zwischen einem C-terminalen LPXTG-Motiv (Substrat) und einem N-terminalen GGG-Motiv (Nukleophil). Des Weiteren wurde ein Verfahren zur absoluten Quantifizierung der Ligationsausbeute über Massenspektrometrie entwickelt (siehe Abschnitt 2.10.2).

2.10.1 Immobilisierung und *Pulldown*-Experiment

Im ersten Schritt wurde das Nukleophil-Peptid mit der Sequenz GGGRGGVEGGC über den C-terminalen Cysteinrest mittels Thiolkopplung (siehe Abschnitt 2.5.2) an die Agarosematrix immobilisiert. Anschließend erfolgte die durch Sortase A katalysierte Ligation des gewünschten Protein- oder Peptidsubstrats über dessen C-terminales LPVTG-Motiv. Das hier beschriebene Protokoll wurde im Hinblick auf eine maximale Ausbeute optimiert (siehe Abschnitt 2.10.5).

Für jedes *Pulldown*-Experiment und jeden Kontrollansatz zur Quantifizierung der Ligation (siehe Abschnitt 2.10.4) wurden 40 µL der Nukleophil-beladenen Agarosematrix vorgelegt. Nach viermaligem Waschen mit Ligationspuffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,2) erfolgte die Zugabe von 150-300 µM des Peptid- oder Proteinsubstrates und 30 µM Sortase A in 0,5 mL Ligationspuffer mit 5 mM CaCl₂. Die Inkubation erfolgte über Nacht (rotierend). Am folgenden Tag wurde die Reaktionslösung durch viermaliges Waschen mit jeweils 1 mL PBS entfernt. Das *Pulldown*-Experiment erfolgte daraufhin durch die Inkubation der immobilisierten Substrate mit SILAC-markierten Jurkat T-Zelllysaten (siehe Abschnitt 2.5.1). Nach viermaligem Waschen der Agarosematrix mit jeweils 1 mL PBS und Überführung in *Ultrafree-MC* Zentrifugalfiltereinheiten (Millipore, Schwalbach) wurden die gebundenen Proteine eluiert und anschließend in-Lösung mit Trypsin gespalten.

2.10.2 Elution und tryptische in-Lösung-Spaltung

Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch Zugabe von 50 μL 1 % (w/v) Rapigest (Waters GmbH, Eschborn) in 50 mM NH_4HCO_3 bei 60°C für 10 min. Das Eluat wurde durch Zentrifugation bei 16000 g für 5 min aufgefangen. Um eine ausreichende Trypsinaktivität zu gewährleisten, darf die Konzentration an Rapigest während der Spaltung 0,5 % nicht übersteigen. Der Ansatz wurde daher durch Zugabe von 100 μL 50 mM NH_4HCO_3 verdünnt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3 μg Trypsin (Promega GmbH, Mannheim) in 15 μL 50 mM NH_4HCO_3 und Inkubation bei 37°C über Nacht. Am folgenden Tag wurde die Reaktion durch Zugabe von 15-20 μL 1 % (v/v) TFA und Ultraschallbehandlung für 5 min beendet. Hierbei ist darauf zu achten, dass ein pH-Wert von 2 erreicht wird, da dies zu einer Zersetzung von Rapigest führt. Abschließend wurde der Ansatz in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 90 μL Messlösung (5 % v/v ACN, 0,1 % v/v TFA in Wasser) gelöst.

2.10.3 2-D RP-RP LC-MS/MS

Aufgrund des fehlenden Fraktionierungsschritts auf Proteinebene war das hierbei entstandene Peptidgemisch für eine direkte Analyse mittels nanoLC-ESI-MS/MS zu komplex. Daher erfolgte eine zusätzliche Fraktionierung auf Peptidebene mittels Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie (*reversed phase liquid chromatography*, RP-LC) [162]. Da auf diese Weise insgesamt zwei RP-LC-Trennungen auf Peptidebene durchgeführt werden, wird die gesamte Methodik als zweidimensionale (2D) RP-RP LC-MS/MS bezeichnet. Die erste chromatographische Dimension hat keine direkte Verbindung (*offline*) zur nanoLC-ESI-MS/MS. Die Trennung der Peptide erfolgte über eine RP-Säule (Acclaim PepMap100, 5 μm , 100 \AA , 250 x 1,0 mm i.d., Thermo Scientific, Bonn) mit einem 125-minütigen linearen Gradienten aus 1-50 % Puffer B bei einer Flussrate von 40 $\mu\text{L}/\text{min}$. Die mobile Phase bestand aus Puffer A (0,1 % v/v TFA, 5 % v/v ACN) und Puffer B (0,1 % v/v TFA, 20 % Wasser in ACN). Insgesamt wurden 16 Fraktionen mit einer Fraktionsdauer von jeweils 75 s (5 Zyklen) gesammelt. Im Anschluss wurden die Fraktionen in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 6 μL Messlösung (5 % v/v ACN, 0,1 % v/v TFA) gelöst. Die Analyse erfolgte mittels nanoLC-ESI-MS/MS (siehe Abschnitt 2.8.1).

2.10.4 Quantifizierung der Sortase A-vermittelten Ligation mittels MALDI-MS

Die Quantifizierung der Ligationausbeute erfolgte in einem zusätzlichen Kontrollansatz mittels massenspektrometrischer Isotopenverdünnungsanalyse. Die Ligation erfolgte gemäß Abschnitt 2.10.1. Anschließend wurde das immobilisierte Protein- oder Peptidsubstrat über eine tryptische *on-bead*-Spaltung (siehe Abschnitt 2.6.3) freigesetzt und der Durchlauf durch Zentrifugation bei

12000 g für 5 min aufgefangen. Im Anschluss wurden 5 µL des Durchlaufs mit 5 µL eines isotopenmarkierten Referenzpeptids (150 µM in 50 % ACN in Wasser) (siehe Abschnitt 2.2) vermischt. Diese Lösung wurde anschließend mittels MALDI-MS analysiert. Die Präparation erfolgte nach der *dried-droplet*-Methode [158]. Dabei wurden Probe und MALDI-Matrix (5 mg/mL α -Cyano-4-hydroxymizsäure, 0,3 % v/v TFA, 40 % Wasser v/v in ACN) im gleichen Verhältnis gemischt und davon 1-2 µL auf den Probenträger aufgetragen. Nach Trocknung der Probe bei Raumtemperatur erfolgte die Messung an einem AB SCIEX TOF/TOF 5800 System (Applied Biosystems, Framingham) mit integriertem *neodymium-doped yttrium lithium fluoride* (Nd:YLF)-Laser bei einer Wellenlänge von 349 nm sowie einer Frequenz von 400 Hz (MS-Spektren) und 1000 Hz (MS/MS-Spektren). Alle Messungen erfolgten im positiven Reflektor-Modus in einem Massenbereich von 700-4000 Da. Ein Spektrum stellte dabei die Aufsummierung von 20 Subspektren dar, wobei jedes einzelne durch die Überlagerung von 250 Laserpulsen erzeugt wurde. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Data Explorer (Version 4.1, Applied Biosystems, Framingham).

Die Quantifizierung der Ligationsausbeute erfolgte über eine durch den Vergleich der Peakintensität des bei der tryptischen Spaltung entstandenen Markerpeptids bei $[M+H]^+ = 1372,7$ Da mit der Peakintensität des zugesetzten isotopenmarkierten Referenzpeptids bei $[M+H]^+ = 1378,7$ Da. Aufgrund der bekannten Konzentration des eingesetzten Referenzpeptids kann so die absolute Menge an Markerpeptid in der Probe ermittelt werden. Da das Markerpeptid erst durch die Ligation des Substrats an die Matrix entsteht, konnte die bestimmte Menge mit der Menge an ligiertem Substrat an 40 µL Agarosematrix gleichgesetzt werden.

2.10.5 Optimierungsversuche zur Sortase A-vermittelten Ligation

In Optimierungsversuchen zur Sortase A-vermittelten Ligation wurden verschiedene Parameter systematisch optimiert, um optimale Ligationsausbeuten zu erzielen. Hierbei wurden gesondert die Substratkonzentration (75 µM, 150 µM, 300 µM), das Enzym-Substrat-Verhältnis (0,1 bis 10) sowie das Substrat-Nukleophil-Verhältnis (2, 6, 9) variiert.

Zunächst wurde das Nukleophil-Peptid mit der Sequenz GGGRGGVEGGC über Thiolkopplung (siehe Abschnitt 2.5.2) an die Agarosematrix immobilisiert. Für jeden Testansatz wurden anschließend 20 µL der Nukleophil-beladenen Agarosematrix eingesetzt. Nach viermaligem Waschen mit Ligationspuffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,2) erfolgte die Zugabe von Substratpeptid, Sortase A und 5 mM CaCl_2 in 50 µL Ligationspuffer. Als Substrat diente hierbei ein N-terminal dansyliertes Modellpeptid mit der Sequenz Dns-LPKTGGKRR. Nach Inkubation über Nacht (rotierend) wurde nicht ligiertes Substratpeptid durch viermaliges Waschen mit 50 mM NH_4HCO_3 entfernt. Anschließend wurde die Agarosematrix in *Ultrafree-MC* Zentrifugalfiltereinheiten (Millipore, Schwalbach) überführt und eine

tryptische *on-bead*-Spaltung angeschlossen (siehe Abschnitt 2.6.3). Die dadurch in den Überstand freigesetzte Dansylgruppe konnte anschließend zur Bestimmung der Ligationsausbeute verwendet werden, indem ihre spezifische UV-Absorption bei 331 nm mit Hilfe eines Zweistrahlphotometers (Jasco V-550, Jasco, Easton) detektiert wurde. Hierbei wurden Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke eingesetzt. Als Referenz diente eine Lösung mit 50 mM NH_4HCO_3 . Die ermittelten Werte stellten jeweils den Mittelwert aus zehn aufeinanderfolgenden Messungen dar. Die Berechnung der absoluten Dansylmenge und somit der Ligationsausbeute erfolgte durch Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes. Hierbei wurde für die Dansylgruppe ein Absorptionskoeffizient von $\epsilon = 4000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ verwendet [197, 198].

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur FYN-Kinase vermittelten ADAP-Phosphorylierung

Die Aktivierung von T-Zellen führt zur Aktivierung der Tyrosinkinase FYN und LCK, die daraufhin im Signalweg abwärts gelegene Proteine phosphorylieren (siehe Abschnitt 1.1.5). Für die zeitabhängige *in vitro*-Phosphorylierung von ADAP wurde die SRC-Familien-Kinase FYN eingesetzt, da ADAP sowohl Bindungspartner als auch Substrat von FYN ist [105, 106, 108, 125]. Zudem konnten Raab *et al.* zeigen, dass FYN (im Vergleich zu LCK und ZAP70) die wichtigste Kinase für die Phosphorylierung von ADAP darstellt [108].

Die rekombinante Expression der FYN-Kinase und ADAP erfolgte mit Hilfe eines Baculovirus-Expressionssystems in *SF21*-Insektenzellen, die im Vergleich zu *E. coli* über ein komplexeres System zur posttranslationalen Modifizierung und Proteinfaltung verfügen. Die Expression der FYN-Kinase wurde mittels SDS-PAGE (Abbildung 7A) und Western-Blot-Analyse (Abbildung 7B) bestätigt. Die Isolierung von FYN und ADAP erfolgte anschließend mittels Affinitätschromatographie über einen N-terminalen His-tag, gefolgt von einer Größenausschlusschromatographie. Beide Proteine konnten mit hoher Reinheit isoliert werden (Abbildung 7C).

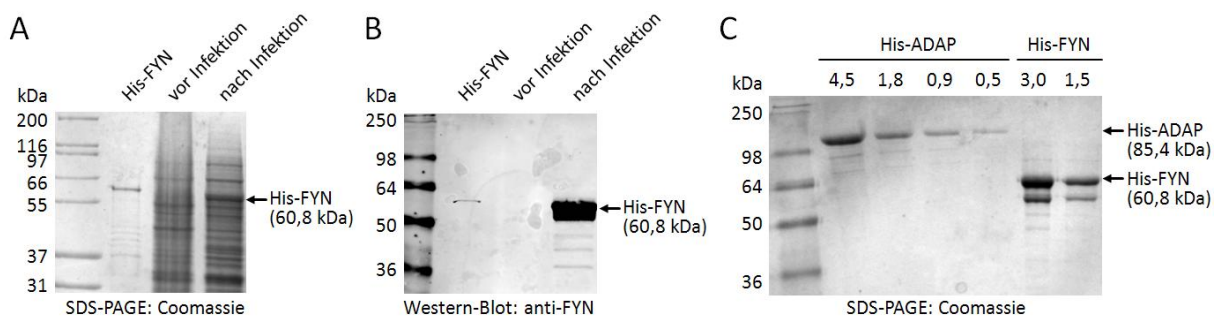


Abbildung 7: Präparation von FYN-Kinase und ADAP aus *SF21*-Insektenzellen. (A,B) Expressionstest der FYN-Kinase vor und 72 Stunden nach der Transduktion. Zur Kontrolle wurde isolierte FYN-Kinase in der ersten Spur aufgetragen. (A) SDS-PAGE (Coomassie). (B) Western-Blot-Analyse (anti-FYN). (C) Verschiedene Mengen der isolierten Proteine ADAP und FYN wurden mittels SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie angefärbt. Beide Proteine konnten in ausreichenden Mengen mit hoher Reinheit isoliert werden.

Die Ausbeuten aus jeweils 1 L *SF21*-Kultur betragen 7,2 mg ADAP und je nach Präparation 0,2-0,5 mg FYN-Kinase. Das isolierte ADAP lief im Gel höher als es seinem Molekulargewicht entspricht, weshalb es ursprünglich als SLAP-130 (*SLP76 associated phosphoprotein of 130 kDa*) bezeichnet wurde. Aufgrund von Löslichkeitsproblemen konnte die FYN-Kinase nicht auf Konzentrationen über 5 μ M konzentriert werden. Zudem waren zwei dominante Gelbanden im Bereich von 55-61 kDa erkennbar, wobei beide Banden mittels MS-Analyse eindeutig als FYN identifiziert wurden (Daten nicht

dargestellt). Das unterschiedliche Laufverhalten ist möglicherweise auf posttranslationale Modifizierungen zurückzuführen. So befinden sich vor allem im N-terminalen Bereich von FYN zahlreiche Methylierungen und Acylierungen, die für die Aktivität sowie die membranständige Lokalisation der Kinase wichtig sind [199, 200]. Zudem könnte die Membranassoziiierung der rekombinant exprimierten FYN-Kinase ursächlich für die geringe Ausbeute sein, da keine Detergenzien zur Isolierung membranständiger Proteine während des Zellaufschlusses eingesetzt wurden.

Für die zeitabhängige *in vitro*-Phosphorylierung von ADAP wurden 10 μ M ADAP mit 0,1 μ M FYN unter Zugabe von ATP für mehrere Tage inkubiert (Abbildung 8A). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels SDS-PAGE getrennt. Die Detektion der Tyrosin-Phosphorylierung erfolgte durch eine Western-Blot-Analyse mit einem gegen phosphoryliertes Tyrosin gerichteten Antikörper (Abbildung 8B). Hierbei zeigte sich ein deutliches Phosphorylierungssignal auf Höhe von ADAP bereits 30 Sekunden nach dem Inkubationsstart. Darüber hinaus war nur eine leichte Zunahme der Signalintensität innerhalb von 30 Minuten zu erkennen, was jedoch auf den begrenzten dynamischen Bereich der Detektionsmethode zurückzuführen ist. Auffällig war das Auftreten von Degradationsbanden von ADAP mit zunehmender Inkubationszeit. Ohne ATP-Zugabe konnte keine Tyrosinphosphorylierung von ADAP detektiert werden, wohingegen die rekombinant hergestellte FYN-Kinase bereits eine basale Phosphorylierung zeigte, die nach ATP-Zugabe (ohne ADAP) aufgrund von Autophosphorylierung weiter anstieg (Abbildung 8B).

In einer weiteren Versuchsreihe mit verschiedenen Inkubationszeiten erfolgte nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung eine in-Gel-Spaltung der ADAP-Bande separat mit den Enzymen Trypsin und Elastase. Anschließend wurden die Peptidgemische mittels LC-ESI-MS/MS analysiert. Die Abschätzung des Phosphorylierungsgrades erfolgte durch eine relative Quantifizierung der Signalintensitäten aller korrespondierenden Peptid/Phosphopeptid-Signale für die jeweilige Position unter Einbeziehung aller Ladungszustände [194, 195]. Hierbei konnte durch den Einsatz beider Enzyme eine fast vollständige Sequenzabdeckung von ADAP erreicht werden, wobei alle 16 Tyrosinreste identifiziert wurden (Abbildung 8C).

Für die Positionen Y04, Y559, Y561, Y701, Y709 und Y762 konnte innerhalb von vier Stunden keine nennenswerte Phosphorylierung durch FYN-Kinase detektiert werden. Die C-terminalen Positionen Y771 und Y780 zeigten starke Phosphorylierungssignale, konnten jedoch aufgrund einer starken Degradation des C-Terminus von ADAP nicht zuverlässig quantifiziert werden. Für die Positionen Y462, Y571, Y595, Y625 und Y651 konnte eine starke Zunahme des Phosphorylierungsgrades auf 80-99 % innerhalb von vier Stunden detektiert werden, während für die Position Y387 im gleichen Zeitraum eine Phosphorylierung bis etwa 40 % beobachtet wurde (Abbildung 8D). Unter den

ermittelten Phosphorylierungsstellen waren die bekannten SLP76-Bindungsmotive Y⁵⁹⁵DDV (Y595) und Y⁶⁵¹DDV (Y651) sowie die FYN-Bindungsstelle Y⁶²⁵DGI (Y625) [108, 110]. Für die Positionen Y⁵⁷¹DSL (Y571) und Y⁴⁶²EDI (Y462) waren bisher keine phosphorylierungsabhängigen Interaktionspartner bekannt, so dass diese im Folgenden für *Pulldown*-Experimente ausgewählt wurden. Die Position Y³⁸⁷STT wurde aufgrund der vergleichsweise geringen Phosphorylierung nicht weiter untersucht.

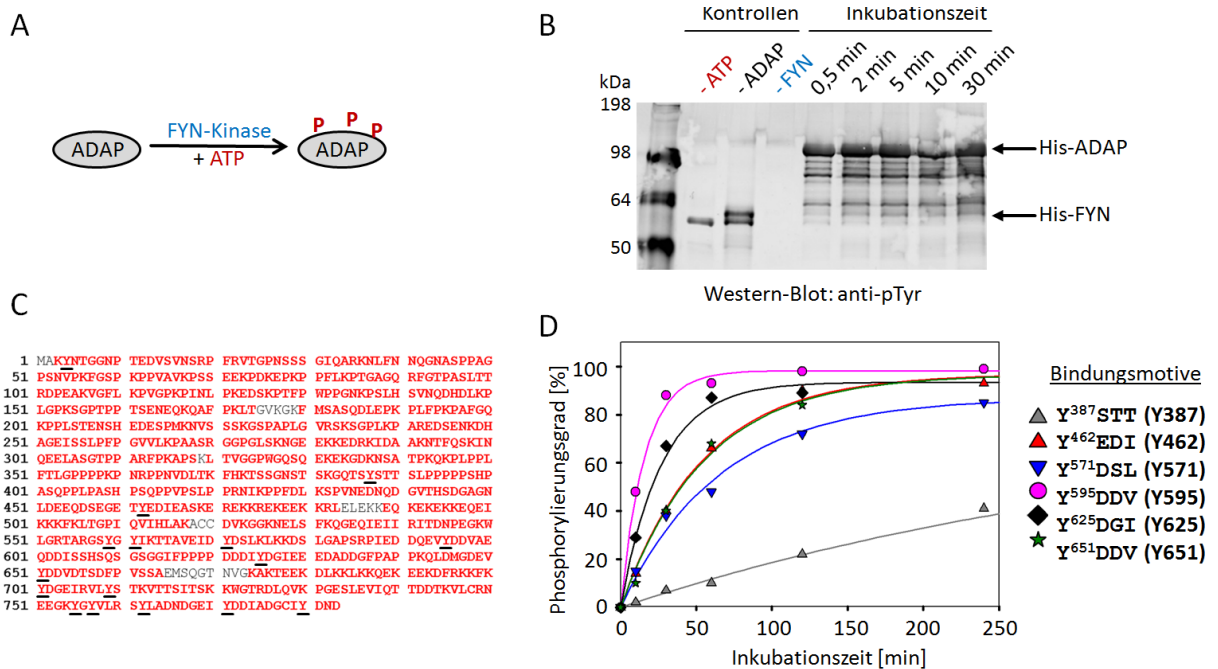


Abbildung 8: *In vitro*-Phosphorylierung von ADAP mit FYN-Kinase. (A) Schematische Darstellung der *in vitro*-Phosphorylierung von ADAP mit FYN-Kinase nach ATP-Zugabe. (B) Analyse der zeitabhängigen Tyrosin-Phosphorylierung von ADAP mittels Western-Blot (anti-Phosphotyrosin). Als Kontrollen dienten Ansätze ohne ATP (-ATP), ohne ADAP (-ADAP) und ohne FYN-Kinase (-FYN). (C) Massenspektrometrische Sequenzabdeckung von ADAP nach Spaltung mit Trypsin und Elastase. Rot markierte Sequenzen wurden durch Peptide abgedeckt. Tyrosinreste sind unterstrichen. (D) Relative Quantifizierung des Phosphorylierungsgrades einzelner Tyrosinreste von ADAP nach verschiedenen Inkubationszeiten mittels LC-ESI-MS/MS. Die Proben wurden vorher mittels SDS-PAGE getrennt und anschließend mit Trypsin und Elastase in-Gel gespalten.

3.2 Identifizierung phosphorylierungsabhängiger ADAP-Interaktionspartner

Zur Identifizierung phosphorylierungsabhängiger ADAP-Interaktionspartner wurden SILAC-basierte *Pulldown*-Experimente in Kombination mit quantitativer Massenspektrometrie durchgeführt [167, 171]. Hierbei dienten rekombinant hergestellte und *in vitro* mit FYN-Kinase phosphorylierte ADAP-Konstrukte sowie synthetische Peptidmotive der Positionen Y571 und Y462 als Köder (Abbildung 9A). Es wurde eine inverse Markierungsstrategie verfolgt, bei der die zu vergleichenden Köderstrukturen sowohl mit "leicht"- als auch mit "schwer"-markiertem Zellysat inkubiert wurden (Experimente A und B). Wie exemplarisch in Abbildung 9B dargestellt, erfolgte die Inkubation der unphosphorylierten Köderstruktur in Experiment A immer mit "leicht" markiertem Zellysat, wohingegen die

phosphorylierte Köderstruktur mit "schwerem" Zelllysate inkubiert wurde. In Experiment B erfolgte die Markierung invers. Die gebundenen Proteine wurden nach einigen Waschschritten vereinigt und mit SDS-Probenpuffer eluiert. Um die Komplexität der Probe zu reduzieren, erfolgte anschließend eine Trennung des Proteingemisches mittels SDS-PAGE. Nach tryptischer in-Gel-Spaltung wurden die Peptide mittels LC-ESI-MS/MS analysiert, wobei die Identifizierung und Quantifizierung der Proteine mit Hilfe der MaxQuant-Software erfolgte (siehe Abschnitt 2.8.3).

Die Auswertung der potentiellen Bindungspartner erfolgte durch die Gegenüberstellung der Anreicherungsfaktoren für jedes Protein aus den beiden unabhängigen *Pulldown*-Experimenten A und B. Proteine, die unspezifisch an das Trägermaterial binden bzw. deren Intensität durch Waschschriffe nicht unter die Detektionsgrenze reduziert werden kann, weisen Isotopenverhältnisse um den Wert eins auf (Abbildung 9B). Phosphorylierungsabhängige Binder hingegen hohe Isotopenverhältnisse für die phosphorylierte Köderstruktur und heben sich dadurch deutlich von der Verteilung um eins ab. Aufgrund der inversen Markierungsstrategie verhalten sich die Isotopenverhältnisse spezifischer Binder hierbei invers zueinander, was eine Unterscheidung von externen Kontaminationen wie Keratinen (immer "leicht") und möglichen Unterschieden der Zelllysate (immer "leicht" oder immer „schwer“) ermöglicht. Für eine Anreicherung wurde (sofern nicht anders angegeben) ein Isotopenverhältnis >2 in beiden Experimenten gefordert. Hierbei wurden nur Proteine als Kandidaten für phosphorylierungsspezifische Binder betrachtet, die mindestens mit zwei unterschiedlichen Peptiden identifiziert wurden und deren Quantifizierung auf mindestens zwei Peptidverhältnissen (*ratio count* ≥ 2) beruhte.

Der Anreicherungsfaktor bzw. das Isotopenverhältnis kann als grobes Maß für die Bindungsaffinität interpretiert werden, wobei zwischen Proteinen mit sehr hohen Anreicherungsfaktoren (etwa >10) keine Unterscheidungsmöglichkeit in Bezug auf die Bindungsaffinität möglich ist. Die Anzahl der Peptide, mit der ein Protein identifiziert und quantifiziert wurde, kann nach dem Anreicherungsfaktor als zusätzlicher Indikator für die Menge dieses Proteins in der Probe und somit für seine Bindungsaffinität angesehen werden. Proteine, die bei vergleichbarem Anreicherungsfaktor mit sehr vielen Peptiden gefunden wurden, sind daher mit höherer Wahrscheinlichkeit auch starke Binder. Hierbei ist zu beachten, dass im Gegensatz zum Anreicherungsfaktor die Anzahl der gefundenen Peptide vom Expressionslevel des Proteins abhängt. So können auch niedrigaffine Binder mit einer hohen Anzahl an Peptiden gefunden werden, obwohl sie einen geringen Anreicherungsfaktor haben. Zudem ist davon auszugehen, dass einige der ermittelten Kandidaten falsch positiv sind. Dies kann zum einen an den unphysiologisch hohen Mengen des eingesetzten Köders liegen. Zum anderen ist die Zellkompartimentierung in den eingesetzten Zelllysaten aufgehoben, so dass Interaktionen möglich sind, die unter physiologischen Bedingungen aufgrund einer unterschiedlichen zellulären Lokalisation nicht stattfinden. Ebenfalls denkbar ist die

Anreicherung von Proteinkomplexen, so dass eine Unterscheidung von primären und sekundären Bindungspartnern nicht ohne weiteres möglich ist. Die aus den *Pulldown*-Experimenten ermittelten potentiellen Interaktionspartner müssen daher im Hinblick auf ihre direkte Interaktion, ihre Bindungsaffinität sowie eine mögliche physiologische Relevanz hin untersucht werden.

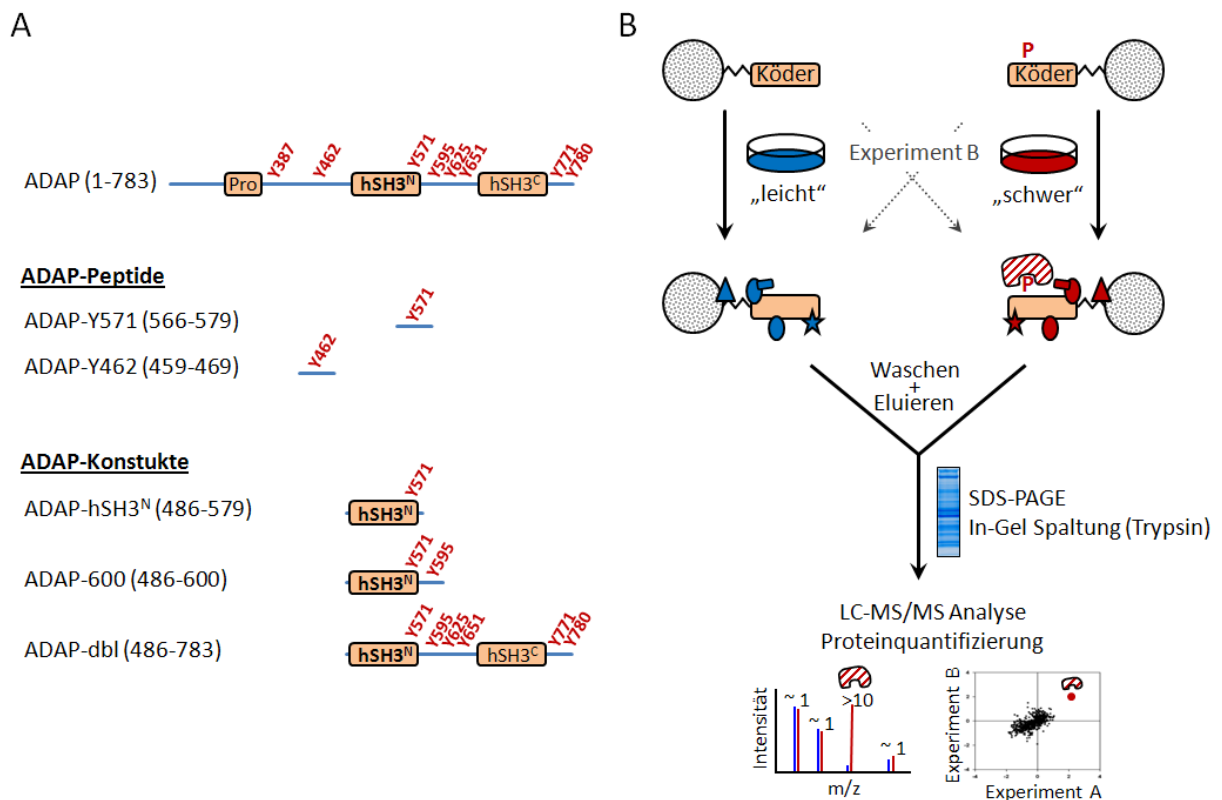


Abbildung 9: Eingesetzte ADAP-Peptide und ADAP-Konstrukte für SILAC-basierte *Pulldown*-Experimente. (A) Schematische Darstellung aller durch FYN-Kinase *in vitro* phosphorylierten Tyrosinreste in ADAP sowie der als Köder eingesetzten ADAP-Konstrukte (GST-Fusionsproteine) und Peptide. **(B)** Die Immobilisierung der Köderproteine (unphosphoryliert sowie phosphoryliert) erfolgte über ihren N-terminalen GST-tag an eine Glutathion-funktionalisierte Agarosematrix. Die Peptide wurden kovalent über Thiolkopplung oder Sortase A-vermittelte Ligation immobilisiert. Nach Inkubation mit den SILAC-markierten Zelllysaten („leicht“ und „schwer“) und einigen Waschschrritten wurden gebundene Proteine mit SDS-Probenpuffer eluiert und anschließend vereinigt. Daraufhin wurden die Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und in-Gel mit Trypsin gespalten. Die Identifizierung und Quantifizierung der Proteine erfolgte mittels LC-ESI-MS/MS. Jedes Experiment wurde als Replik mit inverser Markierung durchgeführt (A und B).

3.2.1 *Pulldown*-Experimente mit den Peptiden ADAP-Y571 und ADAP-Y462

Neben den bekannten Phosphorylierungsstellen konnte durch die *in vitro*-Phosphorylierung von ADAP mit FYN-Kinase eine starke Phosphorylierung der Tyrosinreste 571 und 462 nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.1), wobei eine Phosphorylierung an Y571 bereits in früheren Studien nach T-Zell-Stimulation nachgewiesen wurde [124, 146-151]. Da keine phosphorylierungsabhängigen Interaktionspartner bekannt waren, wurden beide Positionen für SILAC-basierte Peptid-*Pulldown*-Experimente mit Jurkat T-Zelllysaten ausgewählt. Die ebenfalls phosphorylierten Positionen Y595,

Y625 und Y771 waren nicht Gegenstand der Untersuchung, da sie bereits in früheren Peptid-*Pulldown*-Experimenten in der AG Krause untersucht wurden [143]. Die Immobilisierung der phosphorylierten und korrespondierenden unphosphorylierten Peptidsequenzen ADAP⁵⁶⁷⁻⁵⁷⁷ (ADAP-Y571) und ADAP⁴⁵⁹⁻⁴⁶⁹ (ADAP-Y462) erfolgte kovalent mit Hilfe der hier entwickelten Sortase A-vermittelten Ligation (siehe Abschnitt 2.10.1 und 3.5), wobei etwa 15 nmol der Peptide an jeweils 40 µL Agarosematrix immobilisiert werden konnten.

Für die Position ADAP-Y571 konnten 2840 Proteine in Experiment A und 2874 Proteine in Experiment B identifiziert und quantifiziert werden (Abbildung 10A), wobei eine Übereinstimmung von über 90 % (2670 Proteine) erzielt wurde. Für die Position ADAP-Y462 lag eine vergleichbare Übereinstimmung vor; die Anzahl der reproduzierbar quantifizierten Proteine fiel jedoch mit 2059 etwas geringer aus (Abbildung 10B). Die Gegenüberstellung der Isotopenverhältnisse aus Experiment A (x-Achse) und Experiment B (y-Achse) zeigt in beiden Experimenten zahlreiche Proteine mit Isotopenverhältnissen um den Wert eins. Hierbei handelt es sich um Proteine, die unabhängig von der Phosphorylierung unspezifisch an die Peptid-Agarosematrix gebunden wurden. Phosphorylierungsabhängige Interaktionspartner hingegen weisen in beiden Experimenten hohe Isotopenverhältnisse auf und sind somit im 1. Quadranten lokalisiert.

Als potentielle phosphorylierungsabhängige Binder (Isotopenverhältnisse >2) konnten für ADAP-Y571 die Adapterproteine CRK und CRKL sowie die Phospholipase PLCγ1 identifiziert werden (Abbildung 10A und Tabelle 4). Dieselben drei Kandidaten wurden durch den Einsatz einer alternativen Immobilisierungsmethode (Thiolkopplung, siehe Abschnitt 2.5.2) identifiziert (Daten nicht dargestellt). Für ADAP-Y462 zeigten die Phospholipasen PLCγ1 und PLCγ2 sowie die regulatorische Untereinheit der Phosphoinositid-3-Kinase (PIK3R1) eine spezifische Anreicherung an die phosphorylierte Peptidsequenz (Abbildung 10B und Tabelle 5).

Alle angereicherten Proteine verfügen über SH2 (*Src Homology 2*)-Domänen, die spezifisch Peptide mit phosphoryliertem Tyrosin erkennen [52], so dass sie als Kandidaten für eine direkte Interaktion in Frage kommen. Da der Tyrosinrest 571 Teil der strukturierten hSH3^N-Domäne von ADAP ist, konnte ein möglicher Einfluss der Domänenstruktur auf die Bindung mit dem hier durchgeführten Peptid-*Pulldown* nicht ausgeschlossen werden, so dass im Folgenden *Pulldown*-Experimente mit strukturierten ADAP-Domänen durchgeführt wurden.

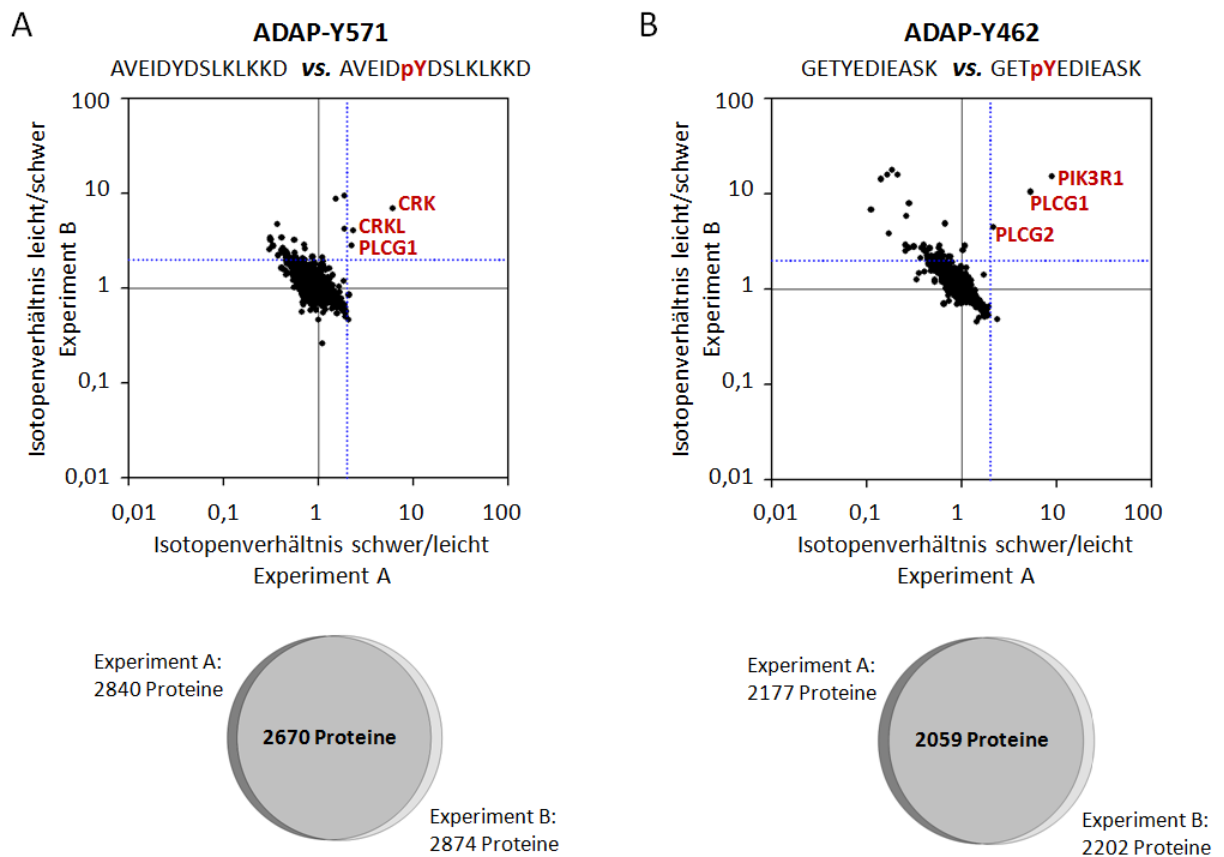


Abbildung 10: SILAC-basierte *Pulldown*-Experimente mit synthetischen ADAP-Peptiden. Gegenüberstellung der Isotopenverhältnisse aus zwei *Pulldown*-Experimenten A und B für die Peptidsequenzen ADAP⁵⁶⁷⁻⁵⁷⁷ (ADAP-Y571) (A) und ADAP⁴⁵⁹⁻⁴⁶⁹ (ADAP-Y462) (B). Rot markierte Proteine im 1. Quadranten waren reproduzierbar an das phosphorylierte Peptid angereichert mit einem Isotopenverhältnis >2 (blaue gestrichelte Linie). Die Venn-Diagramme zeigen die Schnittmenge der quantifizierten Proteine aus den Einzelerperimenten.

Tabelle 4: Phosphorylierungsabhängige Interaktionspartner von ADAP-Y571 aus Jurkat T-Zellen mit einem Isotopenverhältnis >2. Dargestellt sind die aus MaxQuant erhaltenen normalisierten Isotopenverhältnisse der Experimente A und B sowie die Anzahl quantifizierter Peptide.

Protein	Gen	UniProt	Verhältnis		Peptide	
			A	B	A	B
*Adapter molecule crk	CRK	P46108	6,0	7,0	20	22
*Crk-like protein	CRKL	P46109	2,3	3,8	17	15
*Phospholipase C-gamma-1	PLCG1	P19174	2,2	2,8	43	43

(* = Protein verfügt über SH2-Domäne)

Tabelle 5: Phosphorylierungsabhängige Interaktionspartner von ADAP-Y462 aus Jurkat T-Zellen mit einem Isotopenverhältnis >2. Dargestellt sind die aus MaxQuant erhaltenen normalisierten Isotopenverhältnisse der Experimente A und B sowie die Anzahl quantifizierter Peptide.

Protein	Gen	UniProt	Verhältnis		Peptide	
			A	B	A	B
*PI3-kinase regulatory subunit alpha	PIK3R1	P27986	9,0	13,7	83	76
*Phospholipase C-gamma-1	PLCG1	P19174	5,2	10,4	99	103
*Phospholipase C-gamma-2	PLCG2	P16885	2,1	3,7	16	10

(* = Protein verfügt über SH2-Domäne)

3.2.2 *Pulldown*-Experimente mit der ADAP-hSH3^N-Domäne

Der Tyrosinrest 571 ist Teil der N-terminalen helikal erweiterten SH3-Domäne (*helically extended SH3 domain*, hSH3^N) von ADAP, für die bisher, abgesehen von einer schwachen Lipidbindung, keine Bindungspartner bekannt waren [119]. Die randständige Lokalisation von Y571 im Übergang zu einem unstrukturierten Bereich sollte jedoch eine gute Zugänglichkeit für einen potentiellen phosphorylierungsabhängigen Interaktionspartner ermöglichen (Abbildung 14B, [191]). Es sollte daher überprüft werden, ob die Domänenstruktur die Interaktionen mit den aus dem Peptid-*Pulldown* ermittelten pY571-abhängigen Bindungspartnern (CRK, CRKL und PLC γ 1) beeinflusst.

Hierzu wurde die gesamte hSH3^N-Domäne als GST-Fusionsprotein rekombinant in *E. coli* hergestellt und anschließend *in vitro* mit FYN-Kinase phosphoryliert. Die Detektion der Tyrosin-Phosphorylierung erfolgte zunächst durch Western-Blot-Analyse mit einem gegen phosphoryliertes Tyrosin gerichteten Antikörper. Dabei konnte eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung der hSH3^N-Domäne innerhalb von zwei Stunden detektiert werden (Abbildung 11A). Eine LC-ESI-MS/MS-Analyse nach SDS-PAGE und tryptischer in-Gel-Spaltung bestätigte eine selektive Phosphorylierung an Y571 (Abbildung 11B), wohingegen die Positionen Y559 und Y561 keine nennenswerte Phosphorylierung zeigten. Da für die folgenden *Pulldown*-Experimente ein hoher Phosphorylierungsgrad ausschlaggebend war, wurden die Reaktionsbedingungen dahingehend optimiert. Mit Hilfe einer fünftägigen Inkubation und einem Enzym-Substrat-Verhältnis von etwa 1:50 konnte der Phosphorylierungsgrad von Y571 selektiv auf >70 % zu gesteigert werden (Abbildung 11C), während im Volle-Länge-ADAP hierfür nur wenige Stunden nötig waren. Die Abschätzung des Phosphorylierungsgrades erfolgte anhand der relativen Signalintensitäten des unphosphorylierten und phosphorylierten tryptischen Peptids ADAP⁵⁶⁴⁻⁵⁷⁵ aus dem extrahierten Ionenchromatogramm (Abbildung 11D). Während zu Beginn der Inkubation ausschließlich das unphosphorylierte Peptid vorlag, war mit zunehmender Inkubationszeit ein deutlicher Anstieg des phosphorylierten Peptidsignals zu beobachten. Die Gesamtintensität beider Signale blieb während der gesamten Inkubation konstant, was für eine hohe Stabilität der hSH3^N-Domäne spricht. Zusammenfassend konnten ausreichende Mengen an selektiv an Y571-phosphorylierter GST-hSH3^N-Domäne für die folgenden SILAC-basierten *Pulldown*-Experimente gewonnen werden.

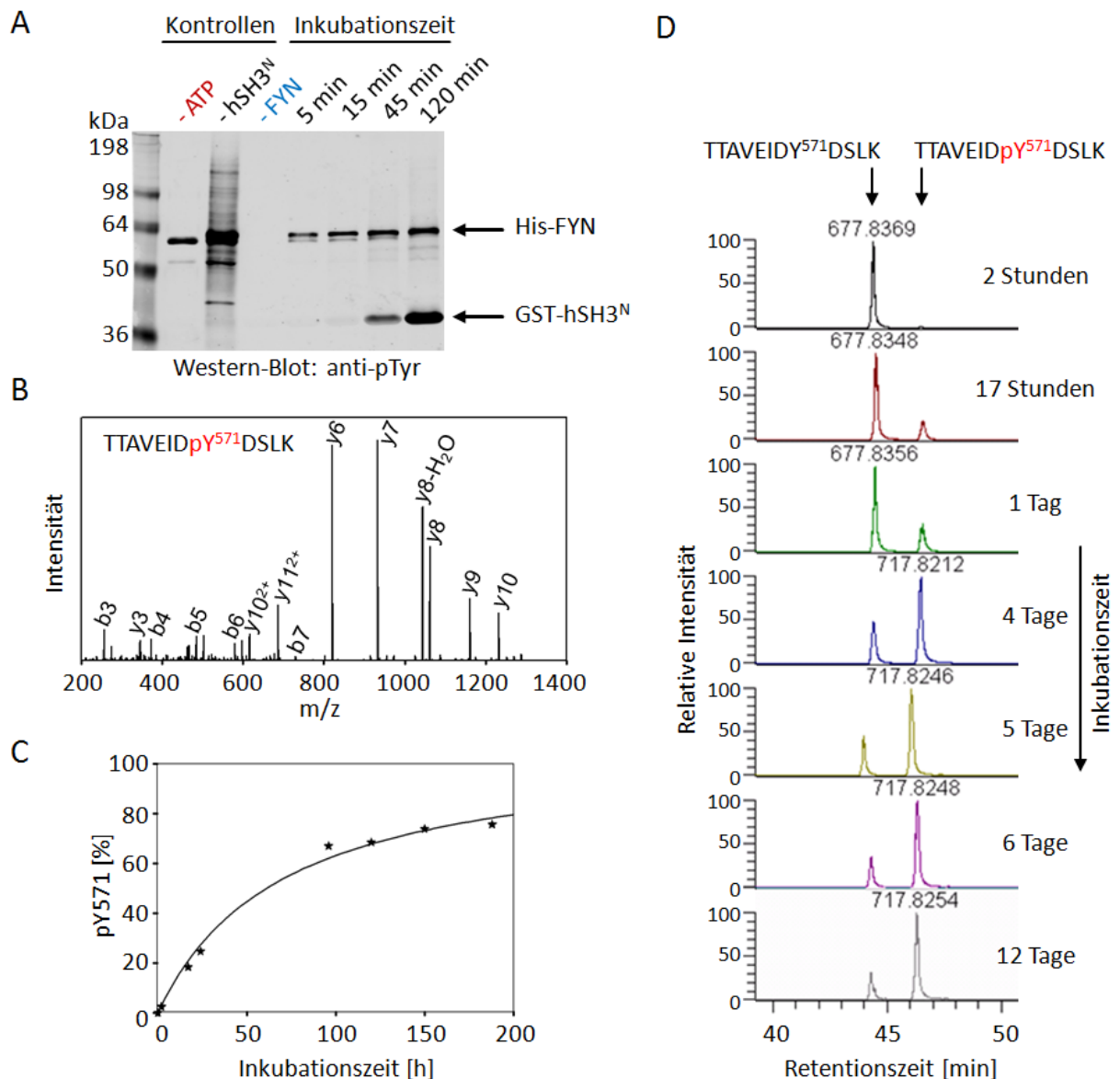


Abbildung 11: *In vitro*-Phosphorylierung von GST-hSH3^N mit FYN-Kinase. (A) Analyse der zeitabhängigen Tyrosin-Phosphorylierung von GST-hSH3^N nach SDS-PAGE mittels Western-Blot (anti-Phosphotyrosin). Als Kontrollen dienten Ansätze ohne ATP (-ATP), ohne GST-hSH3^N (-hSH3^N) und ohne FYN-Kinase (-FYN). (B) MS/MS-Spektrum des phosphorylierten Peptids ADAP⁵⁶⁴⁻⁵⁷⁵ nach tryptischer in-Gel-Spaltung. Die C-terminalen Fragmentationen y₃, y₆ und y₇ bestätigten eine Phosphorylierung an Y571. (C) Relative Quantifizierung des Phosphorylierungsgrades von Y571 nach verschiedenen Inkubationszeiten mittels LC-ESI-MS/MS. (D) Extrahierte Ionenchromatogramme des unphosphorylierten ([M+2H]²⁺=677,84 Da) und phosphorylierten ([M+2H]²⁺=717,83 Da) tryptischen Peptids ADAP⁵⁶⁴⁻⁵⁷⁵ nach verschiedenen Inkubationszeiten.

Die Immobilisierung der phosphorylierten und korrespondierenden unphosphorylierten GST-hSH3^N-Domäne erfolgte über die nicht-kovalente Interaktion des GST-tags mit einer Glutathion-funktionalisierten Agarose-Matrix. Die SILAC-basierten *Pulldown*-Experimente mit Jurkat T-Zelllysat erfolgten wie in Abschnitt 3.2 beschrieben. Hierbei wurden 1238 Proteine in Experiment A und 1099 Proteine in Experiment B identifiziert mit einer Übereinstimmung von 1002 Proteinen. Eine Gegenüberstellung der Isotopenverhältnisse dieser reproduzierbar quantifizierten Proteine ist in Abbildung 12A dargestellt. Hierbei zeigten die meisten Proteine eine unspezifische Bindung mit

Isotopenverhältnissen um den Wert eins. Als potentielle phosphorylierungsabhängige Binder konnten sechs Proteine mit Isotopenverhältnissen >3 für die phosphorylierte hSH3^N-Domäne identifiziert werden (Tabelle 6). Die stärksten Anreicherungen zeigten die Tyrosinkinase ZAP70, der GTP-Austauschfaktor SPATA13 sowie die Cyclin-abhängige Kinase CDK17. Diese drei Proteine sowie das leicht angereicherte Protein POM121C ließen sich im Gegensatz zu den ebenfalls angereicherten Proteinen MAPKAP1 und RICTOR auch in einem Wiederholungsexperiment bestätigen (Daten nicht dargestellt). Die Tyrosinkinase ZAP70 war in diesem Zusammenhang der wahrscheinlichste Kandidat für eine direkte Interaktion, da sie als einziges Protein über eine SH2-Domänen verfügt und darüber hinaus mit der höchsten Anzahl an Peptiden quantifiziert wurde.

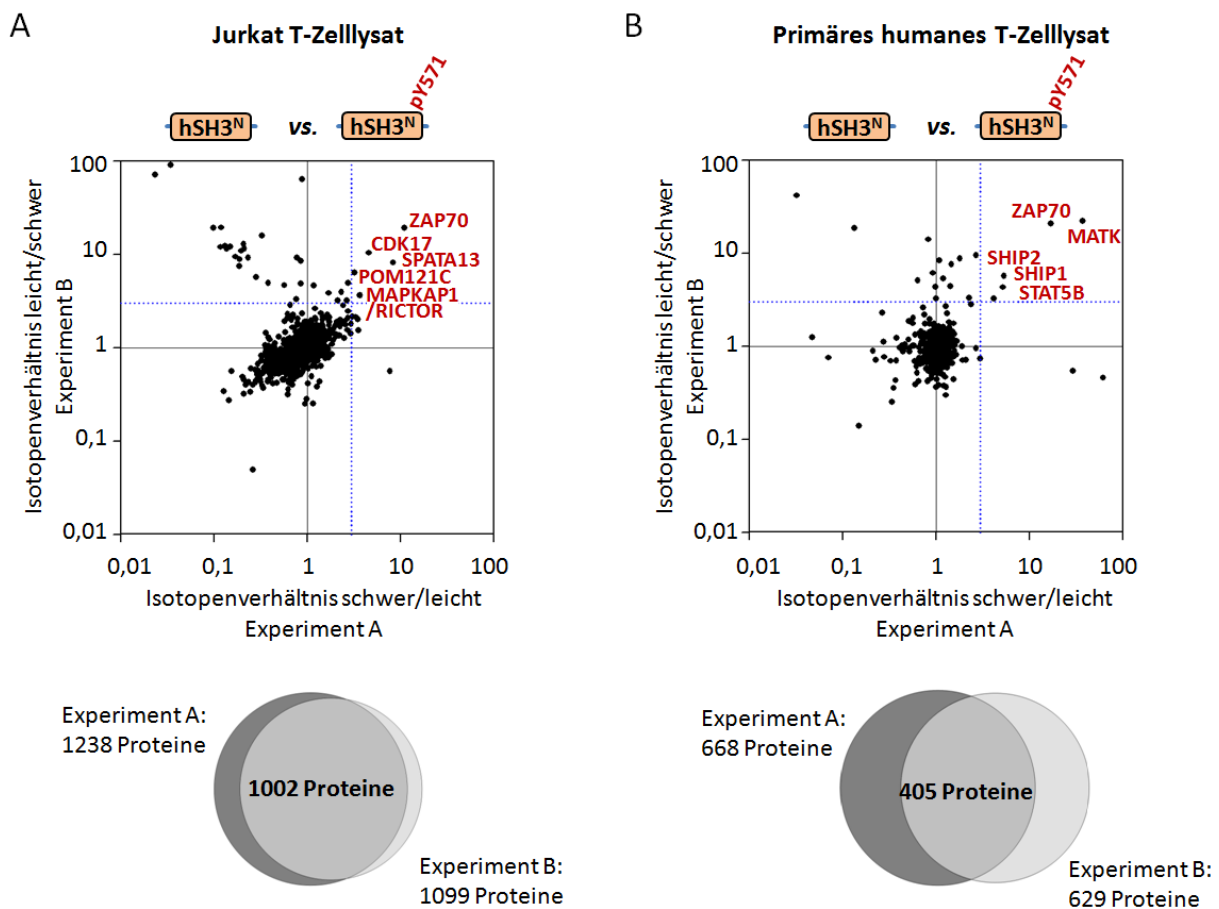


Abbildung 12: SILAC-basierte Pull-down-Experimente mit ADAP-hSH3^N. Gegenüberstellung der in ermittelten Isotopenverhältnisse aus Pull-down-Experimenten unter Verwendung von Jurkat T-Zelllysaten (**A**) und primären humanen T-Zelllysaten (**B**). Rot markierte Proteine im 1. Quadranten waren reproduzierbar an die Y571-phosphorylierte hSH3^N-Domäne angereichert mit Isotopenverhältnissen >3 (blaue gestrichelte Linie). Die Venn-Diagramme zeigen die Schnittmenge der quantifizierten Proteine aus den Einzelexperimenten.

Tabelle 6: Phosphorylierungsabhängige Interaktionspartner von ADAP-hSH3^N aus Jurkat T-Zellen mit Isotopenverhältnissen >3. Dargestellt sind die aus MaxQuant erhaltenen normalisierten Isotopenverhältnisse der Experimente A und B sowie die Anzahl quantifizierter Peptide.

Protein	Gen	UniProt	Verhältnis		Peptide	
			A	B	A	B
*Tyrosine-protein kinase ZAP-70	ZAP70	P43403	11,0	19,2	31	33
Spermatogenesis-associated protein 13	SPATA13	Q96N96	8,4	8,1	12	5
Cyclin-dependent kinase 17	CDK17	F5H6Z0	4,6	10,4	2	2
Target of rapamycin complex 2 subunit MAPKAP1	MAPKAP1	Q9BPZ7	3,7	3,6	3	3
Rapamycin-insensitive companion of mTOR	RICTOR	Q6R327	3,7	3,6	28	21
Pore membrane protein of 121 kDa C	POM121C	A8CG34	3,2	6,4	5	2

(* = Protein verfügt über SH2-Domäne)

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde das *Pulldown*-Experiment mit Zelllysat aus primären humanen T-Zellen wiederholt. Die primären T-Zellen wurden aus 200 mL humanem Vollblut isoliert (siehe Abschnitt 2.3.3). Da hier keine metabolische Markierung über das SILAC-Verfahren möglich war, erfolgte die Markierung mit Hilfe des ¹⁸O-Markierungsverfahren während der tryptischen in-Gel-Spaltung (siehe Abschnitte 2.5.5 und 2.6.2).

Insgesamt konnten in den beiden Einzelerperimenten 405 Proteine mit einer Übereinstimmung von etwa 60 % reproduzierbar quantifiziert werden (Abbildung 12B). Insgesamt zeigten fünf Proteine eine spezifische Anreicherung an die phosphorylierte hSH3^N-Domäne mit Isotopenverhältnissen >3 (Tabelle 7). Die stärksten Anreicherungen zeigten die Tyrosinkinase ZAP70 und SH2-Phosphatase SHIP2, wobei ZAP70 mit Abstand anhand der meisten Peptide quantifiziert wurde. Ebenfalls angereichert waren die Lipidphosphatasen SHIP 1 und SHIP2 sowie der Transkriptionsfaktor STAT5B. Da alle angereicherten Proteine über SH2-Domänen verfügen, kommen sie als primäre Bindungspartner in Frage.

Tabelle 7: Phosphorylierungsabhängige Interaktionspartner von ADAP-hSH3^N aus primären humanen T-Zellen mit Isotopenverhältnissen >3. Dargestellt sind die normalisierten Isotopenverhältnisse der Experimente A und B, wobei die Normalisierung auf den Median aller Isotopenverhältnisse erfolgte. Die Anzahl der quantifizierten Peptide wurde aus dem Mascot Distiller übernommen.

Protein	Gen	UniProt	Verhältnis		Peptide	
			A	B	A	B
*Megakaryocyte-associated tyrosine kinase	MATK	K7EQY5	37,0	22,1	10	6
*Tyrosine-protein kinase ZAP-70	ZAP70	P43403	16,9	20,7	62	73
* SH2-containing inositol phosphatase 2	SHIP2	O15357	5,3	5,7	4	5
* SH2-containing inositol phosphatase 1	SHIP1	Q92835	5,2	4,3	53	58
*Signal transducer and activator of transcription 5B	STAT5B	P51692	4,2	3,3	9	7

(* = Protein verfügt über SH2-Domäne)

Zusammenfassend konnte die Tyrosinkinase ZAP70 als potentieller pY571-abhängiger Bindungspartner der hSH3^N-Domäne auch in primären T-Zellen bestätigt werden. Als Nächstes erfolgten weitere *Pulldown*-Experimente mit längeren ADAP-Konstrukten, deren Ergebnisse im folgenden Abschnitt dargestellt sind.

3.2.3 *Pulldown*-Experimente mit ADAP-600 und ADAP-dbl

Um die Bindung von ZAP70 auch im Kontext längerer ADAP-Konstrukte zu bestätigen, erfolgten analog zu den SILAC-basierten *Pulldown*-Experimenten mit ADAP-hSH3^N zwei weitere Experimente mit den GST-Fusionsproteinen ADAP-600 und ADAP-dbl (siehe Abbildung 9). Das ADAP-600-Konstrukt ist ausgehend von der hSH3^N-Domäne bis zu der Aminosäureposition 600 verlängert und enthält neben Y571 das bekannte SLP76- und NCK-Bindungsmotiv Y⁵⁹⁵DDV [93, 108, 110]. Das ADAP-dbl-Konstrukt enthält ausgehend von der hSH3^N-Domäne den gesamten C-terminalen Bereich von ADAP einschließlich der C-terminalen hSH3-Domäne (hSH3^C). Die FYN-katalysierte *in vitro*-Phosphorylierung beider Konstrukte wurde ebenfalls mittels LC-ESI-MS/MS bestätigt und betrug mindestens 70 % für die Tyrosinreste 571, 595, 625, 651, 771 und 780.

Mit dem Konstrukt ADAP-600 konnten 999 Proteine reproduzierbar identifiziert und quantifiziert werden (Abbildung 13A), wobei die Übereinstimmung der beiden Einzelerperimente bei >90 % lag. Insgesamt zeigten acht Proteine eine Anreicherung (Anreicherungsfaktoren >3) an das Y571- und Y595-phosphorylierte ADAP-600-Konstrukt, von denen fünf über eine SH2-Domäne verfügen und somit als Kandidaten für eine direkte Interaktion in Frage kommen (Tabelle 8). Hierunter befand sich die Tyrosinkinase ZAP70, deren Bindung somit auch im Kontext des hier eingesetzten längeren Konstrukts bestätigt werden konnte. Darüber hinaus wurden die Adapterproteine SLP76 und NCK, die Phospholipase PLC γ 1 sowie der GTP-Austauschfaktor VAV angereichert. Die ebenfalls angereicherten Proteine CUL5, MAD2L1 und TCEB2 verfügen über keine SH2-Domäne und sollten daher nicht als primäre Bindungspartner in Frage kommen.

Mit dem Konstrukt ADAP-dbl wurden 2276 Proteine reproduzierbar quantifiziert (Abbildung 13B), wobei die Übereinstimmung bei >85 % lag. Experiment A zeigte eine sehr breite Streuung um eins, weshalb das geforderte Isotopenverhältnis für eine phosphorylierungsabhängige Anreicherung auf >3,5 festgelegt wurde. In Experiment B war die Streuung geringer, so dass hier ein Isotopenverhältnis von >2 gefordert wurde. Mit diesen Kriterien zeigten 31 Proteine eine phosphorylierungsabhängige Anreicherung, von denen acht über eine SH2-Domäne verfügen (Tabelle 9). Unter ihnen konnten die bereits mit den kürzeren Konstrukten angereicherten Proteine ZAP70, SLP76 und VAV3 bestätigt werden. Zusätzlich wurden die Adapterproteine GADS, CRKL und SLA angereichert sowie die Tyrosinkinase LCK und der Transkriptionsfaktor STAT1.

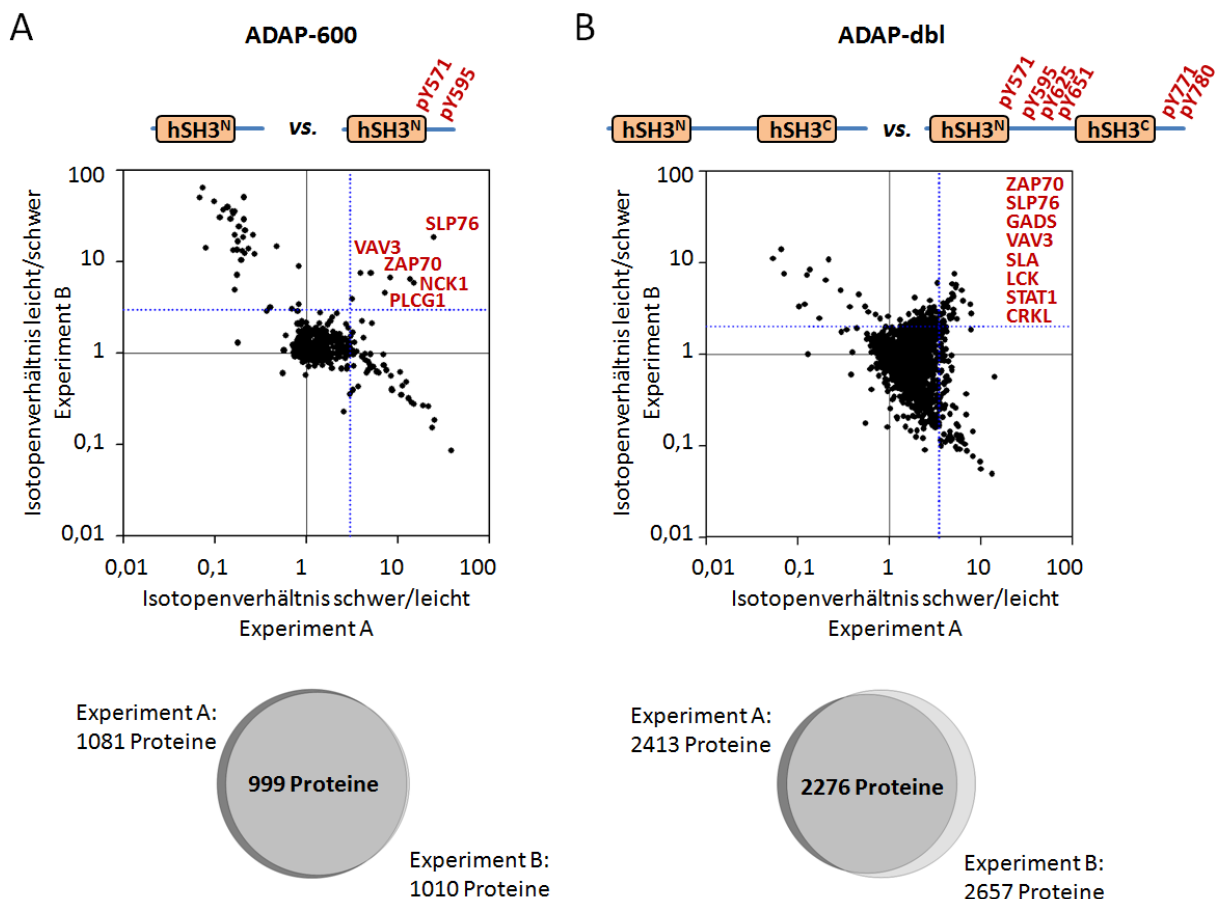


Abbildung 13: SILAC-basierte Pull-down-Experimente mit ADAP-600 und ADAP-dbl. Gegenüberstellung der Isotopenverhältnisse aus zwei unabhängigen Pull-down-Experimenten A und B. **(A)** Rot markierte Proteine im 1. Quadranten zeigten eine reproduzierbare Anreicherung an das phosphorylierte ADAP-600-Konstrukt mit einem Isotopenverhältnis >3 (blaue gestrichelte Linie). **(B)** Rot markierte Proteine im 1. Quadranten zeigten eine reproduzierbare Anreicherung an das phosphorylierte ADAP-dbl-Konstrukt mit einem Isotopenverhältnis $>3,5$ in Experiment A und >2 in Experiment B (blaue gestrichelte Linie). Angereicherte Proteine, die über eine SH2-Domäne verfügen, sind rot dargestellt. Alle angereicherten Proteine sind in Tabelle 8 und Tabelle 9 aufgelistet. Die Venn-Diagramme zeigen die Schnittmenge der aus den Einzelexperimenten quantifizierten Proteine.

Tabelle 8: Phosphorylierungsabhängige Interaktionspartner von ADAP-600 aus Jurkat T-Zellen mit Isotopenverhältnissen >3 . Dargestellt sind die normalisierten Isotopenverhältnisse (MaxQuant) der Experimente A und B sowie die Anzahl quantifizierter Peptide.

Protein	Gen	UniProt	Verhältnis		Peptide	
			A	B	A	B
*SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa	SLP76	Q13094	24,6	18,5	8	11
*Cytoplasmic protein NCK1	NCK1	P16333	15,0	5,8	2	15
Cullin-5	CUL5	Q93034	13,5	6,4	7	3
*Tyrosine-protein kinase ZAP-70	ZAP70	P43403	8,2	6,7	6	7
*Phospholipase C-gamma-1	PLCG1	P19174	7,2	4,6	5	4
Mitotic spindle assembly checkpoint protein	MAD2L1	Q13257	5,1	7,5	6	7
*Guanine nucleotide exchange factor VAV3	VAV3	Q9UKW4	3,9	7,5	4	3
Transcription elongation factor B polypeptide 2	TCEB2	B8ZZU8	3,2	3,9	2	2

(* = Protein verfügt über SH2-Domäne)

Tabelle 9: Phosphorylierungsabhängige Interaktionspartner von ADAP-dbl aus Jurkat T-Zellen mit Isotopenverhältnissen >3,5 (Experiment A) und >2 (Experiment B). Dargestellt sind die normalisierten Isotopenverhältnisse (MaxQuant) der Experimente A und B sowie die Anzahl quantifizierter Peptide.

Protein	Gen	UniProt	Verhältnis		Peptide	
			A	B	A	B
*GRB2-related adapter protein 2	GRAP2 /GADS	O75791	7,9	2,8	3	8
Protein FAM161A	FAM161A	Q3B820	7,7	3,5	5	7
Dual specificity YAK1-related kinase	DYRK1A	Q13627	6,4	3,8	7	14
Protein ECT2	ECT2	Q9H8V3	6,2	4,9	49	47
Serpin H1	SERPINH1	P50454	5,5	2,4	5	10
Rho GTPase-activating protein 11A	ARHGAP11A	Q6P4F7	5,4	5,7	27	25
Centrosomal protein of 170 kDa	CEP170	Q5SW79	5,3	5,3	89	167
Spermatogenesis-associated protein 13	SPATA13	Q96N96	5,2	7,5	26	21
Estrogen receptor-binding protein	DNTTIP2	Q5QJE6	5,1	4,3	23	24
*Tyrosine-protein kinase Lck	LCK	P06239	5,0	2,8	35	31
MORF4 family-associated protein 1	MRFAP1	Q9Y605	5,0	3,1	3	2
*Tyrosine-protein kinase ZAP-70	ZAP70	P43403	4,9	2,5	18	24
Microtubule-associated ser/thr-protein kinase 3	MAST3	O60307	4,9	5,8	74	83
Rho GTPase-activating protein 21	ARHGAP21	Q5T5U3	4,9	4,6	9	12
*Crk-like protein	CRKL	P46109	4,8	4,0	15	21
*Signal transducer and activator of transcription 1	STAT1	P42224	4,7	2,4	25	33
RB1-inducible coiled-coil protein 1	RB1CC1	Q8TDY2	4,6	2,6	7	12
NADH dehydrogenase iron-sulfur protein 5	NDUFS5	O43920	4,5	2,6	5	4
Integrator complex subunit 6	INTS6	Q9UL03	4,4	3,8	33	42
*Src-like-adapter	SLA	Q13239	4,4	3,2	5	11
PI3-kinase subunit beta	PIK3CB	P42338	4,3	3,3	2	3
Pre-B-cell leukemia TF-interacting protein 1	PBXIP1	B4E1J0	4,2	3,4	6	7
Protein DGCR14	DGCR14	Q96DF8	4,0	3,3	5	8
NADH-ubiquinone oxidoreductase B14 subunit	NDUFA6	P56556	4,0	2,2	8	11
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B	P06576	3,9	2,8	70	70
Nuclear pore complex protein Nup93	NUP93	Q8N1F7	3,9	2,3	71	64
Eukaryotic translation initiation factor 4E transporter	EIF4ENIF1	Q9NRA8	3,9	3,6	9	6
Rapamycin-insensitive companion of mTOR	RICTOR	Q6R327	3,9	3,2	106	149
*SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa	SLP76	Q13094	3,8	2,2	4	7
Pleckstrin homology-like domain family B member 3	PHLDB3	Q6NSJ2	3,7	2,7	10	11
*Guanine nucleotide exchange factor VAV3	VAV3	Q9UKW4	3,6	2,7	13	20

(* = Protein verfügt über SH2-Domäne)

Zusammenfassend konnte die Anreicherung von ZAP70 an die Y571-phosphorylierte hSH3^N-Domäne auch im Kontext der längeren ADAP-Konstrukte ADAP-600 und ADAP-dbl bestätigt werden. Zur Validierung einer direkten Interaktion der beiden Proteine wurden biophysikalische Untersuchungen durchgeführt, die im folgenden Abschnitt beschrieben sind.

3.3 Biophysikalische Charakterisierung der ADAP-ZAP70-Interaktion

3.3.1 Strukturelle Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie

Es sollte untersucht werden, ob ZAP70 eine direkte Interaktion mit der phosphorylierten hSH3^N-Domäne von ADAP eingeht, wobei auch ein möglicher Einfluss der Y571-Phosphorylierung auf die Struktur der hSH3^N-Domäne untersucht werden sollte. Für beide Fragestellungen eignete sich die Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie), da diese Veränderungen in der chemischen Umgebung einzelner Atome sehr präzise detektiert und so Aufschluss über strukturelle Veränderungen und Bindungsereignisse geben kann. Eine Analyse der Bindungsstärke zwischen ADAP und ZAP70 erfolgte über die Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D) mit Hilfe der *Microscale Thermophoresis* (MST).

Zur Analyse der direkten Interaktion zwischen phosphorylierter ADAP-hSH3^N-Domäne (hSH3^N) und der TandemSH2-Domäne von ZAP70 (ZAP70-tSH2) mittels NMR wurden beide Konstrukte als His-Fusionsproteine sowohl unmarkiert als auch ¹⁵N-markiert in *E. coli* hergestellt (siehe Abschnitt 2.3.4). Das ZAP70-tSH2-Konstrukt beinhaltet die beiden SH2-Domänen von ZAP70, die über die 50 Aminosäure lange Interdomäne A miteinander verbunden sind. Die *in vitro*-Phosphorylierung von hSH3^N mit FYN-Kinase (siehe Abschnitt 2.4.5) führte zu einer selektiven Phosphorylierung an Y571, wobei der Phosphorylierungsgrad massenspektrometrisch auf >85 % bestimmt wurde.

Zunächst wurden ¹H¹⁵N-HSQC-Spektren der unphosphorylierten sowie der phosphorylierten ¹⁵N-hSH3^N-Domäne aufgezeichnet. Eine Überlagerung der beiden Zustände ist in Abbildung 14A dargestellt, wobei eine Zuordnung der einzelnen NH-Resonanzen mit Hilfe der publizierten Signalzuordnungen erfolgte [191]. Insgesamt lag eine hohe Übereinstimmung der beiden Spektren vor. Unterschiede der chemischen Verschiebung traten vor allem bei Resten auf, die sich in sequenzieller (I569, D570, S573, L574) oder räumlicher (L515, A516 und W550) Nähe zum phosphorylierten Tyrosinrest 571 befanden (Abbildung 14B). In Abbildung 8C sind die Differenzen der chemischen Verschiebungen aller eindeutig zugeordneten Signale dargestellt. Hierbei konnten signifikante Unterschiede für die Reste L515, A516, W550, S573 und L574 bestätigt werden. Die Reste I569, D570 und Y571 sind trotz ihrer eindeutigen Beeinflussung hier nicht dargestellt, da keine eindeutige Zuordnung der Signale im Spektrum der phosphorylierten Domäne möglich war.

Im Ergebnis sprechen die lokalen Unterschiede der chemischen Verschiebung in der Nähe des phosphorylierten Y571 gegen größere phosphorylierungsabhängige Strukturveränderungen der hSH3^N-Domäne. Eine Bindung von ZAP70, die auf einer durch die Phosphorylierung induzierten Strukturveränderung beruht, ist daher nicht wahrscheinlich.

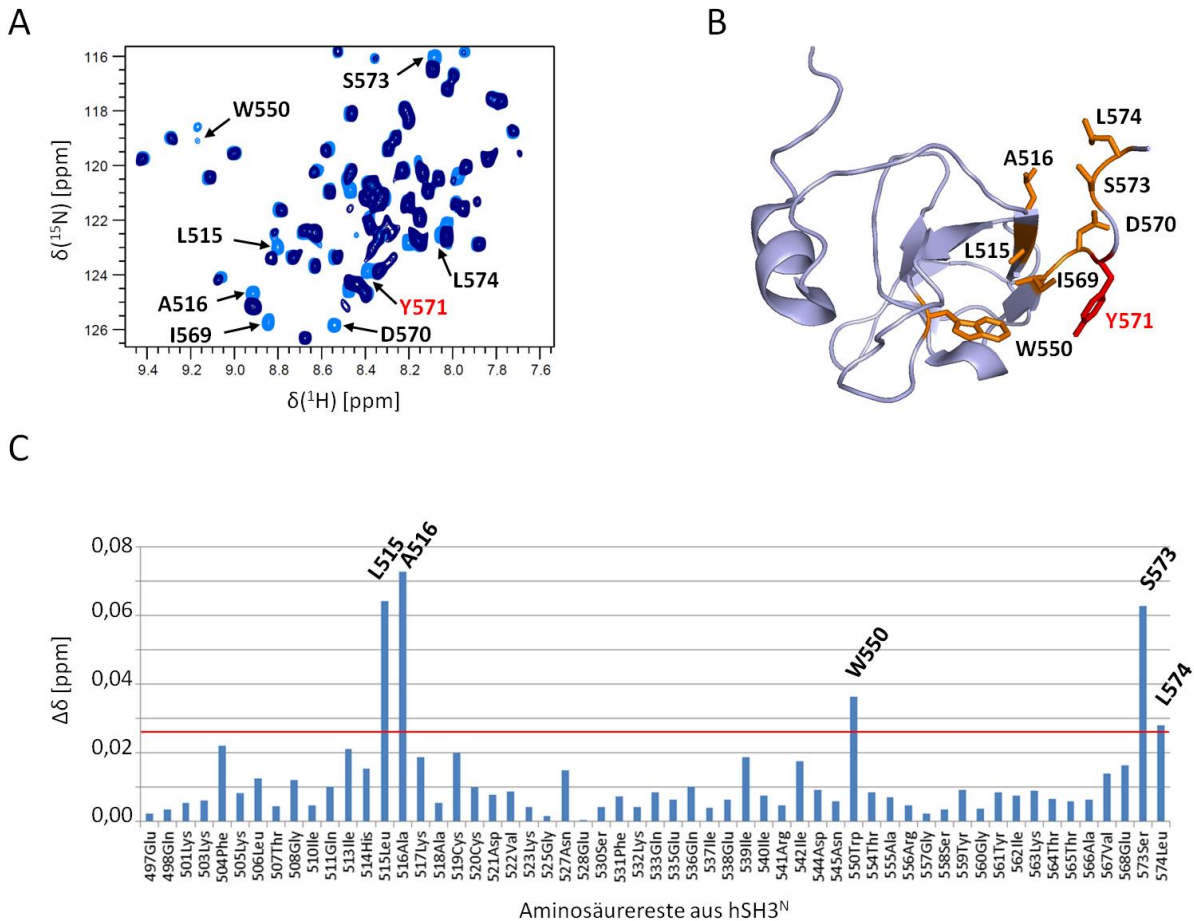


Abbildung 14: NMR-Untersuchung der Y571-phosphorylierten ADAP-hSH3^N-Domäne. (A) Überlagerung von ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrenausschnitten der unphosphorylierten (hellblau) und phosphorylierten hSH3^N-Domäne (dunkelblau). Beeinflusste Resonanzen sind gekennzeichnet. (B) Darstellung der beeinflussten Resonanzen (orange) im Kontext der dreidimensionalen Struktur der hSH3^N-Domäne (PDB ID: 2GTJ). Veränderungen traten vor allem in der Nähe des phosphorylierten Tyrosinrestes 571 (rot) auf. (C) Differenz der chemischen Verschiebung (unphosphoryliert versus phosphoryliert) für alle eindeutig zugeordneten Signale. Die Positionen L515, A516, W550, S573 und L574 zeigten signifikante Verschiebungen von >0,027 ppm (rote Linie).

Daraufhin sollte untersucht werden, ob es sich bei der Interaktion der Y571-phosphorylierten hSH3^N-Domäne mit ZAP70-tSH2 um eine direkte Interaktion handelt. Hierfür wurden ¹H¹⁵N-HSQC-Spektren der unphosphorylierten sowie der phosphorylierten ¹⁵N-hSH3^N-Domäne jeweils vor und nach Zugabe äquimolarer Mengen von ZAP70-tSH2 aufgezeichnet (Abbildung 15).

Bei der phosphorylierten hSH3^N-Domäne zeigte sich eine durchschnittliche Reduktion aller Signalintensitäten um etwa die Hälfte, was auf eine Komplexbildung hindeutete (Abbildung 15A und C). Abgesehen von dieser allgemeinen Linienverbreiterung kam es darüber hinaus zu einem signifikanten Intensitätsverlust der Resonanzen L515, A516, S573 und L574. Dies kann bei Bindungsereignissen auftreten, wenn sich die Austauschraten zwischen gebundenem und nicht gebundenem Zustand in einem mittleren Bereich (bezogen auf die NMR-Zeitskala) befinden. Da dieselben Reste von hSH3^N ebenfalls durch die Phosphorylierung signifikant beeinflusst waren (Abbildung 14A), sprechen die Beobachtungen für eine Beteiligung dieser Reste am Bindungssepitop

auf Seiten der hSH3^N-Domäne. Im Kontrollexperiment mit unphosphorylierter hSH3^N-Domäne zeigten sich nach Zugabe von ZAP70-tSH2 keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 15B und D).

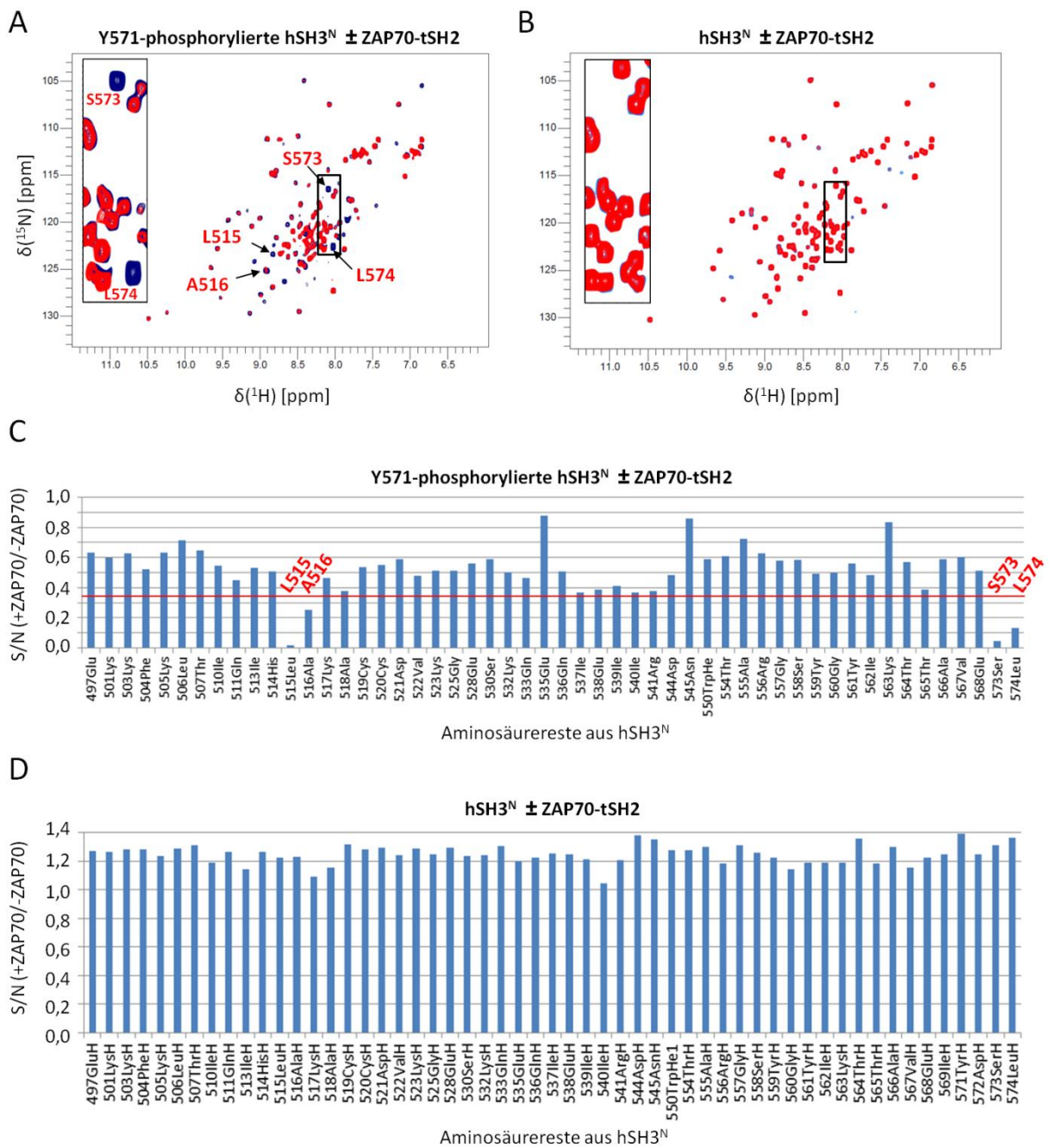


Abbildung 15: NMR-Untersuchung der ADAP-hSH3^N-Domäne nach Zugabe von ZAP70-tSH2. Überlagerung von ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren der phosphorylierten (**A**) sowie unphosphorylierten (**B**) hSH3^N-Domäne jeweils vor Zugabe (blau) und nach Zugabe (rot) von äquimolaren Mengen ZAP70-tSH2. Resonanzen mit einer signifikanten Beeinflussung der chemischen Verschiebung (L515, A516, S573, L574) sind gekennzeichnet. Der umrandete Bereich ist vergrößert dargestellt (oben links). (**C,D**) Unterschiede (Quotient) der Signal-Rausch-Verhältnisse (*signal-to-noise ratios*, S/N) vor und nach Zugabe von ZAP70-tSH2 aller zugeordneten Resonanzen der phosphorylierten (**C**) und unphosphorylierten (**D**) hSH3^N-Domäne. Signifikant veränderte Resonanzen (rote Linie) sind rot gekennzeichnet.

Als Nächstes sollte in einem komplementären Experiment ermittelt werden, welche der beiden SH2-Domänen von ZAP70 für die Bindung verantwortlich ist. Dazu wurden $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von ^{15}N -markierter ZAP70-tSH2 jeweils vor und nach Zugabe phosphorylierter hSH3^N-Domäne aufgezeichnet (Abbildung 16A und C).

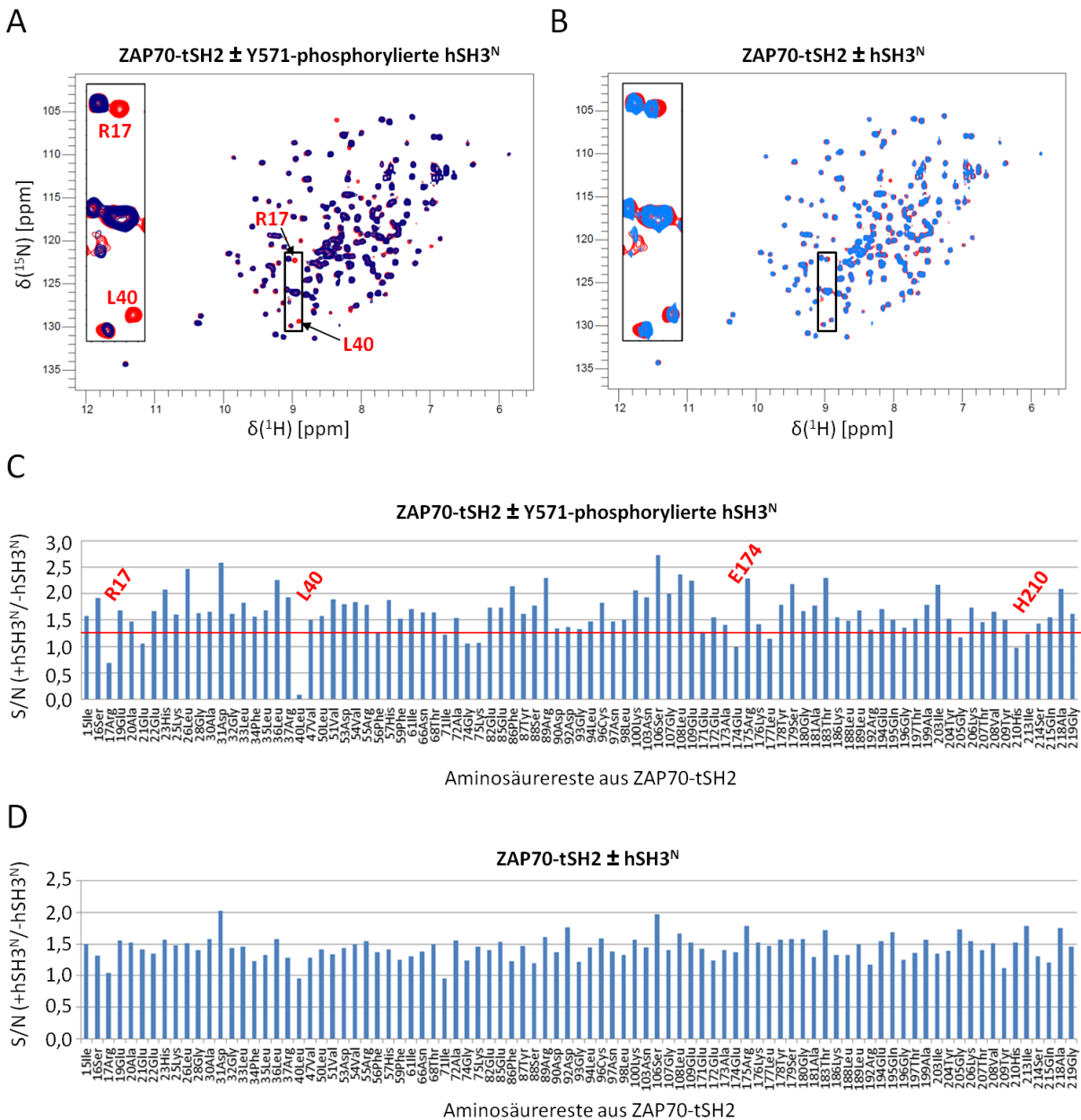


Abbildung 16: NMR-Untersuchung von ZAP0-tSH2 nach Zugabe der ADAP-hSH3^N-Domäne. (A) Überlagerung von $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von ZAP0-tSH2 vor Zugabe (rot) und nach Zugabe (dunkelblau) phosphorylierter ADAP-hSH3^N-Domäne. **(B)** Überlagerung von $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von ZAP0-tSH2 vor Zugabe (rot) und nach Zugabe (hellblau) unphosphorylierter ADAP-hSH3^N-Domäne. Die am stärksten beeinflussten Resonanzen (R17 und L40) sind gekennzeichnet. Der umrandete Bereich ist vergrößert dargestellt (oben links). **(C,D)** Unterschiede (Quotient) der Signal-Rausch-Verhältnisse (S/N) vor und nach Zugabe phosphorylierter **(C)** und unphosphorylierter **(D)** ADAP-hSH3^N-Domäne für alle zugeordneten Resonanzen. Die am stärksten veränderten Resonanzen sind rot gekennzeichnet.

Insgesamt zeigten die Spektren eine hohe Übereinstimmung, was gegen größere strukturelle Veränderungen von ZAP70-tSH2 aufgrund der Ligandenbindung spricht. Auffällig war jedoch ein sehr starker Intensitätsverlust der Resonanzen R17 und L40, die sich beide in der N-terminalen SH2-Domäne (N-SH2) von ZAP70 befinden. Einige weitere Reste (z.B. E174 und H210 aus der C-terminalen SH2-Domäne) waren ebenfalls signifikant beeinflusst, wenngleich in einem deutlich geringeren Ausmaß. Bei Zugabe von unphosphorylierter hSH3^N-Domäne im Kontrollexperiment konnte keine entsprechende Beeinflussung des Spektrums von ZAP70-tSH2 (Abbildung 16B und D) beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte durch den Einsatz der NMR-Spektroskopie eine direkte Bindung der Y571-phosphorylierten ADAP-hSH3^N-Domäne an die ZAP70-tSH2-Domäne bestätigt werden, wobei keine größeren strukturellen Veränderungen beider Konstrukte beobachtet wurden. Das Bindungsepitop auf Seiten der hSH3^N-Domäne konzentrierte sich auf das phosphorylierte Y571 und direkt benachbarte Reste (Abbildung 17A), wohingegen auf Seiten der ZAP70-tSH2-Domäne eine Bindung der N-terminalen SH2-Domäne unter Beteiligung der Aminosäurereste R17 und L40 am wahrscheinlichsten war (Abbildung 17B). Interessanterweise konnten Folmer *et al.* dieselben Änderungen im Spektrum von ZAP70-tSH2 bei der Zugabe von einfach phosphorylierten Tetrapeptiden (pYNEL oder pYDVL) des ersten ITAM-Motivs (ITAM1) der ζ -Kette nachweisen [35].

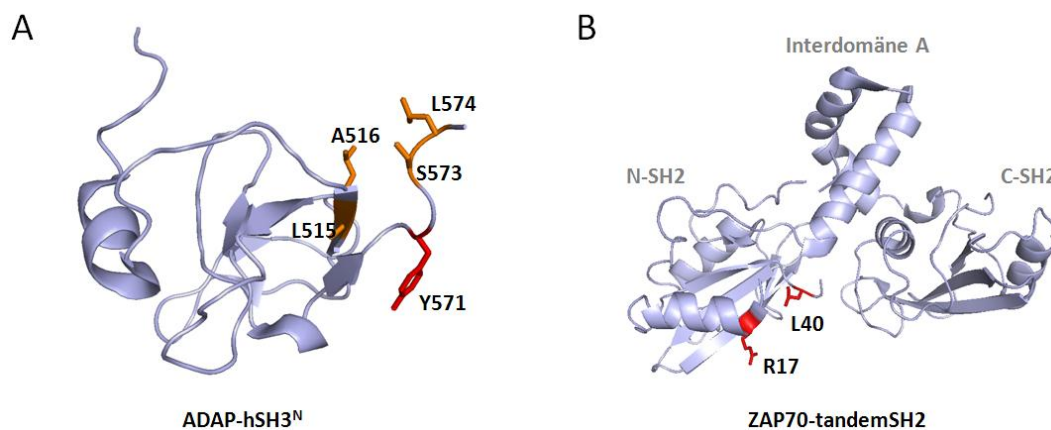


Abbildung 17: Ermittelte Bindungsepitope von ADAP-hSH3^N und ZAP70-tSH2 aus NMR-Bindungsstudien. (A) Dreidimensionale Struktur der hSH3^N-Domäne (PDB ID: 2GTJ) mit beeinflussten Resonanzen (orange) bei ZAP70-tSH2-Zugabe. Der phosphorylierte Tyrosinrest Y571 ist rot markiert. **(B)** Dreidimensionale Struktur der ZAP70-tSH2-Domäne (PDB ID: 1M61) mit den am stärksten beeinflussten Resonanzen (rot) in der N-terminalen SH2-Domäne (N-SH2) bei Zugabe von Y571-phosphorylierter hSH3^N-Domäne.

3.3.2 Quantitative Charakterisierung mittels *Microscale Thermophoresis* (MST)

Durch den Einsatz der NMR-Spektroskopie konnte eine direkte Interaktion zwischen der Y571-phosphorylierten ADAP-hSH3^N-Domäne und ZAP70-tSH2 nachgewiesen werden, wobei die beobachtete Signalverbreiterung auf eine mittlere bis hohe Bindungsaffinität hindeutete. Zur direkten Bestimmung der Bindungsstärke (K_D -Wert) wurde die *Microscale Thermophoresis* (MST) eingesetzt, mit der sich Änderungen der Thermophorese (gerichtete Bewegung in einem Temperaturgradienten) von Proteinen in Abhängigkeit von Bindungsereignissen detektieren lassen. Im Normalfall bewegen sich Moleküle in einem Temperaturgradienten von heiß nach kalt, wobei ein Bindungsereignis in der Regel zu einer Veränderung des Laufverhaltens führt. Moleküleigenschaften wie Größe, Ladung sowie Lösungsentropie haben einen Einfluss auf die Thermophorese in Lösungen, wobei die theoretischen Grundlagen des Phänomens bisher nicht vollständig verstanden und daher Gegenstand aktueller Forschung sind [201, 202]. MST wurde bereits in zahlreichen Studien erfolgreich zur Bestimmung von K_D -Werten in Lösung eingesetzt, unter anderem zur Untersuchung der phosphorylierten ADAP-Linkerregion (ADAP⁵⁷⁰⁻⁶⁹⁰) mit SH2-Domänen von verschiedenen potentiellen Bindungspartnern [145].

In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde ein fluoreszenzmarkiertes SNAP-ADAP-hSH3^N-Konstrukt verwendet, dessen Thermophorese bei einer konstanten Konzentration von 25 nM in Abhängigkeit einer steigenden Konzentration des Bindungspartners ZAP70-tSH2 (41 nM - 44 μ M) gemessen wurde. Die *in vitro*-Phosphorylierung von SNAP-ADAP-hSH3^N erfolgte vor der Messung mit rekombinant hergestellter FYN-Kinase und betrug >70 %. Als Kontrolle diente das unphosphorylierte SNAP-ADAP-hSH3^N-Konstrukt. Jede MST-Messung (Titrationspunkt) dauerte 40 Sekunden, wobei der Laser zur Erzeugung des Temperaturgradienten nach fünf Sekunden für 30 Sekunden eingeschaltet wurde. In Abbildung 18A ist der typische Kurvenverlauf einer Messung exemplarisch dargestellt: Der erzeugte Temperaturgradient führte zunächst zu einem sprunghaften Abfall der SNAP-ADAP-hSH3^N-Fluoreszenz aufgrund der Temperatursensitivität des Fluorophors (Temperatursprung), gefolgt von einer kontinuierlichen Reduktion aufgrund einer thermophoretischen Wanderung von heiß nach kalt. Die Abschaltung des Lasers bei 35 Sekunden führte nach einem inversen Temperatursprung zu einer kontinuierlichen Erhöhung der Fluoreszenz durch Rückdiffusion des SNAP-ADAP-hSH3^N-Konstruktes.

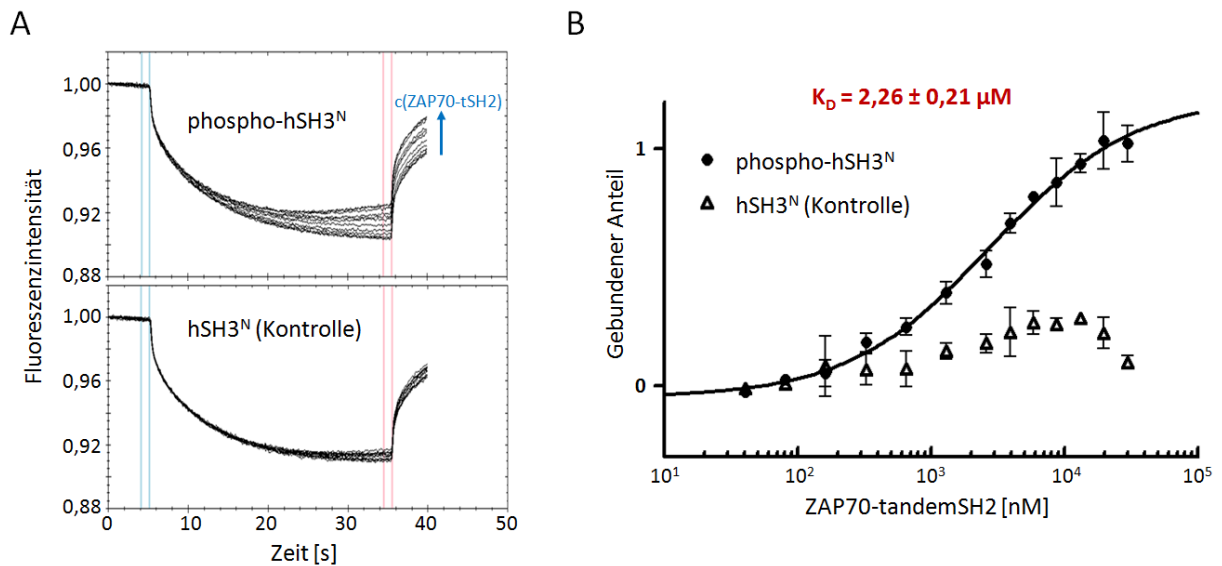


Abbildung 18: MST-Untersuchungen zur Ermittlung der Bindungsaffinität von ADAP-hSH3^N und ZAP70-tSH2. (A) Exemplarische Darstellung des thermophoretischen Laufverhaltens der Y571-phosphorylierten (oben) sowie der unphosphorylierten (unten) SNAP-ADAP-hSH3^N-Domäne (25 nM) bei Zugabe von ZAP70-tSH2 (41 nM to 44 µM). Die Messbereiche der Anfangs- und Endfluoreszenz sind blau bzw. rot eingezeichnet. (B) Auftragung der relativen Fluoreszenzänderung aus drei unabhängigen MST-Experimenten (Mittelwert ± Standardabweichung) gegenüber der ZAP70-tSH2-Konzentration. Die über eine Ausgleichsfunktion ermittelte Dissoziationskonstante (K_D-Wert) für die Y571-phosphorylierte SNAP-ADAP-hSH3^N-Domäne beträgt 2.26 ± 0.21 µM.

Mit zunehmender Konzentration an ZAP70-tSH2 zeigte sich für das Y571-phosphorylierte SNAP-ADAP-hSH3^N-Konstrukt eine graduelle Verschiebung der thermophoretischen Messkurve nach oben, was auf eine Verlangsamung der Thermophorese aufgrund einer Komplexbildung hindeutet (Abbildung 18A). Das unphosphorylierte Konstrukt hingegen wies keine deutliche Veränderung des Laufverhaltens auf. Zur Ermittlung des K_D-Wertes wurde die relative Änderung der Fluoreszenz (Differenz zwischen End- und Anfangsfluoreszenz) für jeden Titrationspunkt aus drei unabhängigen Experimenten gegen die Konzentration von ZAP70-tSH2 aufgetragen (Abbildung 18B). Der über eine Ausgleichsfunktion ermittelte K_D-Wert für das phosphorylierte SNAP-ADAP-hSH3^N-Konstrukt betrug 2,3 ± 0,2 µM, während keine Bindung für das unphosphorylierte Konstrukt festgestellt wurde.

Mit Hilfe der MST-Untersuchungen konnte also eine Bindungsaffinität der ADAP-ZAP70-Interaktion im niedrigen mikromolaren Bereich bestimmt werden. Als nächstes sollte überprüft werden, ob eine direkte Interaktion zwischen ADAP und ZAP70 auch *in vivo* nachweisbar ist.

3.4 Co-Immunopräzipitation des ADAP-ZAP70-Komplexes

Um eine direkte Interaktion zwischen ADAP und ZAP70 im zellulären Kontext zu validieren, wurden Co-Immunopräzipitationen (Co-IPs) in Jurkat T-Zellen durchgeführt. Die Experimente erfolgten in Kooperation mit Dr. Stefanie Kliche und Amelie Witte am Institut für Molekulare und Klinische Immunologie der Universität Magdeburg. Hierfür wurde ZAP70 zunächst aus Jurkat T-Zellen

präzipitiert und das Präzipitat anschließend mittels Western-Blot-Analyse auf die Kopräzipitation von ADAP und SKAP55 untersucht (siehe Abschnitt 2.9.1). Während in unstimulierten Jurkat T-Zellen keine Interaktionen nachweisbar waren, führte die Stimulation über den TCR sowie über den Chemokinrezeptor CXCR4 zu einer induzierbaren Interaktion zwischen ZAP70 und ADAP (Abbildung 19A). Nach TCR-Stimulation erreichte die Interaktion ihren Höhepunkt bei etwa fünf Minuten, während sie nach CXCR4-Stimulation bereits nach einer Minute ihren Höhepunkt erreichte. Die konstitutive Interaktion zwischen ADAP und SKAP55 wurde weder durch die TCR- noch durch die CXCR4-Stimulation beeinflusst.

Eine LC-ESI-MS/MS-Analyse bestätigte zudem eindeutig eine Phosphorylierung an Y571 mit einem Phosphorylierungsgrad von 2-3 %, wobei keine signifikante Steigerung in Abhängigkeit der Zellstimulation zu beobachten war (Abbildung 19B).

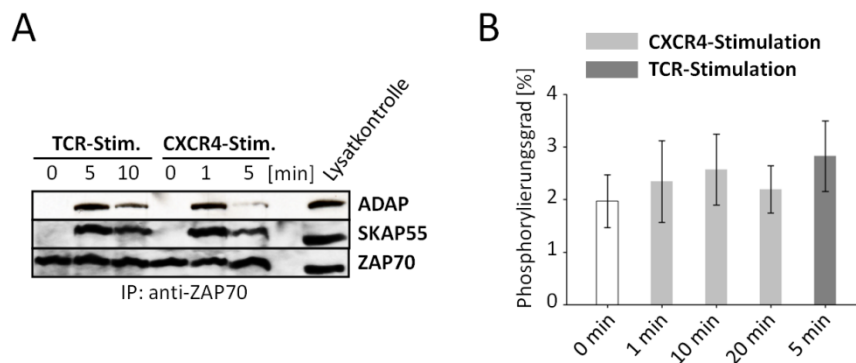


Abbildung 19: Nachweis der ADAP-ZAP70-Interaktion nach TCR- und CXCR4-Stimulation. (A) Jurkat T-Zellen wurden mit CXCL12 (CXCR4) oder anti-CD3 (TCR) für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Die Lysate wurden für eine Immunopräzipitation (IP) von ZAP70 verwendet. Die Präzipitate wurden anschließend mittels Western-Blot unter Verwendung der angegebenen Antikörper analysiert. (B) Relative Quantifizierung des Phosphorylierungsgrades von ADAP-Y571 nach verschiedenen Stimulationszeiten mittels LC-ESI-MS/MS. Die Zellextrakte wurden mittels SDS-PAGE getrennt und anschließend mit Trypsin in-Gel gespalten. Die ermittelten Phosphorylierungsgrade stellen einen Durchschnitt (\pm Standardabweichung) aus drei unabhängigen Messungen dar.

3.5 Sortase A-vermittelte Immobilisierung von Peptiden und Proteinen

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte eine Methode entwickelt werden, die eine kovalente und gerichtete Immobilisierung von Peptiden und Proteinen an eine Trägermatrix ermöglicht, um diese anschließend als Köder in *Pulldown*-Experimenten einzusetzen.

Die Verwendung von nicht-kovalenten Immobilisierungsmethoden in AP-Experimenten führt zu einem großen Überschuss des Köderproteins in der Präparation, wodurch die Identifizierung niedrig abundanter Bindungspartner mit Hilfe der Massenspektrometrie deutlich erschwert wird. Um dies zu verdeutlichen, ist in Abbildung 20A exemplarisch das mittels SDS-PAGE aufgetrennte Eluat aus einem GST-basierten *Pulldown*-Experiment dargestellt, wobei der große Überschuss des Köderproteins

GST-hSH3^N bei etwa 37 kDa deutlich erkennbar ist. Eine Analyse der Gelbanden mittels LC-ESI-MS/MS zeigte eine deutlich reduzierte Anzahl an identifizierten Proteinen im Massenbereich des Köderproteins (Abbildung 20B), was auf Diskriminierungseffekte in der massenspektrometrischen Analytik zurückgeführt werden kann.

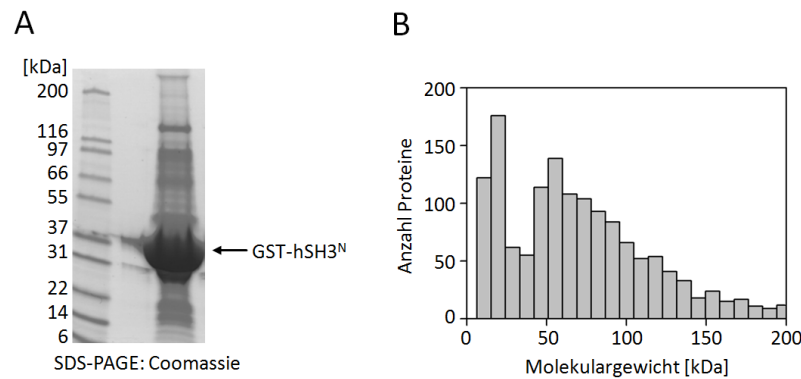


Abbildung 20: Exemplarische Darstellung eines GST-basierten Pull-down-Experiments. (A) Auftrennung des von der Trägermatrix eluierten Proteingemisches mittels SDS-PAGE (Coomassie-Färbung). Das eingesetzte Köderprotein GST-hSH3^N (37,1 kDa) ist als starke Kontamination in der Präparation sichtbar. Nach tryptischer in-Gel-Spaltung (ca. 20 Gelbanden) erfolgte eine Identifizierung der Proteine in jeder Bande mittels LC-ESI-MS/MS. **(B)** Darstellung der Molekulargewichtsverteilung aller identifizierten Proteine als Histogramm.

Anhand der dargestellten Ergebnisse wird deutlich, dass sich die Entfernung des Köderproteins aus der Präparation (über seine kovalente Immobilisierung an die Trägermatrix) positiv auf die Wiederfindungsrate auswirken sollte. Das im Zuge dieser Arbeit entwickelte Verfahren verwendet hierfür die Transpeptidase Sortase A aus dem Bakterium *Staphylococcus aureus*, die dort eine kovalente Verankerung von Oberflächenproteinen an Peptidoglykane der bakteriellen Zellwand katalysiert [203]. Dieser Vorgang erhöht die Pathogenität des Bakteriums, da hierdurch eine Erkennung durch das Immunsystem des infizierten Wirts erschwert wird. Sortase A bindet und spaltet LPXTG-Motive (X = beliebige Aminosäure) zwischen Threonin und Glycin unter Ausbildung eines enzymgebundenen Thioester-Intermediates mit einem aktiven Cysteinrest im aktiven Zentrum des Enzyms, wobei der Glycinrest und alle C-terminal davon gelegenen Reste das Enzym als Abgangsgruppe verlassen (Abbildung 21) [204]. Das Thioester-Intermediat kann daraufhin durch den nukleophilen Angriff eines N-terminalen Oligoglycin-Motivs unter Ausbildung einer Peptidbindung aufgelöst werden.

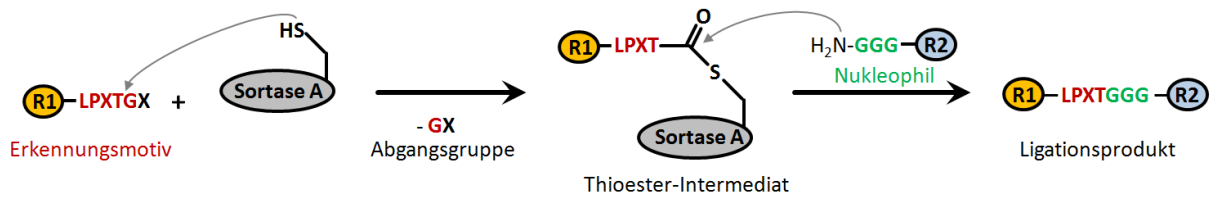


Abbildung 21: Reaktionsschema der Sortase A-vermittelten Ligation. Sortase A aus *S. aureus* katalysiert die Ausbildung einer Peptidbindung zwischen einem C-terminalen LPXTG-Erkennungsmotiv und einem N-terminalen Oligoglycin-Motiv (Nukleophil). Als Reste (R) können beispielsweise synthetische Peptide oder rekombinante Proteine eingesetzt werden.

Ton-That *et al.* konnten 1999 erstmals zeigen, dass sich eine um die Transmembrandomäne verkürzte Form von Sortase A rekombinant gewinnen lässt [205]. Seither wird sie in zahlreichen Anwendungen zur Ligation und Modifizierung von Peptiden und Proteinen eingesetzt [206, 207]. Vorteile der Sortase A-vermittelten Ligation liegen neben der hohen Substratspezifität vor allem in der einfachen Herstellung der Ausgangsmaterialien, da sich die Erkennungsmotive leicht sowohl in rekombinante Proteine als auch in synthetische Peptide einbringen lassen.

Nachteile der Sortase A-vermittelten Ligation sind die geringe Enzymaktivität und die Reversibilität der Transpeptidase-Reaktion, wodurch bei gleichen Ausgangskonzentrationen nur geringe Ligationsausbeuten von etwa 50 % erzielt werden [208]. Höhere Ausbeuten können jedoch leicht durch die Verwendung von Substratüberschüssen erreicht werden. Zudem kann das Gleichgewicht durch Entfernen der Abgangsgruppe (z.B. durch Dialyse) in Richtung des Produktes verschoben werden [208]. Die geringe Aktivität kann durch Verwendung entsprechend hoher Enzymmengen kompensiert werden. Eine weitere Einschränkung der am häufigsten verwendeten Sortase A aus *S. aureus* liegt in ihrer Abhängigkeit von Ca²⁺ als Kofaktor, so dass eine Ligation von Proteinen *in vivo* aufgrund der geringen zellulären Ca²⁺-Konzentration nicht möglich ist [208]. Ploegh *et al.* konnten diese Einschränkung jedoch durch die Verwendung einer Ca²⁺-unabhängigen Sortase A aus *Streptococcus pyogenes* umgehen [209].

Eingesetzt wurde die Sortase A-vermittelte Ligation bisher vor allem zur gerichteten Modifizierung (C- oder N-terminal) von rekombinant hergestellten Proteinen mit funktionellen Gruppen wie beispielsweise Biotin, Fluorophoren, Quervernetzern (*cross-linker*) oder Peptid-Nukleinsäuren (siehe Review [207]). Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Transpeptidasereaktion liegt in der Erzeugung von Fusionsproteinen *in vitro*, was vor allem für die partielle Markierung von Proteinen bei NMR-Untersuchungen interessant ist. So konnte die NMR-Struktur der fast unlöslichen SH3-Domäne von VAV aufgeklärt werden, indem diese mit einer unmarkierten, löslichkeitsfördernden Immunglobulin-Domäne fusioniert wurde [210]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich Proteine und Peptide durch Einbringen eines C-terminalen LPXTG-Motivs und eines N-terminalen Oligoglycin-Motivs mittels Sortase A zirkularisieren lassen, wodurch ihre Stabilität gegenüber Denaturierung oder Proteolyse erhöht werden konnte [211].

Des Weiteren wurde Sortase A zur kovalenten und gerichteten Immobilisierung von Proteinen an feste Oberflächen eingesetzt [212-215]. So konnte beispielsweise das grün fluoreszierende Protein (GFP) an eine Polystyren-Matrix immobilisiert, welche zuvor mit einem Oligoglycin-Motiv derivatisiert wurde [215]. Clow *et al.* verwendeten Sortase A auf ähnliche Weise zur Immobilisierung von Proteinen an *Biacore*-Chips zur Analyse von Interaktionen mittels Oberflächenplasmonresonanz [213]. Sinsi *et al.* nutzten Sortase A zur Immobilisierung von LPETG-markierten Influenzavirus-Proteinen (aus zellulären Lysaten) an Oligoglycin-derivatisierte Glas-Trägerchips, wobei die immobilisierten Antigene für das Screening von Antikörpern oder Antigenen (Protein-Array) eingesetzt werden können [214]. Die Verwendung von Lysaten und Detergenzien wie SDS hatte hierbei keinen Einfluss auf die Aktivität von Sortase A.

Bei dem hier entwickelten Verfahren zur Sortase A-vermittelten Immobilisierung von Protein- oder Peptidsubstraten wurden diese rekombinant bzw. während der Peptidsynthese mit einem C-terminalen Sortase A-Erkennungsmotiv (LPVTG-Motiv) versehen. Als Nucleophil diente ein Peptid mit N-terminalem Oligoglycin-Motiv, welches mittels Thiolkopplung an die Agarosematrix gekoppelt wurde. Hierbei wird eine Beladung von etwa 10 nmol (ca. 10 µg) Peptid je 20 µL Agarosematrix erreicht (ermittelt durch frühere Aminosäureanalysen der AG Krause). Die Immobilisierung erfolgte anschließend, wie in Abbildung 22 schematisch dargestellt, durch Inkubation der Nucleophil-beladenen Matrix mit dem gewünschten Protein- oder Peptidsubstrat in Gegenwart von Sortase A.

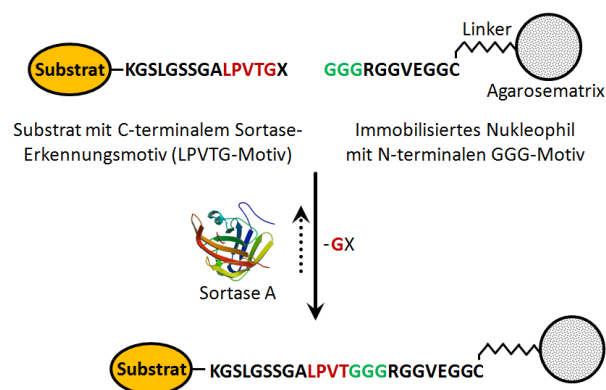


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Sortase A-vermittelten Immobilisierung von Protein- oder Peptidsubstraten. Als Substrate dienen Proteine oder Peptide, die C-terminal um einen Linker und das Sortase A-Erkennungsmotiv (LPVTG) verlängert wurden. Als Nucleophil dient ein Peptid mit N-terminalem Triglycin-Motiv, welches zuvor an eine Agarosematrix gekoppelt wurde. Die dargestellte Kristallstruktur (PDB 1T2W) zeigt Sortase A im Komplex mit einem LPETG-Substratpeptid [216].

3.5.1 Optimierung der Sortase A-vermittelten Kopplungsreaktion

Zur Entwicklung eines robusten Protokolls mit einer maximalen Ligationsausbeute wurden in einer Reihe von Kopplungen mit einem Modellpeptid separat das Enzym-Substrat-Verhältnis, das Substrat-Nucleophil-Verhältnis sowie die Substratkonzentration variiert. Eine ausführliche Beschreibung ist in

Abschnitt 2.10.5 zu finden. Als Modellsubstrat zur Immobilisierung an die Nukleophil-beladene Agarosematrix diente ein N-terminal fluoreszenzmarkiertes Peptid mit einem C-terminalen Sortase A-Erkennungsmotiv (Dansyl-LPKTGGKRR). Nach der Ligationsreaktion erfolgte eine tryptische *on-bead*-Spaltung, so dass die Dansylgruppe in den Überstand freigesetzt wurde. Mit Hilfe der spezifischen Dansyl-Absorption bei 331 nm konnte anschließend die Ligationsausbeute photometrisch bestimmt werden. Die höchsten Ligationsausbeuten wurden erreicht mit einem Enzym-Substrat-Verhältnis zwischen 0,2-0,8 (Abbildung 23A), einem Substrat-Nukleophil-Verhältnis von ≥ 6 (Abbildung 23B) sowie einer Substratkonzentration von $\geq 150 \mu\text{M}$ (Abbildung 23C). Auf diese Weise ließen sich reproduzierbar etwa 8-10 nmol des Modellpeptids je 20 μL Trägermatrix immobilisieren, womit eine nahezu vollständige Umsetzung der angenommenen Bindungsstellen erreicht werden konnte.

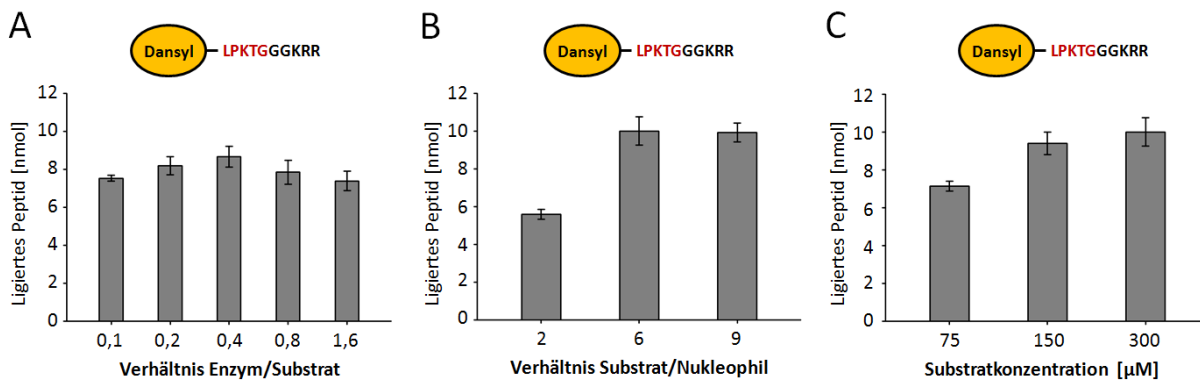


Abbildung 23: Optimierung der Reaktionsbedingungen. Sortase A-vermittelte Immobilisierung eines dansylierten Modellpeptids (Dansyl-LPKTGGKRR) an jeweils 20 μL Nukleophil-beladene Agarosematrix. Variation von Enzym-Substrat-Verhältnis (A), Substrat-Nukleophil-Verhältnis (B) und Substratkonzentration (C). Nach tryptischer *on-bead*-Spaltung erfolgte eine Detektion der Ligationsausbeute anhand der spezifischen Absorption der Dansylgruppe bei 331 nm. Die Werte stellen einen Durchschnitt (\pm Standardabweichung) dreier unabhängiger Messungen dar.

Anschließend sollten die optimierten Bedingungen auf die Immobilisierung von Proteinen übertragen werden, wobei die Detektion der Ligationsausbeute hierbei über MALDI-MS in Kombination mit einem isotope markierten Referenzpeptid erfolgte (siehe Abschnitt 2.10.4). Als Modellprotein diente die um das LPVTG-Motiv erweiterte hSH3^N-Domäne von ADAP (hSH3^N-LPVTG). Wie bereits für das Modellpeptid gezeigt, konnte auch hier eine maximale Ligationsausbeute bei einem Substrat-Nukleophil-Verhältnisses ≥ 6 erzielt werden, wobei diese mit 0,8 nmol je 20 μL Trägermatrix (bezogen auf die Stoffmenge) etwa um den Faktor 12 geringer ausfiel (Abbildung 24A). Die absolute Menge an immobilisiertem Substrat (Peptid oder Protein) verhielt sich hingegen konstant (etwa 10 μg je 20 μL Trägermaterial), was auf eine sterische Begrenzung der maximalen Beladung hindeutete.

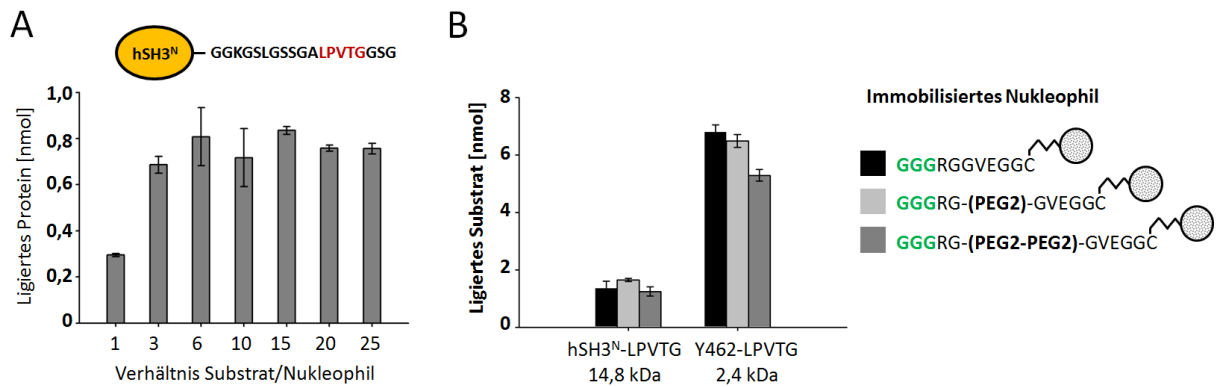


Abbildung 24: Sortase A-vermittelte Immobilisierung von Proteinen und Einfluss der Linkerlänge auf die Ligationsausbeute. (A) Sortase A-vermittelte Immobilisierung des Modellproteins ADAP-hSH3^N-LPVTG an 20 μ L Nukleophil-beladene Agarosematrix. Auftragung der Ligationsausbeute in Abhängigkeit vom Substrat-Nukleophil-Verhältnis. (B) Sortase A-vermittelte Immobilisierung des Modellproteins ADAP-hSH3^N-LPVTG sowie des Modellpeptids ADAP-Y462-LPVTG an 20 μ L Nukleophil-beladene Agarosematrix. Auftragung der Ligationsausbeute in Abhängigkeit der Linkerlänge (PEG = Polyethylenglykol) des eingesetzten Nukleophils. Die Detektion der Ligationsausbeute erfolgte nach tryptischer *on-bead*-Spaltung mittels MALDI-MS. Die Werte stellen einen Durchschnitt (\pm Standardabweichung) dreier unabhängiger Messungen dar.

Weiterhin wurde die Linkerlänge des immobilisierten Nukleophils durch Einfügen von Polyethylenglykol (PEG2)-Einheiten schrittweise erhöht (Abbildung 24B). Hierbei zeigte sich jedoch kein signifikanter Einfluss der Linkerlänge auf die Ligationsausbeute von Proteinen (hSH3^N-LPVTG) oder Peptiden (ADAP-Y462-LPVTG), was auf eine bereits vollständige Sättigung der Matrix auch mit dem kurzen Linker hindeutete.

3.5.2 Absolute Quantifizierung der Matrixbeladung

Zur Bestimmung der Ligationsausbeute nach der Sortase A-vermittelten Immobilisierung von Protein- oder Peptidsubstraten wurden benachbart zu den Sortase A-Erkennungsmotiven (im Substrat sowie im Nukleophil-Peptid) tryptische Spaltstellen eingeführt. Durch eine tryptische *on-bead*-Spaltung nach der Ligation konnte auf diese Weise (in einem zusätzlichen Kontrollansatz) ein Markerpeptid freigesetzt werden, welches nur durch Ligation des Substrats an die Agarosematrix entstehen kann und somit in seiner Menge dem immobilisierten Substrat gleichzusetzen ist (Abbildung 25A).

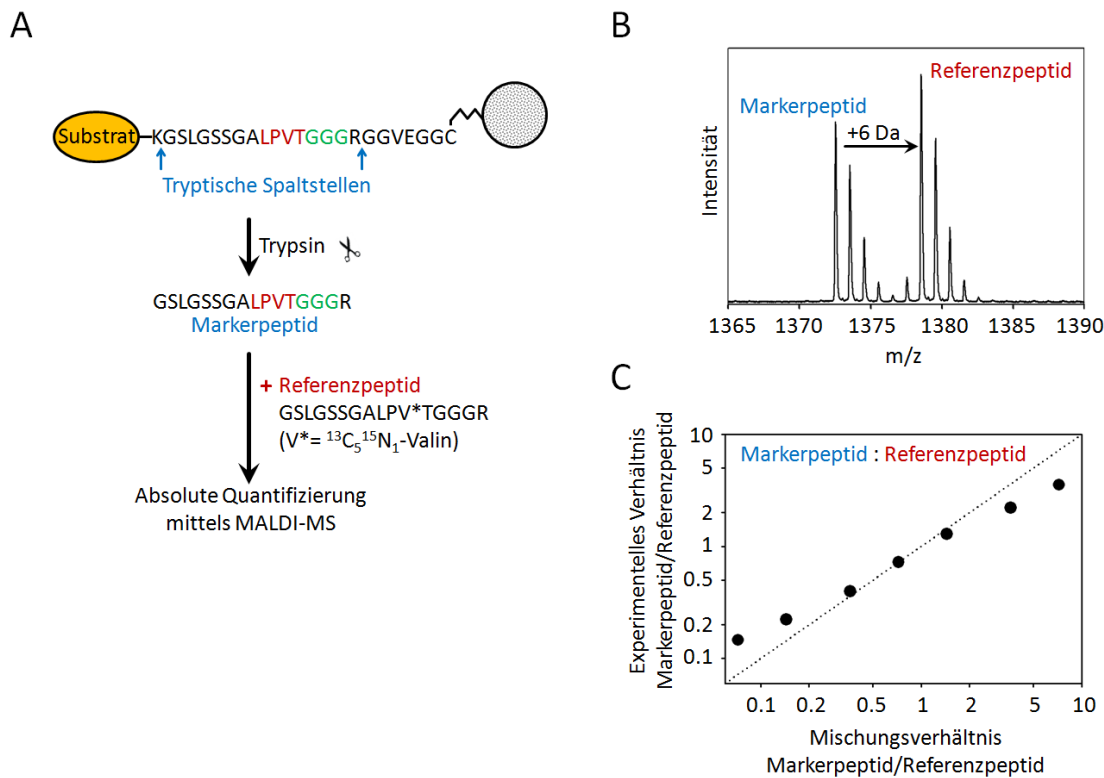


Abbildung 25: Absolute Quantifizierung der Ligationsausbeute mittels MALDI-MS. (A) Durch eine tryptische *on-bead*-Spaltung nach der Sortase A-vermittelten Ligation wird ein spezifisches Markerpeptid freigesetzt, dessen Menge durch Zugabe eines isotonenmarkierten ($^{13}\text{C}_5, ^{15}\text{N}_1$ -Valin) Referenzpeptids mittels MALDI-MS bestimmt wird. **(B)** Ausschnitt aus einem MALDI-Spektrum mit den Signalen von Marker- und Referenzpeptid bei $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1372,7$ Da bzw. $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1378,7$ Da. Die absolute Quantifizierung des Markerpeptids erfolgte anhand der Verhältnisse der Signalintensitäten und der bekannten Konzentration des Referenzpeptids im Ansatz. **(C)** Bestimmung der Quantifizierungsgenauigkeit durch die Messung verschiedener Mischungsverhältnisse von Referenz- und Markerpeptid. Die dargestellten Werte stellen den Durchschnitt (\pm Standardabweichung) von neun unabhängigen Messungen dar.

Die absolute Quantifizierung dieses Markerpeptids im Überstand erfolgte im Anschluss über eine massenspektrometrische Isotopenverdünnungsanalyse durch Zugabe einer bekannten Menge eines isotonenmarkierten ($^{13}\text{C}_5, ^{15}\text{N}_1$ -Valin) Referenzpeptids identischer Sequenz (siehe Abschnitt 2.10.4). Die Ligationsausbeute ergibt sich hierbei durch einen direkten Vergleich der Peakintensitäten von Marker- und Referenzpeptid (Abbildung 25B). Um die Genauigkeit der Quantifizierung zu bestimmen, wurden verschiedene Mischungsverhältnisse von Referenz- und Markerpeptid eingestellt und mittels MALDI-MS analysiert (Abbildung 25C). Hierbei zeigte sich, dass die Quantifizierung am genauesten ist, wenn die Menge an Referenzpeptid so eingestellt wird, dass sich die Intensitäten von Marker- und Referenzpeptid maximal um den Faktor zwei unterscheiden.

3.5.3 Anwendung der Sortase A-vermittelten Immobilisierungsmethodik

Nach Entwicklung der Sortase A-vermittelten Immobilisierungsmethodik sollte getestet werden, ob sie sich für die kovalente Immobilisierung von Proteinen und Peptiden in *Pulldown*-Experimenten

eignet. Die erfolgreiche Anwendung für *Pulldown*-Experimente mit Peptiden ist in Abschnitt 3.2.1 anhand der phosphorylierten und korrespondierenden unphosphorylierten Peptidsequenzen ADAP⁵⁶⁷⁻⁵⁷⁷ (ADAP-Y571) und ADAP⁴⁵⁹⁻⁴⁶⁹ (ADAP-Y462) dargestellt. Hierbei wurden für die Position ADAP-Y571 exakt dieselben phosphorylierungsabhängigen Bindungspartner (CRK, CRKL, PLC γ 1) ermittelt wie mit der bisher verwendeten Thiolkopplungsmethode, während die Position ADAP-Y462 erstmalig untersucht wurde und eine phosphorylierungsabhängige Bindung von PLC γ 1, PLC γ 2 und PIK3R1 zeigte.

Die Anwendung der Methodik zur Immobilisierung von Proteinen erfolgte am Beispiel der GYF-Domäne des Proteins CD2BP2 (*splicing-associated CD2 antigen cytoplasmic tail-Binding Protein 2*). CD2BP2 bindet über seine GYF-Domäne an prolinreiche Sequenzmotive im zytoplasmatischen Teil des CD2-Rezeptors [217-220] und ist darüber hinaus Bestandteil des U5 snRNP (*U5 small nuclear ribonucleoprotein complex*) [221]. Die GYF-Domäne bindet über eine Reihe konservierter Aminosäuren spezifisch an prolinreiche Sequenzen (PRS) mit den Sequenzmotiven PPGX[**RK**] und PPG[**WFYMLIHSTAE**] [222, 223]. Nachgewiesen wurden eine PRS-abhängige Bindung mit dem splicosomalen Protein SMB/B' (RSMB) [224] sowie eine PRS-unabhängige Bindung an U5-15K (TXNL4A) [225].

Um PRS-abhängige Bindungspartner der CD2BP2-GYF Domäne zu identifizieren, wurden SILAC-basierte *Pulldown*-Experimente mit Jurkat T-Zelllysaten in Kombination mit quantitativer Massenspektrometrie durchgeführt. Als Referenz diente eine Mutante der GYF-Domäne, bei der die Fähigkeit zur PRS-Bindung durch die Mutation zweier konservierter Aminosäuren (W8R/Y33A) unterbunden wurde. Beide Köderproteine (Mutante und Wildtyp) wurden mit einem C-terminalen Sortase A-Erkennungsmotiv rekombinant hergestellt und mit Hilfe der Sortase A-vermittelten Ligation an die Agarosematrix immobilisiert (Abbildung 26A). Zu Vergleichszwecken erfolgte der Versuch analog unter Verwendung der herkömmlichen Immobilisierungstechnik, indem die GYF-Domäne über einen N-terminalen GST-*tag* an eine Glutathion-funktionalisierte Agarosematrix immobilisiert wurde. Nach Inkubation mit den SILAC-markierten Zelllysaten wurde die Matrix zur Entfernung nicht-gebundener Proteine mehrfach gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte anschließend durch das Detergenz Rapigest, welches mit der darauffolgenden tryptischen in-Lösungsspaltung kompatibel ist (siehe Abschnitt 2.10.2). Trennung und Analyse des komplexen Peptidgemisches erfolgten über eine zweidimensionale Flüssigchromatographie (2D LC) [162], wobei die zweite Chromatographie direkt an das Massenspektrometer gekoppelt war (LC-MS/MS). Zur Identifizierung und Quantifizierung der Proteine wurde die MaxQuant-Software verwendet.

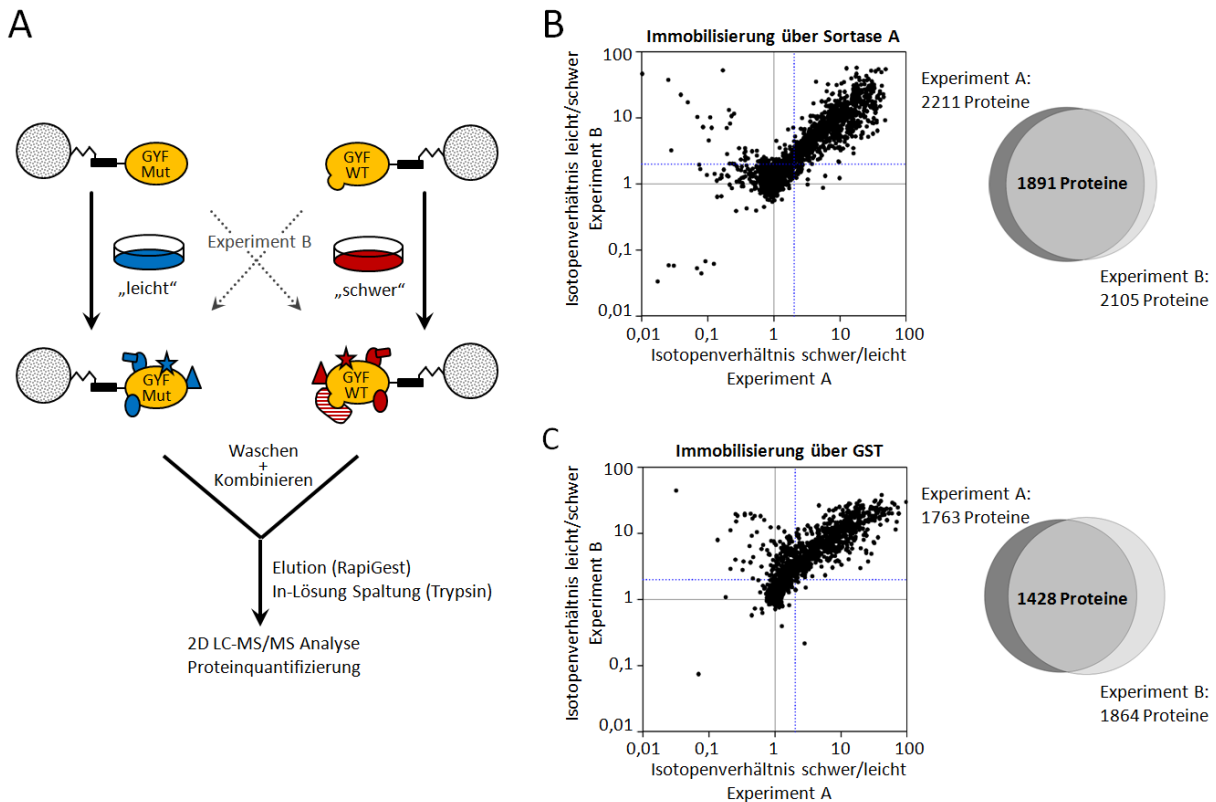


Abbildung 26: Anwendung der Sortase A-vermittelten Immobilisierungstechnik für Pulldown-Experimente mit der CD2BP2-GYF-Domäne. (A) Die Immobilisierung der GYF-Domäne (Mutante sowie Wildtyp) erfolgte über die Sortase A-vermittelte Ligation. Nach Inkubation mit den SILAC-markierten Zelllysaten („leicht“ und „schwer“) und mehreren Waschschritten, wurden die gebundenen Proteine tryptisch gespalten. Die Identifizierung und Quantifizierung der Proteine erfolgte mittels 2D LC-MS/MS. Das Pulldown-Experiment wurde als Replikat mit inverser Markierung durchgeführt (Experiment A und B). **(B,C)** Gegenüberstellung der Isotopenverhältnisse aus zwei Pulldown-Experimenten A und B unter Verwendung der kovalenten Immobilisierung mittels Sortase A **(B)** und der nicht-kovalenten Immobilisierung mittels GST **(C)**. Proteine im 1. Quadranten waren reproduzierbar an die GYF-Domäne in Abhängigkeit der PRS-Bindungsstelle angereichert mit einem Isotopenverhältnis >2 (blaue gestrichelte Linie). Die Venn-Diagramme zeigen die Schnittmenge der quantifizierten Proteine aus den Einzelexperimenten.

Insgesamt konnten durch den Einsatz der Sortase A-vermittelten Immobilisierungstechnik 2211 Proteine in Experiment A und 2105 Proteine in Experiment B identifiziert und quantifiziert werden, wobei eine hohe Übereinstimmung von 1891 Proteinen erzielt wurde (Abbildung 26B). Die Gegenüberstellung der Isotopenverhältnisse aus Experiment A und Experiment B zeigte für einen Pool von etwa 1000 Proteinen eine enge Streuung der Isotopenverhältnisse um den Wert eins. Dabei handelte es sich um Proteine, die unabhängig von der Mutation der PRS-Bindungsstelle identifiziert wurden. Darüber hinaus zeigten über 800 Proteine (1. Quadrant) eine spezifische Anreicherung an die Wildtyp GYF-Domäne, was auf eine PRS-abhängige Bindung hindeutet.

Eine Analyse der identifizierten Proteine im Hinblick auf die bekannten GYF-Bindungsmotive Typ 1 PPGX[**RK**] und Typ 2 PPG[**WFYMLIHSTAE**] ist in Abbildung 27A dargestellt. Durch den Einsatz der Sortase A-vermittelten Immobilisierung wurden insgesamt 81 Proteine mit GYF-Motiv Typ 1 identifiziert und 359 mit GYF-Motiv Typ 2, von denen sich jeweils über 70 % im Pool der

angereicherten Proteine befanden. Darüber hinaus deutete die hohe Anzahl an angereicherten Proteinen auf die Präzipitation größerer Proteinkomplexe hin, zumal ein Großteil der angereicherten Proteine über keines der beiden GYF-Bindungsmotive verfügte. Tatsächlich konnten über 80 % der Proteine aus bekannten spliceosomalen Komplexen (gemäß [224]) identifiziert werden, von denen 67 % eine PRS-abhängige Bindung aufwiesen (Abbildung 27B). Hierunter befanden sich die Proteine SNRPA, RBM25, SF3B2, SF3B4, WBP11 und RBM22, die jeweils über mehrere GYF-Bindungsmotive verfügen. Der bekannte PRS-abhängige Bindungspartner SMB/B' (RSMB) konnte nicht identifiziert werden, während der PRS-unabhängige GYF Binder U5-15K (TXNL4A) erwartungsgemäß im Pool der nicht angereicherten Proteine identifiziert wurde [225].

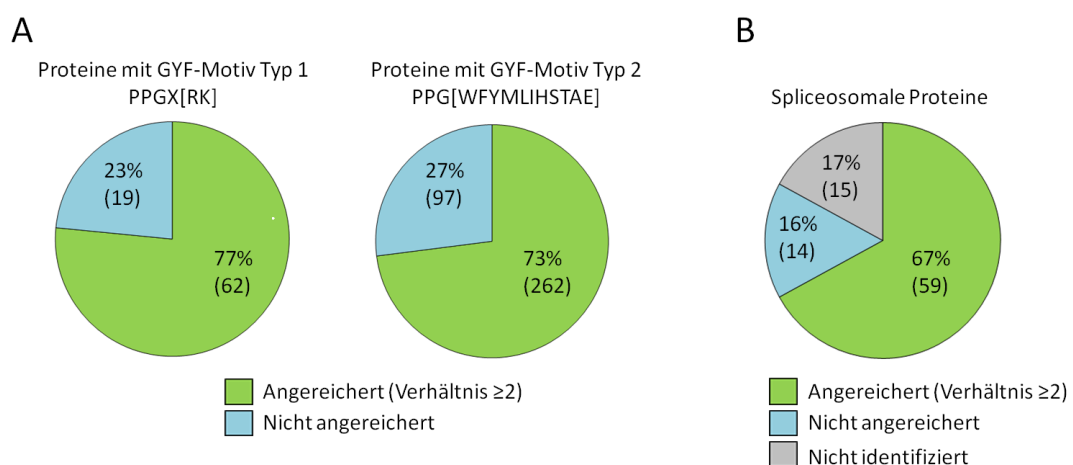


Abbildung 27: Klassifizierung der identifizierten Proteine aus dem Sortase A-vermittelten *Pulldown*-Experiment mit der CD2BP2-GYF-Domäne. (A) Über 70 % der identifizierten Proteine mit einem GYF-Bindungsmotiv Typ 1 (links) oder Typ 2 (rechts) waren im Pool der angereicherten Proteine (Isotopenverhältnis >2). **(B)** Über 80 % der bekannten spliceosomalen Proteine (gemäß [224]) wurden identifiziert, von denen 67 % eine spezifische Anreicherung an die Wildtyp GYF-Domäne zeigten.

Im Vergleichsexperiment (GST-vermittelte Immobilisierung) wurden 1428 Proteine reproduzierbar identifiziert (Abbildung 26C) und somit deutlich weniger im Vergleich zur kovalenten Immobilisierung mittels Sortase A (Abbildung 26B). Die Anzahl an spliceosomalen Proteinen und Proteinen mit GYF-Motiven war ebenfalls reduziert, wobei eine vergleichbare Verteilung zwischen angereicherten und nicht angereicherten Proteinen zu beobachten war (Daten nicht dargestellt). Eine Erklärung für die geringere Proteinanzahl im GST-Ansatz liegt in der Kontamination der Probe mit einem hohen Überschuss des Köderproteins (GST-GYF). Dies ist deutlich anhand der Chromatogramme der ersten und zweiten Dimension zu erkennen, die von Peptidsignalen des Köderproteins dominiert werden (Abbildung 28A). Bei Verwendung der hier entwickelten kovalenten Immobilisierung mittels Sortase A hingegen waren keine dominierenden Signale des Köderproteins zu beobachten (Abbildung 28B).

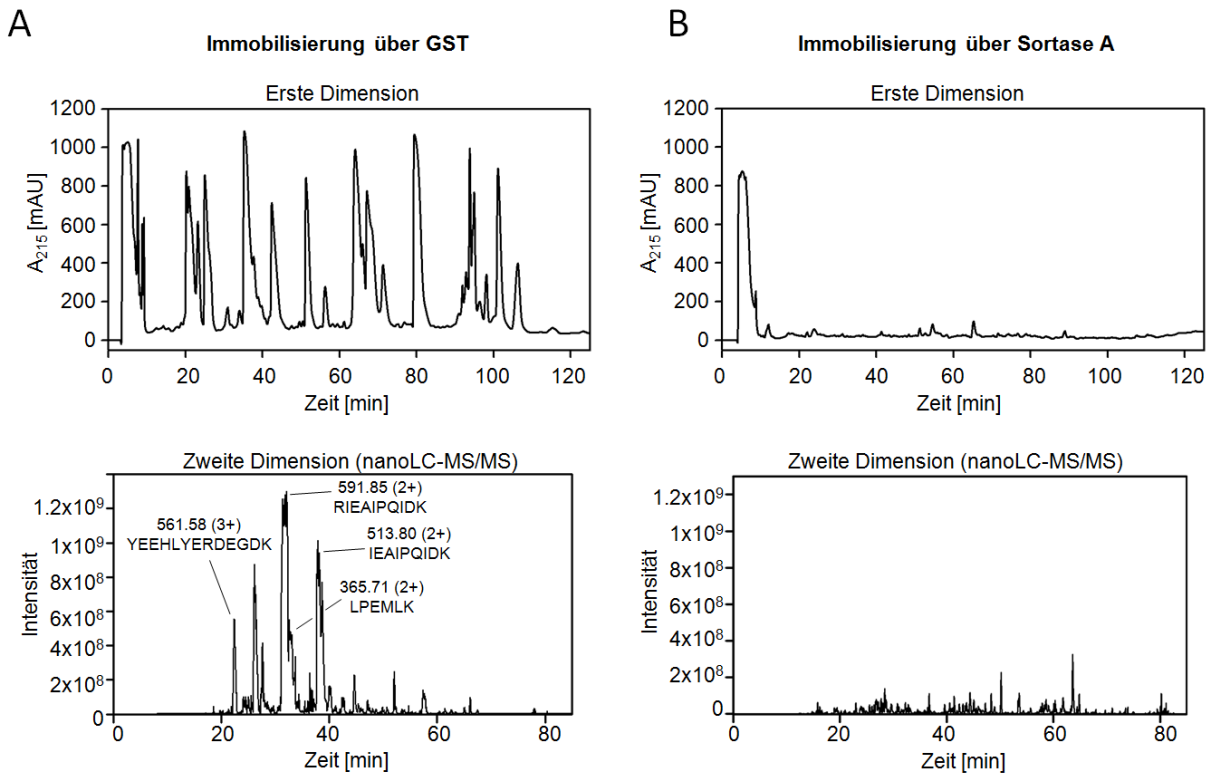


Abbildung 28: Entfernung dominierender Peptidsignale des Köderproteins durch den Einsatz der Sortase A-vermittelten kovalenten Immobilisierung. (A,B) Repräsentative Chromatogramme der ersten Dimension (UV-Detektion) und BICs (*base peak ion chromatograms*) der zweiten Dimension (nanoLC-MS/MS). **(A)** Nicht-kovalente Immobilisierung mittels GST. Dominierende Peptidsignale des Köderproteins (GST-GYF) sind eingezeichnet (*m/z*, Ladungszustand und Sequenz). **(B)** Kovalente Immobilisierung mittels Sortase A.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich die hier entwickelte Sortase A-vermittelte Immobilisierungsmethodik erfolgreich für *Pulldown*-Experimente mit Peptid- und Proteinliganden einsetzen lässt. Ein wesentlicher Vorteil der Methode liegt in der Entfernung des Köderproteins aus der Präparation. Darüber hinaus ermöglicht das Verfahren eine gerichtete Immobilisierung des Köderproteins, so dass ein Funktionsverlust durch die Immobilisierung unwahrscheinlich ist.

4 Diskussion

T-Zellen gehören zu den Hauptakteuren des angeborenen Immunsystems. Um eine gerichtete Immunantwort gegen pathogene Strukturen auslösen zu können, müssen sie zunächst aus dem Blutkreislauf in einen Lymphknoten oder ein infiziertes Gewebe migrieren. Dort gehen sie Kontakte mit antigenpräsentierenden Zellen ein und lösen im Falle einer spezifischen Antigenerkennung eine Immunantwort aus. Sowohl die Migration also auch die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten wird über Integrine vermittelt. Die stimulationsabhängige Aktivierung dieser Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche der T-Zellen erfolgt über den *inside-out*-Signalweg (siehe Abschnitt 1.1.6). Ein zentraler Bestandteil dieses Signalweges ist das Adapterprotein ADAP, welches im Zuge der T-Zellaktivierung an mehreren Tyrosinresten phosphoryliert wird und hierüber zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen vermittelt. Hierdurch assembliert sich ein membranständiger Signalkomplex, der entscheidend zur Integrinaktivierung beiträgt. Die Zusammensetzung dieses wichtigen Komplexes sowie die Mechanismen der Signaltransduktion sind bisher nur unzureichend aufgeklärt. In dieser Arbeit wurde das Immunzellprotein ADAP im Hinblick auf unbekannte phosphorylierungsabhängige Interaktionspartner untersucht, wobei insbesondere die Funktion der strukturierten hSH3^N-Domäne aufgeklärt werden sollte.

4.1 ADAP-Phosphorylierung durch FYN-Kinase

Zunächst sollten alle relevanten Tyrosin-Phosphorylierungsstellen von ADAP charakterisiert werden, um anschließend relevante Motive im Hinblick auf potentielle Interaktionspartner zu untersuchen. Nachdem ADAP und FYN in ausreichenden Mengen und in hoher Reinheit aus Insektenzellen isoliert werden konnten, erfolgte eine zeitabhängige *in vitro*-Phosphorylierung von ADAP mit einem Enzym-Substrat-Verhältnis von 1:100. Bereits nach 30 Sekunden konnte dabei ein starkes Phosphorylierungssignal von ADAP mittels Western-Blot-Analyse detektiert werden, das innerhalb von 30 Minuten nur leicht anstieg (siehe Abbildung 8B). Zudem wurde eine Autophosphorylierung der FYN-Kinase beobachtet, insbesondere in Abwesenheit eines anderen Substrates. Die Autophosphorylierung von FYN vor allem an dem Tyrosinrest 420 (Y420) führt zu einer vollständigen Aktivierung der Kinase, während eine Phosphorylierung an Y531 inhibitorisch wirkt [226].

Die Identifizierung der Phosphorylierungsstellen von ADAP sowie deren relative Quantifizierung über die Zeit erfolgte nach enzymatischer in-Gel-Spaltung mit Hilfe der Massenspektrometrie. Hierbei dienten die Signalintensitäten aller korrespondierenden Peptid/Phosphopeptid-Signale für die jeweilige Position zur Abschätzung des Phosphorylierungsgrades [194, 195]. Da sich die korrespondierenden Peptid/Phosphopeptid-Signale sowohl in ihrer Retentionszeit also auch in ihrem

Ionisierungsverhalten unterscheiden, ist eine absolute Bestimmung des Phosphorylierungsgrades anhand der gemessenen Signalintensitäten ohne den Einsatz von isotoptenmarkierten Referenzpeptiden nicht möglich. Da phosphorylierte Peptide im Vergleich zu ihren korrespondierenden unphosphorylierten Peptiden meist eine schlechtere Ionisierbarkeit aufweisen [227], sollten die hier bestimmten Phosphorylierungsgrade daher eher unterbewertet sein.

Mit Hilfe der dargestellten Methode konnte eine starke Phosphorylierung der ADAP-Tyrosinreste 462, 571, 595, 625 und 651 nachgewiesen werden, wobei der Phosphorylierungsgrad innerhalb von vier Stunden auf >80 % anstieg (siehe Abbildung 8D). Ein Vergleich dieser Tyrosinreste deutet auf eine Vorliebe der FYN-Kinase für Bindungsmotive mit einer sauren Aminosäure (Asparaginsäure oder Glutaminsäure) an den Positionen +1 und +2, gefolgt von einer unpolaren Aminosäure (Valin oder Isoleucin) an Position +3 hin. Die Position Y387 zeigte einen deutlich langsameren Anstieg und erreichte erst nach über 20 Stunden Inkubation einen Phosphorylierungsgrad von >80 %, so dass eine physiologische Bedeutung für diese Position unwahrscheinlich ist. Die Positionen Y771 und Y780 zeigten hingegen ebenfalls eine starke Phosphorylierung, konnten jedoch aufgrund einer zunehmenden Degradation des C-Terminus von ADAP während der Inkubationszeit nicht exakt quantifiziert werden. Alle anderen Tyrosinreste zeigten auch nach vier Stunden keine nennenswerte Phosphorylierung.

Die ermittelten Phosphorylierungsstellen stimmen hierbei gut mit den Vorhersagewerten überein, die mit Hilfe des GPS-Algorithmus (Version 2.1, [228]) ermittelt wurden (siehe Abbildung 29). Zudem liegt eine hohe Übereinstimmung mit den von Sylvester *et al.* bestimmten Phosphorylierungsstellen vor [93]. Durch den kombinierten Einsatz einer spezifischen und einer unspezifischen Protease konnten zudem für alle 16 Positionen relative Phosphorylierungsgrade bestimmt werden, während Y625 und Y709 von Sylvester *et al.* nicht identifiziert werden konnten [93]. Unterschiede bestehen lediglich bei den Positionen Y559 und Y755, die im Gegensatz zu Sylvester *et al.* nur geringe Phosphorylierungsgrade von 1 % und 6 % aufwiesen (nach vier Stunden). Eine Ursache für diese Diskrepanz liegt möglicherweise darin, dass Sylvester *et al.* vor der Analyse eine phosphorylierungsspezifische Anreicherung durchgeführt haben und zudem keine Angaben zum genauen Phosphorylierungsgrad gemacht haben [93].

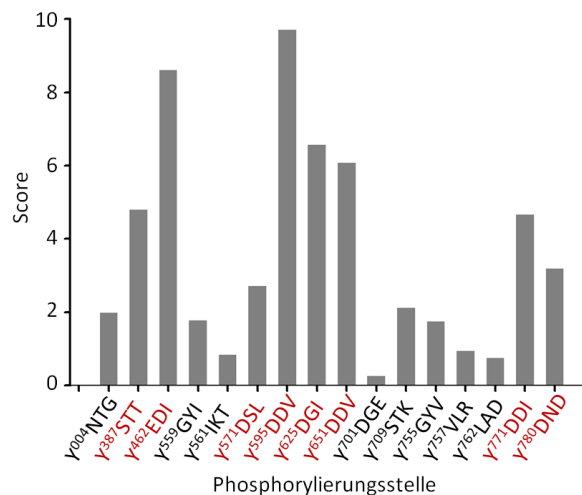


Abbildung 29: Vergleich der Vorhersagewerte für die Phosphorylierung der Tyrosinreste in ADAP durch die FYN-Kinase mit Hilfe des GPS-Algorithmus [228]. Der Score ist ein Maß für die relative Wahrscheinlichkeit der Phosphorylierung für die jeweilige Position. Die rot eingezeichneten Tyrosinreste wurden nach *in vitro*-Phosphorylierung von ADAP mit FYN im Zuge dieser Arbeit als stark phosphoryliert identifiziert.

Unter den am stärksten phosphorylierten Positionen befanden sich erwartungsgemäß die bekannten Bindungsmotive für FYN (Y⁶²⁵DGI), SLP76 (Y⁵⁹⁵DDV, Y⁶⁵¹DDV, Y⁷⁷¹DDI) und NCK (Y⁵⁹⁵DDV, Y⁶⁵¹DDV, Y⁷⁷¹DDI) (siehe Abschnitt 1.1.7) [93, 95, 105, 106, 108, 109, 139, 144]. Diese Beobachtung stellt eine Positivkontrolle der verwendeten Methode dar. Es ist daher naheliegend, dass die ebenfalls stark phosphorylierten Reste Y462 und Y571 auch als Bindungsstellen für phosphorylierungsabhängige Interaktionen dienen könnten. Um dies zu prüfen, wurden beide Positionen für differenzielle *Pulldown*-Experimente ausgewählt. Der C-terminale Tyrosinrest an Position 780 wurde nicht weiter untersucht, da dessen Phosphorylierungsgrad nicht eindeutig quantifiziert werden konnte. Da die experimentellen Daten jedoch eher auf eine hohe Phosphorylierung hindeuten und das Y⁷⁸⁰DND-Motiv zudem eine relativ hohe Phosphorylierungswahrscheinlichkeit aufweist (siehe Abbildung 29), erscheint eine Untersuchung dieser Position in zukünftigen Experimenten sinnvoll.

Ein Vergleich der mittels Massenspektrometrie bestimmten Phosphorylierungsgrade mit den Signalintensitäten im Western-Blot verdeutlichte zudem die hohe Empfindlichkeit der Western-Blot-Analyse. So war bereits nach 30 Sekunden annähernd eine Sättigung des Signals erreicht, während der mittels Massenspektrometrie bestimmte Phosphorylierungsgrad für keine der identifizierten Positionen bei mehr als 3 % lag. Gleichzeitig zeigt diese Beobachtung, dass der dynamische Bereich der Western-Blot-Analyse sehr begrenzt ist.

4.2 Phosphorylierungsabhängige ADAP-Interaktionspartner

Zur Ermittlung phosphorylierungsabhängiger Interaktionspartner von ADAP wurden SILAC-basierte differentielle *Pulldown*-Experimente in Kombination mit quantitativer Massenspektrometrie durchgeführt.

4.2.1 Interaktionspartner von ADAP-Y462

Der Tyrosinrest Y462 befindet sich in der Bindungsregion von CARMA1 (siehe Abbildung 6) [114]. Zudem liegt Y462 in einem multimerbildenden Sequenzbereich, der mit hoher Wahrscheinlichkeit eine *coiled-coil*-Struktur aufweist [128]. Ein möglicher Einfluss der Phosphorylierung von Y462 auf die Multimerisierung von ADAP sowie auf die Interaktion mit CARMA1 wäre daher ein interessanter Ausgangspunkt für weitere Experimente. So wäre es denkbar, dass die FYN-abhängige Phosphorylierung von Y462 eine Interaktion mit CARMA1 erschwert und ADAP hierdurch eher in den Pool gelangt, der im Komplex mit SKAP55 an der Integrinaktivierung beteiligt ist [77, 130].

Zur Ermittlung phosphorylierungsabhängiger Interaktionspartner wurde Y462 im Kontext eines synthetischen Peptids in SILAC-basierten *Pulldown*-Experimenten eingesetzt. Hierbei zeigten die Phospholipasen PLC γ 1 und PLC γ 2 sowie die regulatorische Untereinheit der Phosphoinositid-3-Kinase (PIK3R1) eine Anreicherung an die phosphorylierte Peptidsequenz, wobei PLC γ 2 schwächer angereichert war und mit einer deutlich geringeren Anzahl an Peptiden identifiziert und quantifiziert wurde (siehe Abbildung 10B und Tabelle 5). Alle drei Proteine verfügen jeweils über tSH2-Domänen, über die eine direkte Interaktion mit dem phosphorylierten Y462-Motiv (pY⁴⁶²EDI) denkbar ist.

Die Phospholipase PLC γ 1 befindet sich nach Aktivierung des TCRs außerdem in einem Signalkomplex mit ADAP, da sie über ihre tSH2-Domäne an phosphoryliertes LAT (Y¹³²LVV-Motiv) sowie über eine SH3-Domäne an SLP76 bindet [56-58, 229]. Zudem bindet ADAP über die hSH3^C-Domäne an das Phosphoinositid PIP2 [120], welches von PLC γ 1 in die Signalmoleküle (*second messenger*) DAG und IP3 gespalten wird. Eine Spaltung von PIP2 durch PLC γ 1 könnte daher zu einer Verringerung der Membranbindung von ADAP führen. Die mögliche Bindung der Phosphoinositid-3-Kinase an ADAP-Y462 hingegen könnte durch eine lokale Produktion von PIP3 einen gegenteiligen Effekt haben, da PIP3 ebenfalls von der hSH3^C-Domäne gebunden wird [120], jedoch kein Substrat für PLC γ 1 darstellt. Die Phosphoinositid-3-Kinase bindet über ihre N-terminale SH2-Domäne ebenfalls an zwei phosphorylierte Bindungsmotive (Y¹¹³ESP, Y¹²⁸ESP) des Adapterproteins SLP76 [230], so dass hierüber ebenfalls eine räumliche Nähe zu ADAP hergestellt wird. Sowohl PLC γ 1 als auch PIK3R1 wurden bereits an phosphorylierte ADAP-Peptide der Positionen Y595 (Y⁵⁹⁵DDV), Y625 (Y⁶²⁵DGI) und Y771 (Y⁷⁷¹DDI) angereichert [93, 143]. Eine direkte Interaktion der beiden Kandidaten mit ADAP ist bisher nicht belegt und sollte daher in zukünftigen Experimenten überprüft werden.

4.2.2 Interaktionspartner von ADAP-Y571

Der Tyrosinrest 571 stellt eine Besonderheit dar, da er am Rand der strukturierten ADAP-hSH3^N-Domäne lokalisiert ist. Ferner wurde er bereits in zahlreichen phosphoproteomischen Studien als stimulationsabhängige Phosphorylierungsstelle beschrieben, die innerhalb der ersten 10 Minuten nach Stimulation des TCRs ihren Höhepunkt erreicht (siehe Abschnitt 1.1.7) [124, 146-154]. Über den zellulären Phosphorylierungsgrad liegen hierbei keine Informationen vor, da in allen Studien eine Anreicherung der phosphorylierten Peptide durchgeführt wurde. Zur Ermittlung von phosphorylierungsabhängigen Interaktionspartnern wurde Y571 in der vorliegenden Arbeit sowohl als synthetisches Peptid als auch im Kontext der hSH3^N-Domäne von ADAP in *Pulldown*-Experimenten eingesetzt. Hierbei sollte geklärt werden, ob die Nähe von Y571 zur dreidimensionalen hSH3-Struktur einen Einfluss auf die Auswahl eines potentiellen Bindungspartners hat.

Peptid-Pulldown ADAP-Y571

Für das Y571-Peptid konnten als potentielle phosphorylierungsabhängige Binder die Adapterproteine CRK (Isoform CRKII) und CRKL sowie die Phospholipase PLC γ 1 (bereits im vorherigen Abschnitt diskutiert) identifiziert werden (siehe Abbildung 10A und Tabelle 4). Die Adapterproteine CRK (*CT10 regulator of kinase*) und CRKL (*CRK-like*) sind Mitglieder der CRK-Familie. Sie verfügen jeweils über zwei SH3-Domänen sowie eine N-terminale SH2-Domäne und kommen daher als primäre Bindungspartner von ADAP in Frage [231]. Die SH2-Domänen von CRK und CRKL weisen eine hohe Homologie auf und binden bevorzugt pYxxP-Motive. Über die intramolekulare Bindung eines pYxxP-Motivs wird hierbei die Bindung der SH2-Domäne an andere Proteine reguliert [232, 233]. In T-Zellen interagiert CRK nach TCR-Stimulation über die SH2-Domäne mit ZAP70 und der E3 Ubiquitin-Ligase CBL-B. Über die N-terminale SH3-Domäne wird zudem eine Bindung an die regulatorische Untereinheit der Phosphoinositid-3-Kinase (PIK3R1) vermittelt [40, 234, 235]. Die Bindung an ZAP70 (vermittelt über das Motiv pY³¹⁵ESP) ist hierbei wichtig für die Aktivierung von RAP1 und der hierüber vermittelten Erhöhung der zellulären Adhäsion, wobei die Kinaseaktivität von ZAP70 interessanterweise nicht benötigt wird [236]. CRKL bindet über die N-terminale SH3-Domäne konstitutiv an den GTP-Austauschfaktor C3G. Der CRKL-C3G-Komplex ist ebenfalls an der Aktivierung von RAP1 beteiligt, wobei die Bindung von CBL-B negativ regulatorisch wirkt [237, 238].

Eine direkte Interaktion zwischen ADAP mit CRK und CRKL wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben, ist jedoch aufgrund der gemeinsamen Funktion (Aktivierung von RAP1) wahrscheinlich. Darüber hinaus wurden CRK und CRKL ebenfalls an phosphorylierte ADAP-Peptide der Positionen Y595, Y625 und Y771 angereichert (siehe Abbildung 30B) [93, 143].

hSH3^N-Pulldown

Zur Ermittlung phosphorylierungsabhängiger Bindungspartner von ADAP-Y571 im Kontext der strukturierten hSH3^N-Domäne wurde diese als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und anschließend *in vitro* mit FYN-Kinase phosphoryliert. Auf diese Weise konnte eine selektive Phosphorylierung von Y571 mit einem Phosphorylierungsgrad von mehr als 70 % erreicht werden. Interessanterweise wurde dieser Phosphorylierungsgrad erst nach etwa 5 Tagen erreicht, während im Kontext von Volle-Länge-ADAP hierfür nur wenige Stunden nötig waren. Die deutlich höhere Phosphorylierungsrate im Kontext von Volle-Länge-ADAP liegt wahrscheinlich an der SH2-abhängigen Bindung von FYN an ADAP, die über die Phosphorylierung von ADAP-Y625 vermittelt wird [105, 106, 108, 109]. Somit könnte die Kolokalisation von Kinase und Substrat eine effizientere Phosphorylierung von Tyrosinresten ermöglichen, die strukturell weniger gut zugänglich sind wie beispielsweise Y571 in der hSH3^N-Domäne. Um dies zu überprüfen, könnte die Kinetik der Phosphorylierung einzelner Tyrosinreste zwischen ADAP-Wildtyp und einer Y625-Bindungsmutante verglichen werden. Untersuchungen zur Kinetik der *in vitro*-Phosphorylierung konnten einen solchen Mechanismus allerdings nicht bestätigen [111]. Da hierbei jedoch die Gesamtphosphorylierung eines ADAP-Konstruktes (486-783) untersucht wurde, wäre eine differenziertere Untersuchung einzelner Tyrosinreste mit Hilfe der hier verwendeten Methode sinnvoll.

Der Einsatz der phosphorylierten hSH3^N-Domäne in *Pulldown*-Experimenten mit Lysaten aus Jurkat T-Zellen führte zu einer starken Anreicherung von ZAP70 sowie einer schwächeren Anreicherung von SPATA13 (*spermatogenesis-associated protein 13*), CDK17 (*cyclin-dependent kinase 17*) und POM121C (*pore membrane protein of 121 kDa C*) (siehe Abbildung 12A und Tabelle 6). Hierbei wurde die Tyrosinkinase ZAP70 deutlich anhand der meisten Peptide identifiziert. Dies ist neben einer starken Bindung wahrscheinlich auch auf das hohe Expressionslevel der Kinase in Jurkat T-Zellen zurückzuführen [166]. Da SPATA13, CDK17 und POM121C im Gegensatz zu ZAP70 über keine SH2-Domänen verfügen, ist eine direkte Interaktion mit pY571 unwahrscheinlich. POM121C ist Bestandteil des Kernporenkomplexes und CDK17 gehört zur Gruppe der cyclinabhängigen Kinasen, die im Komplex mit Cyclinen den Zellzyklus kontrollieren. SPATA13 (alternativ: ASEF2; *adenomatous polyposis coli-stimulated GEF 2*) ist ein GTP-Austauschfaktor von GTPasen der RHO-Familie (z.B. RHO, RAC und CDC42) und ist durch deren Aktivierung an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts sowie der zellulären Adhäsion und Migration beteiligt [239, 240]. Untersuchungen zur spezifischen Funktion von POM121C, CDK17 und SPATA13 in T-Zellen liegen bisher nicht vor.

Zur Bestätigung der spezifischen Anreicherung von ZAP70 an die phosphorylierte hSH3^N-Domäne wurde das Experiment mit Zelllysat aus primären humanen T-Zellen wiederholt, wobei hier das ¹⁸O-Markierungsverfahren angewendet wurde.

Die Bestätigung der Ergebnisse mit primären Zelllysaten war wichtig, da die immortalisierte Jurkat T-Zelllinie durch die jahrzehntelange Kultivierung verschiedene Defekte bei der Genexpression akkumuliert hat. Nachgewiesen sind beispielsweise die fehlende Expression der wichtigen Lipidphosphatasen PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) und SHIP (*SH2-containing inositol phosphatase*) [241-243], was einen Überschuss an $PI(3,4,5)P_3$ und dadurch eine konstitutive Aktivierung des PIK3/AKT-Signalweges zur Folge hat [244].

Im Vergleich zu den *Pulldown*-Experimenten mit Jurkat T-Zellen wurden mit primären Zellen (trotz des Einsatzes vergleichbarer Zellmengen) deutlich weniger Proteine identifiziert und quantifiziert. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich an der deutlich geringeren Zellgröße von primären T-Zellen im Vergleich zu Jurkat T-Zellen. Die stärksten Anreicherungsfaktoren zeigten die Tyrosinkinasen ZAP70 und MATK (*megakaryocyte-associated tyrosine kinase*), wobei ZAP70 mit deutlich mehr Peptiden gefunden wurde (siehe Abbildung 12B und Tabelle 7). Ebenfalls angereichert waren die Lipidphosphatasen SHIP1 und SHIP2 sowie der Transkriptionsfaktor STAT5B (*signal transducer and activator of transcription 5B*). SHIP2 und STAT5B wurden dabei nur mit wenigen Peptiden gefunden und binden daher wahrscheinlich schwächer im Vergleich zu SHIP1. Da alle reproduzierbar angereicherten Proteine über SH2-Domänen verfügen, kommen sie als primäre Bindungspartner in Betracht. Der Transkriptionsfaktor STAT5B sowie die hämatopoetische Tyrosinkinase MATK (alternativ: HYL/CHK) wurden nicht weiter untersucht, da ihre Anreicherung in Jurkat T-Zellen nicht bestätigt wurde. Die Anreicherung von SHIP1 und SHIP2 hingegen ist interessant, da diese in Jurkat T-Zellen nicht exprimiert werden. Zur Bestätigung der phosphorylierungsabhängigen SHIP1/2-Interaktion sollte das Experiment mit Primärzellen daher wiederholt werden.

SHIP1 wird vor allem in hämatopoetischen Zellen exprimiert, während SHIP2 ubiquitär exprimiert wird [245]. Die Inositidphosphatase SHIP1 ist ein negativer Regulator des T-Zell-Signalweges, indem sie das Phosphoinositid $PI(3,4,5)P_3$ zu $PI(3,4)P_2$ hydrolysiert und somit als Gegenspieler von PI3K die PIP3-vermittelte Rekrutierung und Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase AKT (alternativ: Proteinkinase B) sowie die Aktivierung von ZAP70 negativ beeinflusst. SHIP1 wird hierbei stimulationsabhängig phosphoryliert und daraufhin mit anderen negativen Regulatoren wie dem Adapterprotein DOK1/2 (*downstream of tyrosine kinase*) an das LAT-GRB2-Signalosom rekrutiert [246, 247]. Zudem fungiert SHIP1 als negativer Regulator der CXCL12-vermittelten Migration, indem sie die lokale Produktion von PIP3 (durch PI3K) an der Front des Leitsaums (*leading edge*) von migrierenden Zellen negativ beeinflusst [248-250]. Eine phosphorylierungsabhängige Interaktion zwischen ADAP und SHIP1 könnte daher zur negativen Regulation der T-Zellaktivierung führen. Hierfür spricht auch die Beobachtung, dass es sich bei dem Y571-Bindungsmotiv (IDY⁵⁷¹DSL) um ein ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*)-Motiv (ITIM-Konsensus: S/I/V/LxYxxI/V/L) handelt, welches ebenfalls in zytoplasmatischen Bereichen von vielen Rezeptoren (z.B. im

CD3-Komplex) und anderen Adapterproteinen vorkommt [251]. Die Phosphorylierung dieser Motive im Zuge der T-Zellaktivierung ermöglicht die Rekrutierung von negativen Regulatoren (z.B. SHIP1 oder die Tyrosinphosphatasen SHP1/2), die daraufhin eine Abschaltung des Signalweges ermöglichen.

Eine Vorhersage der möglichen SH2-abhängigen Bindungspartner für Y571 mit Hilfe des SMALI-Algorithmus enthält interessanterweise ebenfalls SHIP2 [52]. Zusätzlich wurden die SH2-Domänen von CRK, BLNK, SHIP2, CRKL, TEC, SYK (N-terminal), YES und FYN als mögliche Bindungspartner vorhergesagt. Vor allem die N-terminale SH2-Domäne von SYK ist in diesem Zusammenhang interessant, da SYK und die hier angereicherte Tyrosinkinase ZAP70 gemeinsam zur Familie der SYK-Kinasen gehören und sich in ihrem Aufbau und ihrer Funktion stark ähneln. Die prognostizierte Anreicherung von CRK und CRKL konnte zudem im Peptid-*Pulldown* bestätigt werden.

Zusammenfassend konnte ein klarer Einfluss der hSH3^N-Domänenstruktur auf die Auswahl der pY571-abhängigen Bindungspartner festgestellt werden, so dass die im Peptid-*Pulldown* ermittelten potentiellen Bindungspartner CRK und CRKL und PLC γ 1 nicht weiter untersucht wurden. Der wahrscheinlichste Kandidat für eine direkte Interaktion mit der hSH3^N-Domäne ist die Tyrosinkinase ZAP70, da sie unter allen Bedingungen eine sehr hohe Anreicherung an die Y571-phosphorylierte hSH3^N-Domäne zeigte und zudem mit den meisten Peptiden identifiziert wurde.

4.2.3 Interaktionspartner von ADAP-600 und ADAP-dbl

Um die Bindung von ZAP70 auch im Kontext längerer ADAP-Konstrukte zu bestätigen, erfolgten zwei weitere *Pulldown*-Experimente mit den *in vitro* phosphorylierten ADAP-Konstrukten ADAP-600 und ADAP-dbl.

Das ADAP-600-Konstrukt (ADAP 486-600) ist ausgehend von der hSH3^N-Domäne bis zu der Aminosäureposition 600 verlängert und enthält neben Y571 das bekannte SLP76- und NCK-Bindungsmotiv Y⁵⁹⁵DDV [93, 108, 110]. Neben der Anreicherung von ZAP70 wurden daher erwartungsgemäß die Adapterproteine SLP76 und NCK phosphorylierungsabhängig angereichert (siehe Abbildung 13A und Tabelle 8). Ebenfalls angereichert wurden die Phospholipase PLC γ 1 sowie der GTP-Austauschfaktor VAV, die beide als Bindungspartner von SLP76 beschrieben sind [58, 85-88]. Die zusätzlich angereicherten Proteine CUL5, MAD2L1 und TCEB2 verfügen über keine SH2-Domäne und kommen daher nicht als primäre Bindungspartner in Frage.

Das ADAP-dbl-Konstrukt (ADAP 486-783) enthält, ausgehend von der hSH3^N-Domäne, den gesamten C-terminalen Bereich von ADAP einschließlich der C-terminalen hSH3-Domäne (hSH3^C). Zusätzlich verfügt es neben den beiden bekannten SLP76- sowie NCK-Bindungsmotiven Y⁵⁹⁵DDV (Y595) und Y⁶⁵¹DDV (Y651) über das FYN-Bindungsmotiv Y⁶²⁵DGI (Y625) [108]. Darüber hinaus enthalten sind die

C-terminal gelegenen Motive Y⁷⁷¹DDI (Y771) und Y⁷⁸⁰DND (Y780), von denen das Y771-Motiv bereits durch in Peptid-*Pulldown*-Experimenten untersucht wurde und zur phosphorylierungsabhängigen Anreicherung von CRK, CRKL, GADS, NCK1/2, PIK3R1, PLC γ 1 und SLP76 führte [143]. Im Vergleich zu den kürzeren ADAP-Konstrukten waren aufgrund der hohen Zahl an potentiellen Bindungsstellen erwartungsgemäß deutlich mehr Proteine angereichert (siehe Abbildung 13B und Tabelle 9). Von insgesamt 31 angereicherten Proteinen verfügten jedoch nur acht über SH2-Domänen und kamen somit als primäre Binder in Frage. Unter ihnen konnten die bereits mit den kürzeren Konstrukten angereicherten Proteine ZAP70, SLP76 und VAV3 bestätigt werden (Übersicht in Abbildung 30A). Zusätzlich wurden die Adapterproteine GADS und CRKL angereichert, die bereits in Peptid-*Pulldown*-Experimenten eine phosphorylierungsabhängige Bindung an Y771 zeigten. Exklusiv mit diesem Konstrukt angereichert wurden lediglich das Adapterprotein SLA (*SRC-like-adaptor protein 1*) sowie der Transkriptionsfaktor STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 5B*). Da fast alle in ADAP-dbl enthaltenen phosphorylierten Tyrosinreste bereits im Kontext kürzerer Konstrukte bzw. Peptidmotive untersucht wurden, könnte nach dem Ausschlussverfahren der Tyrosinrest 780 für eine direkte Interaktion mit SLA bzw. STAT1 in Frage kommen. Um dies zu überprüfen, ist die Durchführung eines weiteren Peptid-*Pulldowns* mit der Position Y780 sinnvoll.

Das Adapterprotein SLA (alternativ: SLAP) ist ein negativer Regulator des T-Zellsignalweges, indem es die Degradation von aktivierenden Tyrosinkinase wie beispielsweise ZAP70 begünstigt [252]. Hierfür bindet SLA nach TCR-Stimulation in einer Art Brückenfunktion über seine SH2-Domäne an ZAP70 und rekrutiert über seinen C-Terminus die E3 Ubiquitin-Ligase CBL. Neben einer Bindung an Y780 wäre eine indirekte Anreicherung über ZAP70 daher ebenfalls denkbar.

STAT1 gehört zu einer Gruppe von zytoplasmatischen Transkriptionsfaktoren (STAT 1-6), die nach Interferon-Stimulation über den JAK (*janus kinase*)-STAT-Signalweg phosphoryliert werden und daraufhin über ihre SH2-Domänen dimerisieren. Die STAT-Dimere translozieren in den Zellkern, wo sie durch Bindung an spezifische Promotorregionen die Genexpression regulieren. Eine Bindung zwischen STAT-Proteinen und ADAP ist bisher nicht bekannt. Da STAT1 in Jurkat T-Zellen jedoch in relativ hohen Konzentrationen vorliegt [166], könnte seine Anreicherung möglicherweise auch unspezifisch aufgrund der Auflösung der Zellkompartimentierung erfolgt sein.

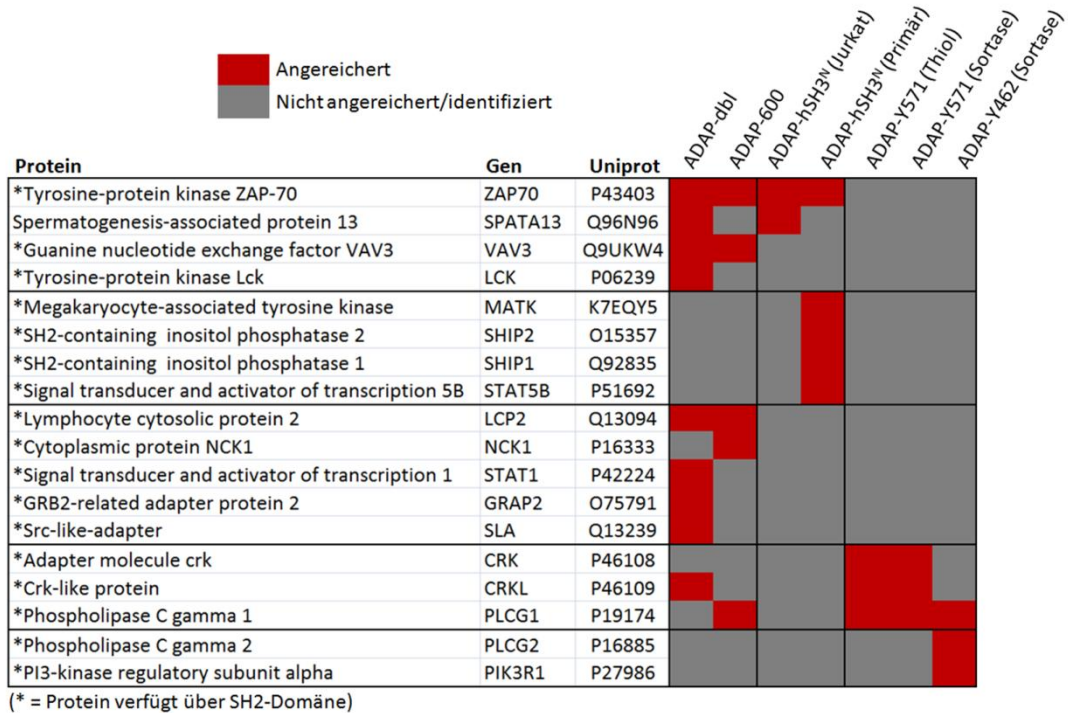
Obwohl das bekannte FYN-Bindungsmotiv Y⁶²⁵DGI (Y625) in ADAP-dbl enthalten war, konnte eine Anreicherung von FYN nicht beobachtet werden. Dies lag wahrscheinlich an dem relativ hohen Hintergrund an umarkierter FYN-Kinase, die für die *in vitro*-Phosphorylierung eingesetzt wurde und daher eine mögliche Anreicherung überdeckte. Hierfür spricht die Beobachtung, dass FYN-Kinase, analog zu den eingesetzten Köder-Proteinen, stets im "leichten" Zustand identifiziert wurde.

4.2.4 Übersicht phosphorylierungsabhängiger ADAP-Interaktionspartner

Eine Übersicht der reproduzierbar phosphorylierungsabhängig angereicherten Bindungspartner aller hier eingesetzten ADAP-Konstrukte und Peptide ist in Abbildung 30A dargestellt. Es wurden alle Proteine berücksichtigt, die über eine SH2-Domäne verfügen oder mindestens in zwei unabhängigen Experimenten phosphorylierungsabhängig angereichert waren. Abbildung 30B fasst zudem alle Proteine mit SH2-Domänen zusammen, die für die verschiedenen Tyrosinreste von ADAP phosphorylierungsabhängig angereichert wurden einschließlich der Erkenntnisse aus anderen Studien [93, 143, 145]. Hierbei wird deutlich, dass die meisten potentiellen Interaktionspartner (z.B. PLC γ 1, CRK und CRKL) über verschiedene Bindungsmotive angereichert werden, während andere Proteine eine spezifische Bindung an bestimmte Tyrosinreste zeigen. Hierunter befindet sich die Tyrosinkinase ZAP70, die eine spezifische Anreicherung an Y571 in allen Experimenten aufwies, in denen die hSH3^N-Domäne isoliert oder im Kontext eines längeren ADAP-Konstruktes eingesetzt wurde. Interessanterweise konnte ZAP70 nicht an das Y571-phosphorylierte Peptid angereichert werden, was auf einen Einfluss der Domänenstruktur auf die Interaktion hindeutet. Die im Peptid-*Pulldown* ermittelten Bindungspartner CRK, CRKL und PLC γ 1 wurden daher nicht weiter verfolgt. Vielmehr stellte sich die Frage, ob die Y571-Phosphorylierung die Domänenstruktur beeinflusst und ob eine direkte Interaktion mit ZAP70 vorliegt.

Alle durchgeführten *Pulldown*-Experimente wurden mit nichtstimulierten T-Zellen durchgeführt. Lediglich die eingesetzten ADAP-Konstrukte und Peptide waren phosphoryliert und repräsentierten somit den Zustand von ADAP nach T-Zellaktivierung. Es ist daher denkbar, dass eine Stimulation der Zellen zur Identifizierung weiterer Interaktionspartner führt, indem beispielsweise autoinhibierte Konformationen potentieller Bindungspartner durch Phosphorylierung aufgehoben werden. Ein direkter Vergleich der Interaktionspartner von nichtstimulierten und stimulierten Zellen wäre daher in zukünftigen Experimenten interessant.

A



B

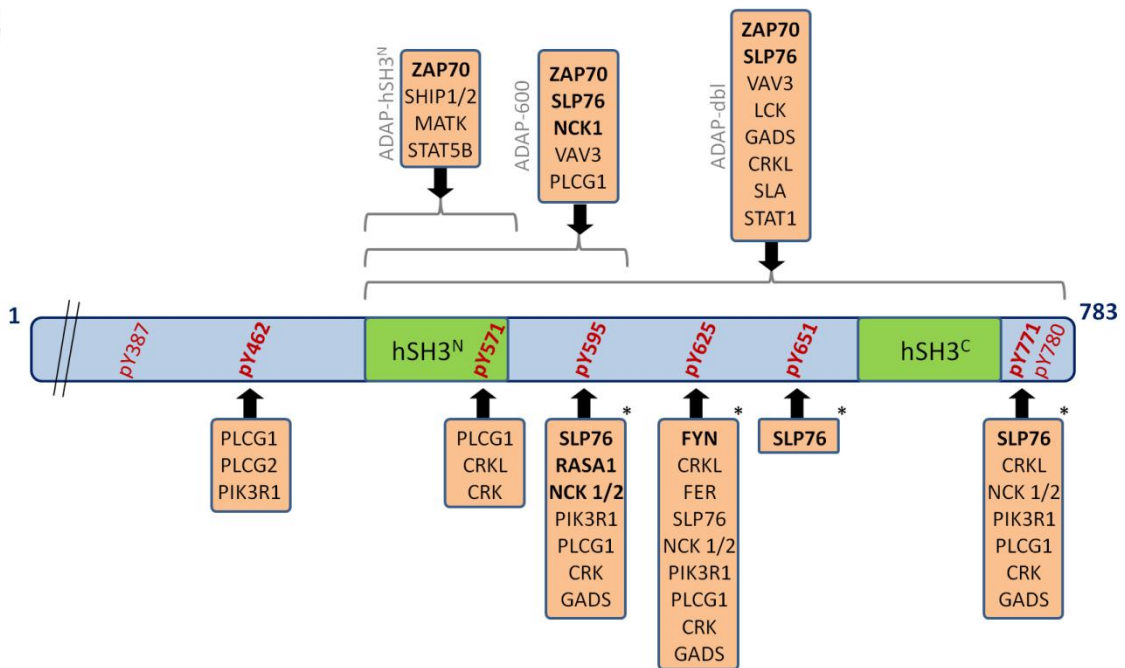


Abbildung 30: Übersicht der phosphorylierungsabhängigen Interaktionspartner des Adapterproteins ADAP. (A) In dieser Arbeit ermittelte Interaktionspartner aus *Pulldown*-Experimenten mit verschiedenen ADAP-Konstrukten und Peptiden. (B) Schematische Darstellung von ADAP mit den ermittelten FYN-abhängigen Phosphorylierungsstellen (rot) in unstrukturierten (hellblau) und strukturierten Bereichen (grün). Die mit Hilfe von *Pulldown*-Experimenten ermittelten Interaktionspartner (mit SH2-Domänen) sind oberhalb (Protein-Konstrukte) und unterhalb (Peptide) dargestellt, wobei Ergebnisse aus fremden Arbeiten mit Sternchen markiert sind [93, 143, 145]. Mit Hilfe weiterer Methoden validierte Interaktionspartner sind fett geschrieben.

4.3 Charakterisierung und Validierung der ADAP-ZAP70-Interaktion

Zur Validierung einer direkten Interaktion zwischen ADAP-hSH3^N und ZAP70 wurde die NMR-Spektroskopie eingesetzt. Hierbei konnte zunächst gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der ADAP-hSH3^N-Domäne an Y571 keinen Einfluss auf die Domänenstruktur hatte, da nur Reste in räumlicher Nähe von Y571 beeinflusst waren (siehe Abschnitt 3.3.1). Eine Bindung von ZAP70 aufgrund einer durch die Phosphorylierung induzierten Strukturänderung, wie sie beispielsweise durch die Oxidation der Domäne hervorgerufen wird [118], kann daher ausgeschlossen werden.

Für die Bindungsstudien wurde ein ZAP70-Konstrukt (ZAP70-tSH2) eingesetzt, welches über die beiden SH2-Domänen von ZAP70 verfügt, die auch für die Bindung an doppelt phosphorylierte ITAM-Sequenzen (YxxL/I-X_{6,8}-YxxL/I; [31]) verantwortlich sind (siehe Abschnitt 1.1.5). Der Tyrosinrest Y571 befindet sich im Sequenzmotiv Y⁵⁷¹DSL, welches somit einem unvollständigen ITAM-Motiv entspricht. Tatsächlich konnte eine direkte Interaktion zwischen phosphorylierter hSH3^N-Domäne und ZAP70-tSH2 bestätigt werden, wobei vor allem die N-terminale SH2-Domäne von ZAP70 für die Bindung verantwortlich war.

Auf Seiten der phosphorylierten hSH3^N-Domäne führte die Bindung zu einem signifikanten Intensitätsverlust der Reste, die bereits durch die Phosphorylierung beeinflusst waren, während der größte Teil der Signale unverändert blieb. Diese Beobachtung spricht für ein begrenztes Bindungsepitop in räumlicher Nähe zu pY571. Dies ist ungewöhnlich, da ZAP70 in den *Pulldown*-Experimenten keine Anreicherung an die phosphorylierte Peptidsequenz von Y571 zeigte. Die spezifische Erkennung der hSH3^N-Domäne muss daher (neben der Phosphorylierung) auf wenigen zusätzlichen Interaktionen mit ZAP70-tSH2 beruhen, die nur im Kontext der dreidimensionalen Struktur der Domäne möglich sind. Hierfür kommen vor allem die durch die Bindung von ZAP70-tSH2 stark beeinflussten Reste L515 und A516 in Frage, da diese im Peptid nicht enthalten sind, jedoch in der Domäne in räumlicher Nähe zu Y571 liegen. Neben dieser positiven Selektion wäre es zudem denkbar, dass die Oberflächenstruktur der hSH3^N-Domäne in der Nähe zu Y571 deselektierend auf die Bindung bestimmter SH2-Domänen (z.B. von CRK und CRKL) wirkt und somit ebenfalls zur Spezifität für bestimmte SH2-Domänen beiträgt.

Auf Seiten von ZAP70-tSH2 zeigten vor allem die Resonanzen R17 und L40 aus der N-terminalen SH2-Domäne (SH2^N) einen starken Intensitätsverlust im Zuge der Bindung an die phosphorylierte hSH3^N-Domäne. Interessanterweise konnten Folmer *et al.* dieselben Änderungen im Spektrum von ZAP70-tSH2 bei der Zugabe von einfach phosphorylierten Tetrapeptiden (pYNEL oder pYDVL) des ersten ITAM-Motivs (ITAM1) der ζ-Kette nachweisen [35]. Die Zugabe eines Peptids mit vollständiger ITAM1-Sequenz (LpYNELNLGRREEpYDVLD) führte hingegen zu einer Beeinflussung fast aller Signale im Spektrum, die durch eine starke Konformationsänderung der SH2-Domänen sowie der Linkerregion (Interdomäne A) hervorgerufen wird und im Kontext des Gesamtproteins zur

Aktivierung der Kinase führt [35, 36]. Die von Hatada *et al.* publizierte Kristallstruktur von ZAP70-tSH2 im Komplex mit einem phosphorylierten ITAM-Peptid zeigt zudem, dass die Bindungstasche von ZAP70-SH2^N unvollständig ist und erst durch die Interaktion mit ZAP70-SH2^C komplettiert wird, während die Bindungstasche von ZAP70-SH2^C unabhängig ist [36]. Das aktuelle Modell geht von einer kooperativen Bindung aus, bei dem zunächst ZAP70-SH2^N mit geringer Affinität an das C-terminale Phosphotyrosin des ITAM-Motivs (pYDVL) bindet, während die Bindungstasche in ZAP70-SH2^C in einer geschlossenen Konformation vorliegt [35, 44]. Daraufhin kommt es zu einer Konformationsänderung von ZAP70-SH2^C, die zur Bindung des N-terminalen pYNEL-Motivs führt und gleichzeitig zu einer Vervollständigung der N-terminalen Bindungstasche. Die Reste R17 und L40 in ZAP70-SH2^N sind hierbei direkt in der Bindungstasche lokalisiert, wobei R17 über Wasserstoffbrücken mit der Phosphatgruppe interagiert. Die hier beobachtete Beeinflussung dieser Positionen im NMR-Spektrum kann somit mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Bindung von ZAP70-SH2^N an die einfach phosphorylierte hSH3^N-Domäne zurückgeführt werden. Da dies allein jedoch nicht zur Aktivierung der Kinase führt, stellte sich die Frage, ob ein weiteres unvollständiges ITAM-Motiv in der ADAP-Sequenz vorliegt und so zu einer vollständigen Bindung und Aktivierung von ZAP70-tSH2 führen könnte. NMR-Untersuchungen mit dem ADAP-600-Konstrukt, das ausgehend von der hSH3^N-Domäne um das phosphorylierte Motiv Y⁵⁹⁵DDV verlängert war, zeigten jedoch keine Unterschiede im Spektrum von ZAP70-tSH2 (Daten nicht dargestellt). Dies liegt möglicherweise an dem hohen Abstand der beiden Tyrosinreste. Zudem stimmt die Sequenz des Motivs Y⁵⁹⁵DDV nicht mit der ITAM-Sequenz überein. Betrachtet man die anderen Tyrosinreste in ADAP, so sind die Motive Y⁶²⁵DGI und Y⁷⁷¹DDI, bezogen auf ihre Sequenz, mit einem ITAM-Motiv kompatibel. Der große Abstand zu Y571 würde eine Interaktion jedoch nur unter der Ausbildung einer Schleifenstruktur von ADAP ermöglichen. Der ebenfalls in hSH3^N lokalisierte Tyrosinrest 559 bildet zwar mit dem hier untersuchten Y571 ein vollständiges ITAM-Motiv (Y⁵⁵⁹GYIKTTAVEIDY⁵⁷¹DSL), befindet sich jedoch im Gegensatz zu einem unstrukturierten ITAM-Motiv inmitten der strukturierten Domäne. Darüber hinaus konnte eine *in vitro*-Phosphorylierung von Y559 durch FYN-Kinase nicht nachgewiesen werden. Eine Phosphorylierung dieser Position durch eine andere Kinase *in vivo* ist jedoch nicht auszuschließen.

Zusammenfassend konnte mit Hilfe der NMR-Spektroskopie eine direkte Interaktion zwischen phosphorylierter ADAP-hSH3^N-Domäne und ZAP70-tSH2 belegt werden. Die beobachteten Intensitätsverluste der an der Bindung beteiligten Signale deuteten zudem auf mittlere Austauschraten (bezogen auf die NMR-Zeitskala) des Komplexes hin, was auf eine Bindungsaffinität im niedrigen mikromolaren Bereich schließen lässt.

MST-Untersuchungen

Mit Hilfe von MST-Untersuchungen konnte für die Interaktion zwischen phosphorylierter hSH3^N-Domäne und ZAP70-tSH2 eine mittlere Bindungsaffinität ($K_D = 2,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$) ermittelt werden (siehe Abschnitt 3.3.2), die mit den beobachteten Austauschraten der NMR-Untersuchungen vereinbar ist. Die von O'Brien *et al.* mittels Isothermer Titrationskalorimetrie bestimmte Dissoziationskonstante von ZAP70-tSH2 für das doppelt phosphorylierte (pY110 und pY122) ITAM3-Motiv der ζ -Kette liegt bei 32 nM, so dass die Affinität im Gegensatz zur Interaktion mit hSH3^N um mehrere Größenordnungen höher liegt [253]. Die Dissoziationskonstanten für das einfach phosphorylierte ITAM3-Motiv liegen hingegen nur bei 143 μM (pY110) und 333 μM (pY122), was einer deutlich schwächeren Bindung im Vergleich zur ADAP-hSH3^N-Domäne entspricht. Diese Beobachtung und die fehlende Anreicherung von ZAP70 an das Y571-Peptidmotiv deuten indirekt auf zusätzliche Interaktionen zwischen der phosphorylierten hSH3^N-Domäne und ZAP70-tSH2 hin, die über das reine Bindungsmotiv pY⁵⁷¹DSL hinausgehen. Um dies direkt nachzuweisen wäre es interessant, die Struktur des ADAP-hSH3^N/ZAP70-tSH2-Komplexes aufzuklären. Aufgrund der Komplexgröße von etwa 40 kDa ist eine Strukturaufklärung mittels NMR möglicherweise schwierig, so dass alternativ eine Kristallstrukturanalyse durchgeführt werden könnte. Hierfür müssten allerdings erst Bedingungen ermittelt werden, bei denen der Komplex kristallisiert.

Co-Immunopräzipitationen des ADAP-ZAP70-Komplexes

Zum Nachweis einer direkten Interaktion zwischen ADAP und ZAP70 im zellulären Kontext wurden Co-Immunopräzipitationen durchgeführt. Nach Stimulation des T-Zell- oder Chemokinrezeptors (CXCR4) konnte hierbei eine stimulationsabhängige Interaktion der beiden Proteine eindeutig nachgewiesen werden. Diese erreichte innerhalb von fünf Minuten nach TCR-Stimulation bzw. eine Minute nach Chemokinstimulation ihren Höhepunkt (siehe Abbildung 19A). Weiterführende Experimente durch die Arbeitsgruppe von Dr. Stefanie Kliche zeigten zudem, dass eine Mutation des Tyrosinrestes Y571 in ADAP (zu einem nicht-phosphorylierbaren Phenylalanin) die induzierbare Interaktion mit ZAP70 ausschließlich nach Chemokinstimulation, jedoch nicht nach TCR-Stimulation verhinderte (Daten nicht dargestellt). Zudem konnte ausschließlich nach TCR-Stimulation eine Phosphorylierung von ZAP70 an der stimulatorisch wirkenden Position Y319 nachgewiesen werden [38].

Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass ADAP-Y571 nach Chemokinstimulation auch *in vivo* eine direkte Interaktion mit ZAP70 vermittelt. Da keine Phosphorylierung von ZAP70 an der aktivierenden Position Y319 nachgewiesen werden konnte, ist zudem von einer inaktiven Konformation der ADAP-gebundenen Kinase auszugehen. Diese Beobachtung korreliert mit den

NMR-Untersuchungen, die ebenfalls für eine inaktive Konformation von ZAP70-tSH2 im Komplex mit der phosphorylierten hSH3^N-Domäne sprechen.

Im Gegensatz zur Chemokinstimulation hatte die Y571F-Mutante nach TCR-Stimulation keinen Einfluss auf die ADAP-ZAP70-Interaktion (Daten nicht dargestellt). Zudem deutete die Phosphorylierung der präzipitierten Kinase an Y319 auf eine Aktivierung hin. Beide Beobachtungen sprechen gegen eine direkte Interaktion zwischen ADAP und ZAP70 und stattdessen für die kanonische Signaltransduktion über den TCR, bei der ZAP70 an die phosphorylierten ITAM-Motive bindet und daraufhin aktiviert wird (siehe Abschnitte 1.1.5 und 1.1.6). Die beobachtete Kopräzipitation von ADAP und ZAP70 fünf Minuten nach TCR-Stimulation ist somit wahrscheinlich auf die Isolierung des größeren Signalkomplexes zurückzuführen, der sich nach Aktivierung von ZAP70 an der Zellmembran assembliert und wichtige Adapterproteine wie beispielsweise LAT, SLP76 und ADAP enthält [8, 48, 73]. Der deutliche Affinitätsunterschied zwischen der ZAP70-Bindung an die ITAM-Motive (nanomolare Affinität, [253]) im Vergleich zu der Bindung an ADAP-hSH3^N (mikromolare Affinität) spricht ebenfalls gegen eine direkte Interaktion im Kontext der phosphorylierten ITAM-Motive nach TCR-Stimulation. Darüber hinaus konnte eine Y571-unabhängige Bindung von ZAP70 an ADAP in *Peptid-Pulldown*-Experimenten mit anderen bekannten ADAP-Phosphorylierungsstellen nicht nachgewiesen werden [93, 143].

Es ist davon auszugehen, dass die induzierbare Interaktion zwischen ADAP und ZAP70 nach Chemokinstimulation über eine Phosphorylierung von ADAP-Y571 vermittelt wird. Mit Hilfe der Massenspektrometrie konnte eine Phosphorylierung von ADAP-Y571 eindeutig bestätigt werden. Die Phosphorylierungsgrade lagen im Bereich von 2-3 %, wobei keine signifikante Erhöhung durch die Stimulation beobachtet wurde. Es ist jedoch zu beachten, dass sich der ermittelte Phosphorylierungsgrad auf die Gesamtheit des zellulären ADAP bezieht. Es ist daher durchaus vorstellbar, dass sich der Phosphorylierungsgrad eines kleinen, funktionell relevanten ADAP-Pools deutlich stärker ändert. Um eine sensitivere und einfachere Quantifizierung zu ermöglichen, wäre daher die Herstellung eines phosphospezifischen Antikörpers gegen die Position ADAP-571 für zukünftige Experimente sinnvoll.

4.4 Funktionelle Bedeutung der ADAP-ZAP70-Interaktion

Zur Ermittlung der funktionellen Bedeutung von ADAP-Y571 wurden weiterführende Studien durch die Arbeitsgruppe von Dr. Stefanie Kliche in Magdeburg durchgeführt, die hier kurz dargestellt werden sollen. Alle Untersuchungen erfolgten mit Jurkat T-Zellen, in denen über ein Suppressions- und Re-Expressionssystem das gewünschte ADAP-Konstrukt in physiologischen Mengen re-exprimiert wurde, während endogenes ADAP durch Expression einer *short hairpin RNA* (shRNA) mittels

RNA-Interferenz (RNAi) herunterreguliert wurde. Neben dem Leervektor (shC) zur Kontrolle wurden drei weitere Vektoren verwendet, bei denen endogenes ADAP jeweils supprimiert wurde, während kein Protein (shADAP), ADAP-Wildtyp (shADAP WT) oder ADAP-Y571F (shADAP Y571F) re-exprimiert wurde. Da ADAP entscheidend an der stimulationsabhängigen Integrinaktivierung beteiligt ist (siehe Abschnitt 1.1.6), standen die hierüber vermittelten Prozesse Adhäsion, Migration und Konjugatbildung im Fokus. Zunächst wurde die Adhäsionsfähigkeit an ICAM-1-beschichtete Platten sowie die Fähigkeit zur Konjugatbildung mit Antigen-beladenen Raji B-Zellen untersucht, wobei kein Einfluss der Mutation von ADAP-Y571 unabhängig von den Stimulationsbedingungen (TCR oder CXCR4) beobachtet wurde (Daten nicht dargestellt). Die Suppression von endogenem ADAP hingegen führte erwartungsgemäß zu signifikanten Defekten in der Adhäsion und Konjugatbildung, wie bereits zuvor beschrieben (siehe Abschnitt 1.1.6) [73, 112, 196, 254].

Als nächstes wurde ein möglicher Einfluss von ADAP-Y571 auf die Migration entlang eines Chemokingradienten untersucht. Hierfür wurden Jurkat T-Zellen mit den Suppressions- und Re-Expressionsvektoren transfiziert und anschließend in die obere Kammer eines *transwell-chambers* gegeben. Nach zwei Stunden wurde der prozentuale Anteil an Zellen bestimmt, die aus der oberen in die untere Kammer migriert waren (Abbildung 31A).

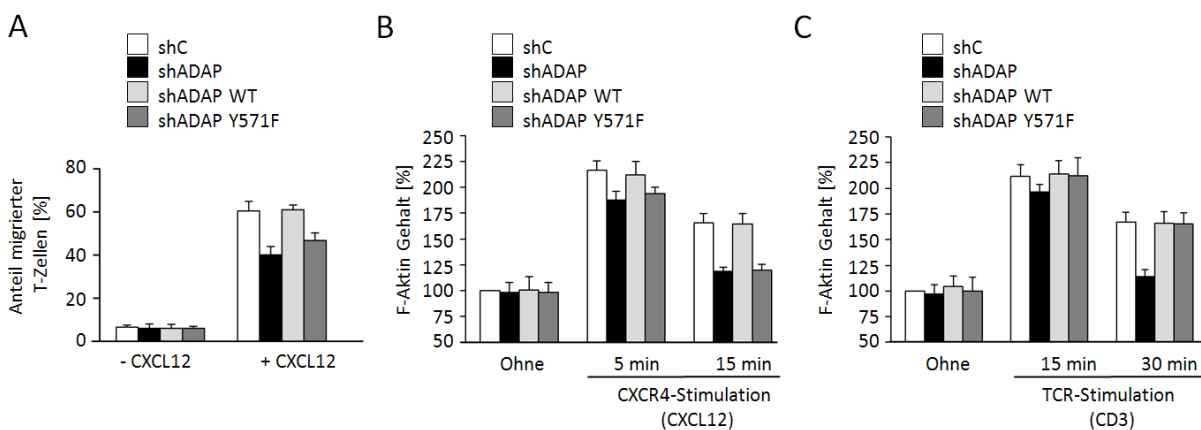


Abbildung 31: Einfluss von ADAP-Y571 auf die Migration und Aktin-Polymerisation von Jurkat T-Zellen. (A) Untersuchung der Migration in einer Migrationskammer 48 Stunden nach Transfektion. Der prozentuale Anteil migrierter Zellen innerhalb von zwei Stunden aus der oberen in die untere Kammer ist dargestellt mit und ohne Zugabe von CXCL12 (CXCR4). **(B,C)** Untersuchung des F-Aktin-Gehaltes nach Stimulation mit CXCL12 (CXCR4) **(B)** oder anti-CD3 (TCR) **(C)**. Die Zellen wurden nach der Stimulation fixiert und permeabilisiert. Der Anteil an F-Aktin wurde nach Anfärbung mit Alexa633-konjugiertem Phalloidin mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die dargestellten Werte stellen die durchschnittliche Fluoreszenzintensität aus drei unabhängigen Messungen dar, wobei eine Normalisierung anhand der shC-transfizierten Zellen (=100 %) erfolgte.

Unstimulierte Zellen zeigten hierbei eine Migration von etwa 10 %, während die Zugabe des Chemokins CXCL12, welches durch die Bindung an den Chemokinrezeptors CXCR4 die Chemotaxis von T-Zellen auslöst [16, 66], zu einem Anstieg auf etwa 60 % führte. Die Suppression von endogenem ADAP (shADAP) führte erwartungsgemäß zu einer signifikanten Reduktion der Migration,

wobei dieser Defekt durch Re-Expression von ADAP-Wildtyp (shADAP WT) vollständig aufgehoben wurde. Interessanterweise war die Y571F-Mutante (shADAP Y571F) hierzu nicht in der Lage, sondern zeigte eine signifikante Reduktion der Migration vergleichbar mit der Suppression von ADAP (Abbildung 31A).

Da die Migration mit starken Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts einhergeht [140], wurde zusätzlich der Gehalt an polymerisiertem Aktin (F-Aktin) in Abhängigkeit der Stimulation des Chemokinrezeptors bestimmt. Die Anfärbung des Aktin-Cytoskeletts erfolgte mit Alexa633-konjugiertem Phalloidin, einem Phallotoxin des grünen Knollenblätterpilzes, das hochspezifisch und irreversibel an Aktinfilamente bindet. Nach Stimulation mit CXCL12 für fünf Minuten zeigten die Kontrollzellen (shC) einen starken Anstieg des F-Aktingehaltes um mehr als das Doppelte sowie eine leichte Abnahme bei 15 Minuten (Abbildung 31B). Die Suppression von ADAP führte zu einer signifikanten Reduktion des F-Aktingehaltes, welche durch die Re-Expression von ADAP-WT vollständig aufgehoben wurde. Die Re-Expression von ADAP-Y571F hingegen zeigte ebenfalls einen signifikanten Defekt der Aktin-Polymerisation, der bei 15 Minuten am stärksten ausgeprägt war und dasselbe Level der ADAP-supprimierten Zellen (shADAP) erreichte. Die Stimulation des TCRs mit einem gegen CD3 gerichteten Antikörper zeigte ebenfalls einen starken Anstieg der Aktin-Polymerisation, der durch Suppression von ADAP signifikant reduziert wurde (Abbildung 31C). Im Gegensatz zur Chemokinstimulation führte die Re-Expression beider Konstrukte, ADAP-WT sowie ADAP-Y571F, zu einer vollständigen Aufhebung dieses Defekts. Auch war eine etwas verspätete Kinetik der Aktin-Polymerisation zu beobachten.

Zusammengefasst konnte mit Hilfe der funktionellen Untersuchungen ein spezifischer Einfluss von ADAP-Y571 auf die chemokinabhängige Migration und Aktin-Polymerisation nachgewiesen werden, während Adhäsion (an ICAM-1), Konjugatbildung und die TCR-vermittelte Aktin-Polymerisation unbeeinflusst waren. Eine direkte Interaktion zwischen ADAP und ZAP70 ist nach Chemokinstimulation vorstellbar, da die ITAM-Motive des TCR-CD3-Komplexes (im Gegensatz zur TCR-Stimulation) hierbei nur schwach phosphoryliert vorliegen [255]. So sollte zumindest ein Teil von ZAP70 für eine Interaktion mit ADAP-Y571 zur Verfügung stehen. Untersuchungen mittels quantitativer Massenspektrometrie konnten zudem ein hohes Expressionslevel von ZAP70 in Jurkat T-Zellen nachweisen [166], so dass mehrere ZAP70-Pools in der Zelle denkbar sind.

Die Möglichkeit einer direkten Interaktion zwischen ADAP und ZAP70 wird dadurch gestützt, dass beide Proteine nach CXCR4-Stimulation in einem gemeinsamen Komplex mit CBL, CBL-B, CRKL, NCK und PLC γ 1 nachgewiesen wurden [256]. Zudem weisen mehrere Studien darauf hin, dass ZAP70 an der chemokinvermittelten Migration sowie der Adhäsion von T-Zellen beteiligt ist [257-259]. So konnten Lin *et al.* nachweisen, dass aktive ZAP70 nach CXCR4-Stimulation mit TALIN interagiert und die Adhäsion über die Aktivierung von β 1-Integrin reguliert [257]. Interessanterweise war ZAP70

hierbei ausschließlich für die gerichtete Migration entlang eines Chemokingradienten wichtig, jedoch nicht für die ungerichtete Bewegung (*random walk*). Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Mutation von ADAP-Y571 (bzw. die darüber vermittelte Interaktion mit ZAP70) ebenfalls ausschließlich einen Einfluss auf die gerichtete Migration zeigte. Untersuchungen von Garcia-Bernal *et al.* zeigten ebenfalls eine Beteiligung von ZAP70 und TALIN bei der Integrinaktivierung [100]. Die Aktivierung von ZAP70 etwa fünf Minuten nach CXCR4-Stimulation führte hierbei zur Phosphorylierung von VAV1, das in einem Komplex mit TALIN vorlag, woraufhin dieser VAV1-TALIN-Komplex dissoziierte und TALIN die Aktivierung des Intergrins $\alpha 4\beta 1$ vermittelte. Baker *et al.* konnten zudem nachweisen, dass die zelluläre Adhäsion über den *outside-in*-Signalweg von Mikroclustern abhängt, die sich aus ADAP, ZAP70, SLP76 und LCK zusammensetzen [104]. Eine Beteiligung von ZAP70 im *outside-in*-Signalweg wurde ebenfalls von Evans *et al.* bestätigt [98]. Durch die extrazelluläre Bindung von LFA-1 kam es hierbei zur Aktivierung von ZAP70, die bereits in einem konstitutiven Komplex gemeinsam mit LCK an LFA-1 gebunden vorlag. Daraufhin wurde eine Kollokalisierung mit TALIN und dem Aktin-Zytoskelett beobachtet, was zum Übergang von LFA-1 in die hochaffine Konformation führte [98]. Eine Entfernung von ZAP70 hatte Migrations- sowie Adhäsionsdefekte zur Folge, wohingegen sich die Überexpression von ZAP70-tSH2 inhibitorisch auf die Migration auswirkte [98].

Zusammengefasst ist eine Aktivierung von ZAP70 bei der chemokinvermittelten Migration sowie der Integrinaktivierung über LFA-1 hinreichend belegt. Somit ist davon auszugehen, dass der hier beobachtete "inaktive" ADAP-ZAP70-Komplex nicht direkt an den beobachteten Effekten beteiligt ist. Es ist jedoch denkbar, dass die stimulationsabhängige Phosphorylierung von ADAP-Y571 eine ITAM-unabhängige Rekrutierung von ZAP70 an die Plasmamembran ermöglicht, wobei eine membranständige Lokalisation von ADAP wahrscheinlich über die Interaktion mit SKAP55 (über dessen PH-Domäne) sowie die hSH3^C-Domäne vermittelt wird [77, 119, 120, 132]. Erst die Dissoziation dieses kurzlebigen ADAP-ZAP70-Komplexes an der Plasmamembran (bereits nach einer Minute) könnte daraufhin zur Aktivierung von ZAP70 führen, wahrscheinlich über die Bindung an einen bisher unbekanntem Interaktionspartner. Die von Garcia-Bernal *et al.* beobachtete Aktivierung von ZAP70 etwa fünf Minuten nach CXCR4-Stimulation [100], also nachdem der ADAP-ZAP70-Komplex bereits dissoziiert ist, stimmt mit dieser Hypothese überein.

Auch ADAP-Y571 könnte nach Dissoziation des ADAP-ZAP70-Komplexes weitere Interaktionen vermitteln. Als Kandidaten kommen vor allem die Lipidphosphatasen SHIP-1 und SHIP-2 in Frage, die in den *Pulldown*-Experimenten mit primären T-Zelllysaten neben ZAP70 ebenfalls stark angereichert waren. Ihre Funktion als negative Regulatoren der chemokinvermittelten Migration, die bereits weiter oben diskutiert wurde, könnte beispielsweise zu einer verzögerten Abschaltung des

Signalweges führen. Die Validierung einer möglichen ADAP-SHIP-Interaktion stellt einen interessanten Ausgangspunkt für zukünftige Experimente dar.

Zur besseren Untersuchung der funktionellen Bedeutung von ADAP-Y571 *in vivo* könnte zudem eine entsprechende Mutante in immundefizienten Mäusen über eine retrovirale Rekonstitution des Knochenmarks exprimiert werden [260]. Hierzu müssten Knochenmarks-Stammzellen aus ADAP-Knockout-Mäusen zunächst mit den entsprechenden Konstrukten retroviral transduziert und anschließend in Mäuse eingepflanzt werden, deren Immunsystem zuvor durch eine Bestrahlung zerstört wurde. Die aus diesen Mäusen isolierten primären T-Zellen könnten daraufhin beispielsweise auf ihre Fähigkeit zur Adhäsion, Migration und Aktin-Polymerisation untersucht werden, ohne dass ein Hintergrund an endogenem ADAP vorliegt. Darüber hinaus wären direkte *in vivo*-Untersuchungen wie beispielsweise zur Migration der T-Zellen in die sekundären lymphatischen Organe möglich.

4.5 Sortase A-vermittelte Immobilisierung für *Pulldown*-Experimente

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein Verfahren zur kovalenten und gerichteten Immobilisierung von synthetischen Peptiden sowie rekombinant hergestellten Proteinen mittels Sortase A entwickelt, um diese anschließend als Köder in AP-MS-Experimenten einzusetzen. Durch eine kovalente Immobilisierung sollte hierbei eine Entfernung der hoch abundanten Köderproteine aus der Präparation erreicht werden, um die Identifizierung vor allem niedrig abundanter Bindungspartner mit Hilfe der Massenspektrometrie zu erleichtern. Durch eine gerichtete Ligation der Köderproteine (über ihren C-Terminus) an die Trägermatrix sollte zudem einem möglichen Funktionsverlust aufgrund der Immobilisierung vorgebeugt werden.

Die Immobilisierung an eine Nukleophil-beladene Agarosematrix wurde zunächst in Testreihen mit Hilfe eines Modellpeptids optimiert, so dass robuste Bedingungen mit einer maximalen Ligationsausbeute von etwa 0,5 µg/µL ermittelt werden konnten. Die Erhöhung der Linkerlänge des immobilisierten Nukleophil-Peptids zeigte keinen Einfluss auf die Ligationsausbeute, so dass von einer sterischen Begrenzung der Beladung ausgegangen werden kann. Dies hat zur Folge, dass die Beladung (bezogen die Stoffmenge) mit zunehmendem Molekulargewicht des Substrats proportional abnimmt. Bei der Verwendung großer Substratproteine könnte dies durch die Verwendung einer höheren Menge an Trägermaterial kompensiert werden.

Zudem wurde ein effizientes Verfahren entwickelt, mit dem erstmals eine absolute Quantifizierung der Ligationsausbeute der Sortase A-vermittelten Immobilisierung möglich ist. Durch den Einsatz einer universell einsetzbaren Nukleophil-beladenen Trägermatrix sowie der Quantifizierung über ein universell einsetzbares Referenzpeptid, kann das entwickelte Verfahren leicht auf andere

Anwendungen übertragen werden, bei denen eine kovalente und gerichtete Immobilisierung von Interesse ist.

Anschließend wurde die Anwendbarkeit der Sortase A-vermittelten Immobilisierung für SILAC-basierte AP-MS-Experimente evaluiert. In Pilotexperimenten mit synthetisch hergestellten ADAP-Peptiden konnte das Verfahren erfolgreich zur Ermittlung phosphorylierungsabhängiger Interaktionspartner eingesetzt werden. Ein Vergleich der ermittelten Interaktionspartner (für das ADAP-Y571-Motiv) mit einer bisher verwendeten Peptid-Immobilisierungstechnik (Thiolkopplung) erbrachte dieselben Bindungspartner und bestätigte somit grundsätzlich die Anwendbarkeit der neuen Methode.

Als nächstes wurde die Sortase A-vermittelte Immobilisierung zur Ermittlung von PRS-abhängigen Bindungspartnern der GYF-Domäne des spliceosomalen Proteins CD2BP2 angewendet. Im Vergleich zu der bisher verwendeten Methode, bei der die Immobilisierung über einen GST-*tag* erfolgte, konnten mit der neuen Methode insgesamt deutlich mehr Proteine identifiziert und quantifiziert werden, was vor allem auf die Entfernung des Köderproteins aus der Präparation zurückzuführen war. Die Anzahl der potentiellen Bindungspartner (spliceosomale Proteine und Proteine mit GYF-Bindungsmotiven) konnte mit Hilfe der neuen Methode ebenfalls deutlich gesteigert werden. So konnten im Vergleich zu dem „GST-Ansatz“ beispielsweise zusätzlich die spliceosomalen Proteine SmE (RUXE), SmG (RUXG), LSM3, LSM6, U2-SF3b14b (PHF5A), U5-116K (U5S1) und CCD12 identifiziert werden.

Ein weiterer Vorteil der kovalenten Immobilisierung von Köderproteinen liegt in der Möglichkeit, stringenter Waschbedingungen (z.B. Detergenzien oder hohe Ionenstärken) zu verwenden, um den unspezifischen Proteinbackground weiter zu reduzieren [207]. Im Gegensatz zu chemischen *crosslinking*-Methoden, bei denen das Köderprotein ebenfalls kovalent mit der Trägermatrix vernetzt wird (siehe Abschnitt 1.2.1), erfolgt die Immobilisierung bei dem hier entwickelten Verfahren gerichtet über den Protein-C-Terminus, so dass alle Moleküle eine uniforme Konformation sowie eine definierte Orientierung an der Trägermatrix aufweisen. Ein Funktionsverlust des Köderproteins ist daher deutlich unwahrscheinlicher. Darüber hinaus kann die Funktionalität des um das Sortase A-Erkennungsmotiv erweiterten Köderproteins vor der Kopplung leicht überprüft werden.

Für den Fall, dass eine Modifizierung des Protein-C-Terminus nicht praktikabel ist (z.B. aufgrund mangelnder Zugänglichkeit oder der Nähe zu einem Bindungsepitop), könnte die kovalente Immobilisierung mittels Sortase A alternativ über den Protein-N-Terminus erfolgen. Hierzu müsste das Sortase-Erkennungsmotiv (LPXTG) an den festen Träger immobilisiert werden, während das Köderprotein um ein N-terminales Oligoglycin-Motiv verlängert wird. Da eine Abspaltung des N-terminalen Formyl-Methionins in bakteriellen Expressionssystemen bei einem Glycinrest an der

zweiten Position begünstigt ist [261], sollte eine freie Zugänglichkeit des Oligoglycin-Motivs gewährleistet sein.

Zusammenfassend stellt die Sortase A-vermittelte Immobilisierung von Proteinen für AP-MS-Experimente eine deutliche Verbesserung gegenüber den bisher verwendeten Methoden dar, indem sie die Vorteile einer gerichteten sowie einer kovalenten Verknüpfung vereint.

5 Zusammenfassung

T-Zellen gehören zu den Hauptakteuren der zellvermittelten Immunität. Ihre besondere Fähigkeit zur Migration und Adhäsion ist entscheidend für die Auslösung einer Immunantwort. Änderungen der Adhäsions- und Migrationseigenschaften von T-Zellen werden über die stimulationsabhängige Aktivierung von Adhäsionsmolekülen, den Integrinen, vermittelt. Das Adapterprotein ADAP ist ein zentraler Bestandteil eines größeren Proteinkomplexes, der sich stimulationsabhängig assembliert und so die Affinität und Avidität von Integrinen reguliert. In seiner Funktion als Adapterprotein wird ADAP an mehreren Tyrosinresten phosphoryliert und vermittelt hierüber zahlreiche Interaktionen wie beispielsweise mit den Adapterproteinen SLP76 und NCK sowie der Tyrosinkinase FYN.

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals alle FYN-abhängigen Tyrosin-Phosphorylierungsstellen von ADAP systematisch und zeitabhängig charakterisiert werden. Hierunter befanden sich die Tyrosinreste 462 und 571, für die bisher keine Interaktionspartner bekannt waren. Der Tyrosinrest 571 wurde darüber hinaus in zahlreichen unabhängigen phosphoproteomischen Studien identifiziert. Mit Hilfe von SILAC-basierten *Pulldown*-Experimenten in Kombination mit quantitativer Massenspektrometrie konnten potentielle Interaktionspartner der phosphorylierten Tyrosinreste 462 und 571 ermittelt werden, wobei synthetische Peptidsequenzen als Köder verwendet wurden. Da sich die Position Y571 am Rand der strukturierten hSH3^N-Domäne von ADAP befindet, wurden zudem rekombinant hergestellte und *in vitro* phosphorylierte Proteinkonstrukte als Köder eingesetzt. Interessanterweise konnte die Tyrosinkinase ZAP70 als neuer Interaktionspartner der Y571-phosphorylierten hSH3^N-Domäne identifiziert werden. Mit Hilfe von NMR- und MST-Untersuchungen konnte eine direkte, phosphorylierungsabhängige Interaktion der hSH3^N-Domäne mit der N-terminalen SH2-Domäne von ZAP70 bestätigt werden ($K_D = 2,3 \mu\text{M}$). Darüber hinaus konnte in funktionellen Studien mit Jurkat T-Zellen gezeigt werden, dass der Tyrosinrest 571 in ADAP selektiv an der chemokinvermittelten gerichteten Migration sowie der Aktin-Polymerisation beteiligt ist, während kein Einfluss auf die zelluläre Adhäsion und Konjugatbildung mit APCs beobachtet wurde. Eine Entfernung von ADAP zeigte erwartungsgemäß Defekte sowohl der Migration als auch der Adhäsion, so dass mit dem Tyrosinrest Y571 eine kritische Determinante zur Unterscheidung dieser unterschiedlichen Funktionalitäten von ADAP identifiziert werden konnte.

Die Identifizierung niedrig abundanter Bindungspartner in AP-MS-Experimenten wird durch den hohen Überschuss des Köderproteins in der Präparation erschwert. Im zweiten, methodisch orientierten Teil dieser Arbeit konnte ein einfaches und robustes Verfahren zur kovalenten und gerichteten Immobilisierung von synthetischen Peptiden sowie rekombinant hergestellten Proteinen mittels Sortase A entwickelt werden. Das Verfahren wurde erfolgreich in Peptid- und Protein-basierten *Pulldown*-Experimenten eingesetzt.

6 Zusammenfassung (Englisch)

T cells play a major role in cell-mediated immunity. Their ability to initiate an immune response depends on their capability to change their adhesive and migratory properties in response to an extracellular stimulus. Signal transduction from activated receptors to adhesion molecules known as integrins is mediated by a receptor-proximal signalling complex that contains the adapter protein ADAP as a central constituent. Upon stimulation, ADAP is phosphorylated on several tyrosine residues, which then serve as docking sites for SH2-domain containing proteins like the adapters SLP76 and NCK, as well as the tyrosine kinase FYN.

In this study, ADAP was phosphorylated by FYN kinase *in vitro* in order to undertake a comprehensive analysis of tyrosine-phosphorylation sites by mass spectrometry. The tyrosine residues 462 and 571 were among the most heavily phosphorylated positions, yet, prior to this study, no interaction partners were known for these positions. Interestingly, ADAP-Y571 was also identified by independent phosphoproteomic studies. Using SILAC-based pulldown experiments with short synthetic peptide baits in combination with quantitative mass spectrometry, several novel potential interaction partners were identified. Since ADAP-Y571 is located at the border of the ADAP-hSH3^N-domain, additional pulldown experiments were performed using recombinant and *in vitro*-phosphorylated protein constructs as baits. Surprisingly, the tyrosine kinase ZAP70 could be reproducibly identified as a specific interaction partner of Y571-phosphorylated ADAP-hSH3^N-domain, but not in the context of the unstructured peptide sequence. NMR spectroscopy and MST measurements were used to confirm a direct and phosphorylation-dependent interaction between the phosphorylated hSH3^N-domain of ADAP and the N-terminal SH2-domain of ZAP70 ($K_D = 2,3 \mu\text{M}$). In functional assays with Jurkat T cells, ADAP-Y571 was shown to selectively affect chemokine-mediated migration and actin polymerisation, while no influence was observed for adhesion and conjugate formation with antigen presenting cells. In contrast, the depletion of full-length ADAP led to impaired adhesion and migration. Therefore, ADAP-Y571 was identified as a critical determinant for distinguishing the different functionalities of ADAP.

In classical AP-MS methods, the identification of low-abundance interaction partners is often hampered by dominant peptide signals of the bait protein in the analyte solution. To overcome this inherent problem, an efficient and robust method for covalent and site-specific immobilization of synthetic peptides or recombinantly expressed proteins was developed using the transpeptidase sortase A. Subsequently, this new “sortase approach” was successfully utilized for investigating phosphorylation-dependent peptide-protein interactions of ADAP and PRS-mediated protein-protein interactions of the CD2BP2-GYF-domain.

7 Literaturverzeichnis

1. Lemaitre, B., et al., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. Cell, 1996. **86**(6): p. 973-83.
2. McHeyzer-Williams, L.J. and M.G. McHeyzer-Williams, *Antigen-specific memory B cell development*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 487-513.
3. Murphy, K.M. and S.L. Reiner, *The lineage decisions of helper T cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(12): p. 933-44.
4. Barry, M. and R.C. Bleackley, *Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(6): p. 401-9.
5. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
6. Zinkernagel, R.M. and P.C. Doherty, *Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system*. Nature, 1974. **248**(5450): p. 701-2.
7. Zinkernagel, R.M. and P.C. Doherty, *Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis*. Nature, 1974. **251**(5475): p. 547-8.
8. Griffiths, E.K., et al., *Positive regulation of T cell activation and integrin adhesion by the adapter Fyb/Slap*. Science, 2001. **293**(5538): p. 2260-3.
9. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. Cell, 1994. **76**(2): p. 301-14.
10. Weber, C., L. Fraemohs, and E. Dejana, *The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 467-77.
11. McEver, R.P., *Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(5): p. 581-6.
12. Pavalko, F.M., et al., *The cytoplasmic domain of L-selectin interacts with cytoskeletal proteins via alpha-actinin: receptor positioning in microvilli does not require interaction with alpha-actinin*. J Cell Biol, 1995. **129**(4): p. 1155-64.
13. McEver, R.P. and R.D. Cummings, *Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment*. J Clin Invest, 1997. **100**(11 Suppl): p. S97-103.
14. Smith, A., et al., *The role of the integrin LFA-1 in T-lymphocyte migration*. Immunol Rev, 2007. **218**: p. 135-46.
15. Shulman, Z., et al., *Lymphocyte crawling and transendothelial migration require chemokine triggering of high-affinity LFA-1 integrin*. Immunity, 2009. **30**(3): p. 384-96.
16. Griffith, J.W., C.L. Sokol, and A.D. Luster, *Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity*. Annu Rev Immunol, 2014. **32**: p. 659-702.
17. Kaiser, A., et al., *CC chemokine ligand 19 secreted by mature dendritic cells increases naive T cell scanning behavior and their response to rare cognate antigen*. J Immunol, 2005. **175**(4): p. 2349-56.
18. Masopust, D. and J.M. Schenkel, *The integration of T cell migration, differentiation and function*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(5): p. 309-20.
19. Dustin, M.L., *The cellular context of T cell signaling*. Immunity, 2009. **30**(4): p. 482-92.
20. Grakoui, A., et al., *The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation*. Science, 1999. **285**(5425): p. 221-7.
21. Burkhardt, J.K., E. Carrizosa, and M.H. Shaffer, *The actin cytoskeleton in T cell activation*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 233-59.
22. Delon, J., K. Kaibuchi, and R.N. Germain, *Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin*. Immunity, 2001. **15**(5): p. 691-701.

23. Freiberg, B.A., et al., *Staging and resetting T cell activation in SMACs*. Nat Immunol, 2002. **3**(10): p. 911-7.
24. Yokosuka, T. and T. Saito, *Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 27-40.
25. Alarcon, B., D. Mestre, and N. Martinez-Martin, *The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering?* Immunology, 2011. **133**(4): p. 420-5.
26. Brossard, C., et al., *Multifocal structure of the T cell - dendritic cell synapse*. Eur J Immunol, 2005. **35**(6): p. 1741-53.
27. Campi, G., R. Varma, and M.L. Dustin, *Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling*. J Exp Med, 2005. **202**(8): p. 1031-6.
28. Yokosuka, T., et al., *Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76*. Nat Immunol, 2005. **6**(12): p. 1253-62.
29. Jenkins, M.R. and G.M. Griffiths, *The synapse and cytolytic machinery of cytotoxic T cells*. Curr Opin Immunol, 2010. **22**(3): p. 308-13.
30. Swamy, M. and W.W. Schamel, *Purification of the T cell antigen receptor and analysis by blue-native PAGE*. Methods Mol Biol, 2009. **514**: p. 135-50.
31. Love, P.E. and S.M. Hayes, *ITAM-mediated signaling by the T-cell antigen receptor*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(6): p. a002485.
32. Burkhardt, A.L., et al., *Temporal regulation of non-transmembrane protein tyrosine kinase enzyme activity following T cell antigen receptor engagement*. J Biol Chem, 1994. **269**(38): p. 23642-7.
33. Zamoyska, R., et al., *The influence of the src-family kinases, Lck and Fyn, on T cell differentiation, survival and activation*. Immunol Rev, 2003. **191**: p. 107-18.
34. Kim, P.W., et al., *A zinc clasp structure tethers Lck to T cell coreceptors CD4 and CD8*. Science, 2003. **301**(5640): p. 1725-8.
35. Folmer, R.H., S. Geschwindner, and Y. Xue, *Crystal structure and NMR studies of the apo SH2 domains of ZAP-70: two bikes rather than a tandem*. Biochemistry, 2002. **41**(48): p. 14176-84.
36. Hatada, M.H., et al., *Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor*. Nature, 1995. **377**(6544): p. 32-8.
37. Watts, J.D., et al., *Identification by electrospray ionization mass spectrometry of the sites of tyrosine phosphorylation induced in activated Jurkat T cells on the protein tyrosine kinase ZAP-70*. J Biol Chem, 1994. **269**(47): p. 29520-9.
38. Deindl, S., et al., *Structural basis for the inhibition of tyrosine kinase activity of ZAP-70*. Cell, 2007. **129**(4): p. 735-46.
39. Zhao, Q. and A. Weiss, *Enhancement of lymphocyte responsiveness by a gain-of-function mutation of ZAP-70*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(12): p. 6765-74.
40. Gelkop, S., et al., *T cell activation-induced CrkII binding to the Zap70 protein tyrosine kinase is mediated by Lck-dependent phosphorylation of Zap70 tyrosine 315*. J Immunol, 2005. **175**(12): p. 8123-32.
41. Katzav, S., et al., *The protein tyrosine kinase ZAP-70 can associate with the SH2 domain of proto-Vav*. J Biol Chem, 1994. **269**(51): p. 32579-85.
42. Pelosi, M., et al., *Tyrosine 319 in the interdomain B of ZAP-70 is a binding site for the Src homology 2 domain of Lck*. J Biol Chem, 1999. **274**(20): p. 14229-37.
43. Williams, B.L., et al., *Phosphorylation of Tyr319 in ZAP-70 is required for T-cell antigen receptor-dependent phospholipase C-gamma1 and Ras activation*. EMBO J, 1999. **18**(7): p. 1832-44.
44. Wang, H., et al., *ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(5): p. a002279.
45. Bubeck Wardenburg, J., et al., *Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function*. J Biol Chem, 1996. **271**(33): p. 19641-4.
46. Horejsi, V., W. Zhang, and B. Schraven, *Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(8): p. 603-16.

47. Jordan, M.S., A.L. Singer, and G.A. Koretzky, *Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(2): p. 110-6.
48. Koretzky, G.A., F. Abtahian, and M.A. Silverman, *SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(1): p. 67-78.
49. Zhang, W., et al., *LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation*. Cell, 1998. **92**(1): p. 83-92.
50. Flynn, D.C., *Adaptor proteins*. Oncogene, 2001. **20**(44): p. 6270-2.
51. Pawson, T. and J.D. Scott, *Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins*. Science, 1997. **278**(5346): p. 2075-80.
52. Huang, H., et al., *Defining the specificity space of the human SRC homology 2 domain*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(4): p. 768-84.
53. Musacchio, A., et al., *SH3--an abundant protein domain in search of a function*. FEBS Lett, 1992. **307**(1): p. 55-61.
54. DiNitto, J.P., T.C. Cronin, and D.G. Lambright, *Membrane recognition and targeting by lipid-binding domains*. Sci STKE, 2003. **2003**(213): p. re16.
55. Liu, S.K., et al., *The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors*. Curr Biol, 1999. **9**(2): p. 67-75.
56. Simeoni, L., et al., *Adaptors and linkers in T and B cells*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(3): p. 304-13.
57. Smith-Garvin, J.E., G.A. Koretzky, and M.S. Jordan, *T cell activation*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 591-619.
58. Yablonski, D., T. Kadlecsek, and A. Weiss, *Identification of a phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) SH3 domain-binding site in SLP-76 required for T-cell receptor-mediated activation of PLC-gamma1 and NFAT*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(13): p. 4208-18.
59. Liu, Q., et al., *Structural basis for specific binding of the Gads SH3 domain to an RxxK motif-containing SLP-76 peptide: a novel mode of peptide recognition*. Mol Cell, 2003. **11**(2): p. 471-81.
60. Etzioni, A., *Genetic etiologies of leukocyte adhesion defects*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(5): p. 481-6.
61. Springer, T.A. and M.L. Dustin, *Integrin inside-out signaling and the immunological synapse*. Curr Opin Cell Biol, 2012. **24**(1): p. 107-15.
62. Alon, R. and M.L. Dustin, *Force as a facilitator of integrin conformational changes during leukocyte arrest on blood vessels and antigen-presenting cells*. Immunity, 2007. **26**(1): p. 17-27.
63. Luo, B.H., C.V. Carman, and T.A. Springer, *Structural basis of integrin regulation and signaling*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 619-47.
64. Chen, W., J. Lou, and C. Zhu, *Forcing switch from short- to intermediate- and long-lived states of the alphaA domain generates LFA-1/ICAM-1 catch bonds*. J Biol Chem, 2010. **285**(46): p. 35967-78.
65. Hogg, N., I. Patzak, and F. Willenbrock, *The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(6): p. 416-26.
66. Bleul, C.C., et al., *A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)*. J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 1101-9.
67. Bivona, T.G., et al., *Rap1 up-regulation and activation on plasma membrane regulates T cell adhesion*. J Cell Biol, 2004. **164**(3): p. 461-70.
68. Sebzda, E., et al., *Rap1A positively regulates T cells via integrin activation rather than inhibiting lymphocyte signaling*. Nat Immunol, 2002. **3**(3): p. 251-8.
69. Shimonaka, M., et al., *Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow*. J Cell Biol, 2003. **161**(2): p. 417-27.
70. Ghandour, H., et al., *Essential role for Rap1 GTPase and its guanine exchange factor CalDAG-GEFI in LFA-1 but not VLA-4 integrin mediated human T-cell adhesion*. Blood, 2007. **110**(10): p. 3682-90.

71. Katagiri, K., M. Shimonaka, and T. Kinashi, *Rap1-mediated lymphocyte function-associated antigen-1 activation by the T cell antigen receptor is dependent on phospholipase C-gamma1*. J Biol Chem, 2004. **279**(12): p. 11875-81.
72. Mor, A., et al., *Phospholipase D1 regulates lymphocyte adhesion via upregulation of Rap1 at the plasma membrane*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(12): p. 3297-306.
73. Peterson, E.J., et al., *Coupling of the TCR to integrin activation by SLAP-130/Fyb*. Science, 2001. **293**(5538): p. 2263-2265.
74. Kliche, S., et al., *The ADAP/SKAP55 signaling module regulates T-cell receptor-mediated integrin activation through plasma membrane targeting of Rap1*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(19): p. 7130-44.
75. Lafuente, E.M., et al., *RIAM, an Ena/VASP and Profilin ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion*. Dev Cell, 2004. **7**(4): p. 585-95.
76. Menasche, G., et al., *RIAM links the ADAP/SKAP-55 signaling module to Rap1, facilitating T-cell-receptor-mediated integrin activation*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(11): p. 4070-81.
77. Burbach, B.J., et al., *The pleckstrin homology domain in the SKAP55 adapter protein defines the ability of the adapter protein ADAP to regulate integrin function and NF-kappaB activation*. J Immunol, 2011. **186**(11): p. 6227-37.
78. Katagiri, K., M. Imamura, and T. Kinashi, *Spatiotemporal regulation of the kinase Mst1 by binding protein RAPL is critical for lymphocyte polarity and adhesion*. Nat Immunol, 2006. **7**(9): p. 919-28.
79. Anthis, N.J., et al., *The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction*. EMBO J, 2009. **28**(22): p. 3623-32.
80. Calderwood, D.A., et al., *The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21749-58.
81. Martel, V., et al., *Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21217-27.
82. Moser, M., et al., *The tail of integrins, talin, and kindlins*. Science, 2009. **324**(5929): p. 895-9.
83. Malinin, N.L., et al., *A point mutation in KINDLIN3 ablates activation of three integrin subfamilies in humans*. Nat Med, 2009. **15**(3): p. 313-8.
84. Svensson, L., et al., *Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation*. Nat Med, 2009. **15**(3): p. 306-12.
85. Onodera, H., et al., *Differential regulation of activation-induced tyrosine phosphorylation and recruitment of SLP-76 to Vav by distinct isoforms of the CD45 protein-tyrosine phosphatase*. J Biol Chem, 1996. **271**(36): p. 22225-30.
86. Raab, M., et al., *Regulation of Vav-SLP-76 binding by ZAP-70 and its relevance to TCR zeta/CD3 induction of interleukin-2*. Immunity, 1997. **6**(2): p. 155-64.
87. Tuosto, L., F. Michel, and O. Acuto, *p95vav associates with tyrosine-phosphorylated SLP-76 in antigen-stimulated T cells*. J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 1161-6.
88. Wu, J., et al., *Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation*. Immunity, 1996. **4**(6): p. 593-602.
89. Badour, K., J. Zhang, and K.A. Siminovitch, *Involvement of the Wiskott-Aldrich syndrome protein and other actin regulatory adaptors in T cell activation*. Semin Immunol, 2004. **16**(6): p. 395-407.
90. Barda-Saad, M., et al., *Dynamic molecular interactions linking the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton*. Nat Immunol, 2005. **6**(1): p. 80-9.
91. Nolz, J.C., et al., *The WAVE2 complex regulates actin cytoskeletal reorganization and CRAC-mediated calcium entry during T cell activation*. Curr Biol, 2006. **16**(1): p. 24-34.
92. Rivero-Lezcano, O.M., et al., *Wiskott-Aldrich syndrome protein physically associates with Nck through Src homology 3 domains*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(10): p. 5725-31.
93. Sylvester, M., et al., *Adhesion and degranulation promoting adapter protein (ADAP) is a central hub for phosphotyrosine-mediated interactions in T cells*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11708.

94. Wunderlich, L., et al., *Association of Nck with tyrosine-phosphorylated SLP-76 in activated T lymphocytes*. Eur J Immunol, 1999. **29**(4): p. 1068-75.
95. Lettau, M., et al., *The adapter proteins ADAP and Nck cooperate in T cell adhesion*. Mol Immunol, 2014. **60**(1): p. 72-9.
96. Billadeau, D.D., J.C. Nolz, and T.S. Gomez, *Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(2): p. 131-43.
97. Krause, M., et al., *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*. Journal of Cell Biology, 2000. **149**(1): p. 181-194.
98. Evans, R., et al., *The integrin LFA-1 signals through ZAP-70 to regulate expression of high-affinity LFA-1 on T lymphocytes*. Blood, 2011. **117**(12): p. 3331-42.
99. Nika, K., et al., *Constitutively active Lck kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction*. Immunity, 2010. **32**(6): p. 766-77.
100. Garcia-Bernal, D., et al., *Chemokine-induced Zap70 kinase-mediated dissociation of the Vav1-talin complex activates alpha4beta1 integrin for T cell adhesion*. Immunity, 2009. **31**(6): p. 953-64.
101. Shamri, R., et al., *Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines*. Nat Immunol, 2005. **6**(5): p. 497-506.
102. Zhu, J., et al., *Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces*. Mol Cell, 2008. **32**(6): p. 849-61.
103. Kim, M., et al., *The primacy of affinity over clustering in regulation of adhesiveness of the integrin $\{\alpha\}L\{\beta\}2$* . J Cell Biol, 2004. **167**(6): p. 1241-53.
104. Baker, R.G., et al., *The adapter protein SLP-76 mediates "outside-in" integrin signaling and function in T cells*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(20): p. 5578-89.
105. DaSilva, A.J., et al., *Cloning of a novel T-cell protein FYB that binds FYN and SH2-domain-containing leukocyte protein 76 and modulates interleukin 2 production*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(14): p. 7493-7498.
106. Musci, M.A., et al., *Molecular cloning of SLAP-130, an SLP-76-associated substrate of the T cell antigen receptor-stimulated protein tyrosine kinases*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(18): p. 11674-11677.
107. Geng, L.P., et al., *Adapter FYB (Fyn-binding protein) regulates integrin-mediated adhesion and mediator release: Differential involvement of the FYB SH3 domain*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(20): p. 11527-11532.
108. Raab, M., et al., *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, 1999. **274**(30): p. 21170-9.
109. Veale, M., et al., *Novel isoform of lymphoid adaptor FYN-T-binding protein (FYB-130) interacts with SLP-76 and up-regulates interleukin 2 production*. J Biol Chem, 1999. **274**(40): p. 28427-35.
110. Geng, L., M. Raab, and C.E. Rudd, *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, 1999. **163**(11): p. 5753-7.
111. Sylvester, M., *Biochemische Charakterisierung des Immunzellproteins ADAP*. Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie, Freie Universität Berlin, 2009.
112. Kliche, S., et al., *CCR7-mediated LFA-1 functions in T cells are regulated by 2 independent ADAP/SKAP55 modules*. Blood, 2012. **119**(3): p. 777-85.
113. Wu, J.N., et al., *Adhesion- and degranulation-promoting adapter protein is required for efficient thymocyte development and selection*. J Immunol, 2006. **176**(11): p. 6681-9.
114. Medeiros, R.B., et al., *Regulation of NF-kappaB activation in T cells via association of the adapter proteins ADAP and CARMA1*. Science, 2007. **316**(5825): p. 754-8.

115. Tian, J., et al., *Inactivation of T-cell receptor-mediated integrin activation prolongs allograft survival in ADAP-deficient mice*. *Transplantation*, 2007. **84**(3): p. 400-6.
116. Tian, J., et al., *ADAP deficiency combined with costimulation blockade synergistically protects intestinal allografts*. *Transpl Int*, 2010. **23**(1): p. 71-9.
117. Heuer, K., et al., *Structure of a helically extended SH3 domain of the T cell adapter protein ADAP*. *Structure*, 2004. **12**(4): p. 603-10.
118. Zimmermann, J., et al., *Redox-regulated conformational changes in an SH3 domain*. *Biochemistry*, 2007. **46**(23): p. 6971-7.
119. Heuer, K., et al., *Lipid-binding hSH3 domains in immune cell adapter proteins*. *J Mol Biol*, 2006. **361**(1): p. 94-104.
120. Heuer, K., et al., *The helically extended SH3 domain of the T cell adaptor protein ADAP is a novel lipid interaction domain*. *J Mol Biol*, 2005. **348**(4): p. 1025-35.
121. Piotukh, K., et al., *Reversible disulfide bond formation of intracellular proteins probed by NMR spectroscopy*. *Free Radic Biol Med*, 2007. **43**(9): p. 1263-70.
122. Jackson, S.H., et al., *T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(8): p. 818-27.
123. Kwon, J., et al., *Receptor-stimulated oxidation of SHP-2 promotes T-cell adhesion through SLP-76-ADAP*. *EMBO J*, 2005. **24**(13): p. 2331-41.
124. Lehmann, R., et al., *A novel S3S-TAP-tag for the isolation of T-cell interaction partners of adhesion and degranulation promoting adaptor protein*. *Proteomics*, 2009. **9**(23): p. 5288-95.
125. Marie-Cardine, A., et al., *Molecular interaction between the Fyn-associated protein SKAP55 and the SLP-76-associated phosphoprotein SLAP-130*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(40): p. 25789-95.
126. Marie-Cardine, A., et al., *SKAP-HOM, a novel adaptor protein homologous to the FYN-associated protein SKAP55*. *FEBS Lett*, 1998. **435**(1): p. 55-60.
127. Huang, Y., et al., *Deficiency of ADAP/Fyb/SLAP-130 destabilizes SKAP55 in Jurkat T cells*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(25): p. 23576-83.
128. Meinecke, B.M., *Molekulare Eigenschaften des Integrin-regulierenden ADAP-SKAP55-Signalkomplexes*. Fakultät der Naturwissenschaften, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, 2012.
129. Wang, H., et al., *Functional defects of SKAP-55-deficient T cells identify a regulatory role for the adaptor in LFA-1 adhesion*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(19): p. 6863-75.
130. Burbach, B.J., et al., *Distinct regulation of integrin-dependent T cell conjugate formation and NF-kappa B activation by the adapter protein ADAP*. *J Immunol*, 2008. **181**(7): p. 4840-51.
131. Raab, M., et al., *SKAP1 protein PH domain determines RapL membrane localization and Rap1 protein complex formation for T cell receptor (TCR) activation of LFA-1*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(34): p. 29663-70.
132. Witte, A., et al., *Emerging Roles of ADAP, SKAP55, and SKAP-HOM for Integrin and NF- κ B Signaling in T cells*. *J Clin Cell Immunol*, 2012. doi:10.4172/2155-9899.S12-002.
133. Srivastava, R., B.J. Burbach, and Y. Shimizu, *NF-kappaB activation in T cells requires discrete control of IkappaB kinase alpha/beta (IKKalpha/beta) phosphorylation and IKKgammabeta ubiquitination by the ADAP adapter protein*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(15): p. 11100-5.
134. Blonska, M. and X. Lin, *CARMA1-mediated NF-kappaB and JNK activation in lymphocytes*. *Immunol Rev*, 2009. **228**(1): p. 199-211.
135. Cheng, J., A. Montecalvo, and L.P. Kane, *Regulation of NF-kappaB induction by TCR/CD28*. *Immunol Res*, 2011. **50**(2-3): p. 113-7.
136. Thome, M., et al., *Antigen receptor signaling to NF-kappaB via CARMA1, BCL10, and MALT1*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010. **2**(9): p. a003004.
137. Srivastava, R., et al., *ADAP regulates cell cycle progression of T cells via control of cyclin E and Cdk2 expression through two distinct CARMA1-dependent signaling pathways*. *Mol Cell Biol*, 2012. **32**(10): p. 1908-17.
138. Boerth, N.J., B.A. Judd, and G.A. Koretzky, *Functional association between SLAP-130 and SLP-76 in Jurkat T cells*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(7): p. 5143-52.

139. Lettau, M., et al., *The adapter protein Nck: role of individual SH3 and SH2 binding modules for protein interactions in T lymphocytes*. Protein Sci, 2010. **19**(4): p. 658-69.
140. Pauker, M.H., et al., *Functional cooperation between the proteins Nck and ADAP is fundamental for actin reorganization*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(13): p. 2653-66.
141. Bunnell, S.C., et al., *Persistence of cooperatively stabilized signaling clusters drives T-cell activation*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(19): p. 7155-66.
142. Burns, J.C., et al., *The SLP-76 Src homology 2 domain is required for T cell development and activation*. J Immunol, 2011. **187**(9): p. 4459-66.
143. Lange, S., et al., *Identification of Phosphorylation-Dependent Interaction Partners of the Adapter Protein ADAP using Quantitative Mass Spectrometry: SILAC vs O-18-Labeling*. Journal of Proteome Research, 2010. **9**(8): p. 4113-4122.
144. Coussens, N.P., et al., *Multipoint binding of the SLP-76 SH2 domain to ADAP is critical for oligomerization of SLP-76 signaling complexes in stimulated T cells*. Mol Cell Biol, 2013. **33**(21): p. 4140-51.
145. Majkut, P., et al., *Completion of proteomic data sets by Kd measurement using cell-free synthesis of site-specifically labeled proteins*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e82352.
146. Brill, L.M., et al., *Robust phosphoproteomic profiling of tyrosine phosphorylation sites from human T cells using immobilized metal affinity chromatography and tandem mass spectrometry*. Anal Chem, 2004. **76**(10): p. 2763-72.
147. Cao, L., et al., *Quantitative phosphoproteomics reveals SLP-76 dependent regulation of PAG and Src family kinases in T cells*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46725.
148. Cao, L., et al., *Quantitative time-resolved phosphoproteomic analysis of mast cell signaling*. J Immunol, 2007. **179**(9): p. 5864-76.
149. Mayya, V., et al., *Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions*. Sci Signal, 2009. **2**(84): p. ra46.
150. Nguyen, V., et al., *A new approach for quantitative phosphoproteomic dissection of signaling pathways applied to T cell receptor activation*. Mol Cell Proteomics, 2009. **8**(11): p. 2418-31.
151. Ruperez, P., et al., *Quantitative phosphoproteomic analysis reveals a role for serine and threonine kinases in the cytoskeletal reorganization in early T cell receptor activation in human primary T cells*. Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(5): p. 171-86.
152. Ficarro, S.B., et al., *Automated immobilized metal affinity chromatography/nano-liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry platform for profiling protein phosphorylation sites*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005. **19**(1): p. 57-71.
153. Kim, J.E. and F.M. White, *Quantitative analysis of phosphotyrosine signaling networks triggered by CD3 and CD28 costimulation in Jurkat cells*. J Immunol, 2006. **176**(5): p. 2833-43.
154. Zahedi, R.P., et al., *Phosphoproteome of resting human platelets*. J Proteome Res, 2008. **7**(2): p. 526-34.
155. Aebersold, R. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics*. Nature, 2003. **422**(6928): p. 198-207.
156. Steen, H. and M. Mann, *The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(9): p. 699-711.
157. Fenn, J.B., et al., *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science, 1989. **246**(4926): p. 64-71.
158. Karas, M. and F. Hillenkamp, *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. Anal Chem, 1988. **60**(20): p. 2299-301.
159. Makarov, A., *Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis*. Anal Chem, 2000. **72**(6): p. 1156-62.
160. Yates, J.R., *A century of mass spectrometry: from atoms to proteomes*. Nat. Methods, 2011. **8**(8): p. 633-637.
161. Dunham, W.H., M. Mullin, and A.C. Gingras, *Affinity-purification coupled to mass spectrometry: basic principles and strategies*. Proteomics, 2012. **12**(10): p. 1576-90.

162. Stephanowitz, H., et al., *Improved two-dimensional reversed phase-reversed phase LC-MS/MS approach for identification of peptide-protein interactions*. Journal of Proteome Research, 2012. **11**(2): p. 1175-83.
163. Mattson, G., et al., *A practical approach to crosslinking*. Mol Biol Rep, 1993. **17**(3): p. 167-83.
164. Paul, F.E., F. Hosp, and M. Selbach, *Analyzing protein-protein interactions by quantitative mass spectrometry*. Methods, 2011. **54**(4): p. 387-95.
165. Sisson, T.H. and C.W. Castor, *An improved method for immobilizing IgG antibodies on protein A-agarose*. J Immunol Methods, 1990. **127**(2): p. 215-20.
166. Geiger, T., et al., *Comparative proteomic analysis of eleven common cell lines reveals ubiquitous but varying expression of most proteins*. Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(3): p. M111 014050.
167. Ong, S.E. and M. Mann, *A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)*. Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 2650-60.
168. Mann, M., *Functional and quantitative proteomics using SILAC*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(12): p. 952-8.
169. Cox, J. and M. Mann, *MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(12): p. 1367-72.
170. Cox, J., et al., *Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment*. J Proteome Res, 2011.
171. Schulze, W.X. and M. Mann, *A novel proteomic screen for peptide-protein interactions*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 10756-64.
172. Lang, D., et al., *Probing the acetylation code of histone H4*. Proteomics, 2013. **13**(20): p. 2989-97.
173. Kruger, M., et al., *SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function*. Cell, 2008. **134**(2): p. 353-64.
174. Sury, M.D., J.X. Chen, and M. Selbach, *The SILAC fly allows for accurate protein quantification in vivo*. Mol Cell Proteomics, 2010. **9**(10): p. 2173-83.
175. Fenselau, C. and X. Yao, *18O2-labeling in quantitative proteomic strategies: a status report*. J Proteome Res, 2009. **8**(5): p. 2140-3.
176. Evans, C., et al., *An insight into iTRAQ: where do we stand now?* Anal Bioanal Chem, 2012. **404**(4): p. 1011-27.
177. Gygi, S.P., et al., *Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(10): p. 994-9.
178. Wong, J.W. and G. Cagney, *An overview of label-free quantitation methods in proteomics by mass spectrometry*. Methods Mol Biol, 2010. **604**: p. 273-83.
179. Ishihama, Y., et al., *Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(9): p. 1265-72.
180. Cox, J., et al., *Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ*. Mol Cell Proteomics, 2014. **13**(9): p. 2513-26.
181. Gerber, S.A., et al., *The absolute quantification strategy: application to phosphorylation profiling of human separase serine 1126*. Methods Mol Biol, 2007. **359**: p. 71-86.
182. Vaughn, J.L., et al., *The establishment of two cell lines from the insect Spodoptera frugiperda (Lepidoptera; Noctuidae)*. In Vitro, 1977. **13**(4): p. 213-7.
183. Schneider, U., H.U. Schwenk, and G. Bornkamm, *Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma*. Int J Cancer, 1977. **19**(5): p. 621-6.
184. Abraham, R.T. and A. Weiss, *Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(4): p. 301-8.
185. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.

186. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
187. Rosenfeld, J., et al., *In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis*. Anal Biochem, 1992. **203**(1): p. 173-9.
188. Korbel, S., et al., *Relative quantification of erythropoietin receptor-dependent phosphoproteins using in-gel 18O-labeling and tandem mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005. **19**(16): p. 2259-71.
189. Rietschel, B., et al., *Elastase digests: new ammunition for shotgun membrane proteomics*. Mol Cell Proteomics, 2009. **8**(5): p. 1029-43.
190. Vranken, W.F., et al., *The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline*. Proteins, 2005. **59**(4): p. 687-96.
191. Zimmermann, J. and C. Freund, *NMR assignment of the reduced and oxidized forms of the human ADAP hSH3-1 domain*. J Biomol NMR, 2005. **32**(1): p. 94.
192. Keppler, A., et al., *A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(1): p. 86-9.
193. Jerabek-Willemsen, M., et al., *Molecular interaction studies using microscale thermophoresis*. Assay Drug Dev Technol, 2011. **9**(4): p. 342-53.
194. Boehm, M.E., et al., *Site-specific degree of phosphorylation in proteins measured by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry*. Proteomics, 2012. **12**(13): p. 2167-78.
195. Seidler, J., et al., *Analysis of autophosphorylation sites in the recombinant catalytic subunit alpha of cAMP-dependent kinase by nano-UPLC-ESI-MS/MS*. Anal Bioanal Chem, 2009. **395**(6): p. 1713-20.
196. Horn, J., et al., *Src homology 2-domain containing leukocyte-specific phosphoprotein of 76 kDa is mandatory for TCR-mediated inside-out signaling, but dispensable for CXCR4-mediated LFA-1 activation, adhesion, and migration of T cells*. J Immunol, 2009. **183**(9): p. 5756-67.
197. Chen, R.F., *Dansyl labeled proteins: determination of extinction coefficient and number of bound residues with radioactive dansyl chloride*. Anal Biochem, 1968. **25**(1): p. 412-6.
198. Hartley, B.S. and V. Massey, *The active centre of chymotrypsin. I. Labelling with a fluorescent dye*. Biochim Biophys Acta, 1956. **21**(1): p. 58-70.
199. Liang, X., et al., *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*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 8133-9.
200. Wolven, A., et al., *Palmitoylation of p59fyn is reversible and sufficient for plasma membrane association*. Mol Biol Cell, 1997. **8**(6): p. 1159-73.
201. Duhr, S. and D. Braun, *Thermophoretic depletion follows Boltzmann distribution*. Phys Rev Lett, 2006. **96**(16): p. 168301.
202. Reichl, M., et al., *Why charged molecules move across a temperature gradient: the role of electric fields*. Phys Rev Lett, 2014. **112**(19): p. 198101.
203. Schneewind, O., A. Fowler, and K.F. Faull, *Structure of the cell wall anchor of surface proteins in Staphylococcus aureus*. Science, 1995. **268**(5207): p. 103-6.
204. Kruger, R.G., et al., *Analysis of the substrate specificity of the Staphylococcus aureus sortase transpeptidase SrtA*. Biochemistry, 2004. **43**(6): p. 1541-51.
205. Ton-That, H., et al., *Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of Staphylococcus aureus at the LPXTG motif*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12424-9.
206. Proft, T., *Sortase-mediated protein ligation: an emerging biotechnology tool for protein modification and immobilisation*. Biotechnol Lett, 2010. **32**(1): p. 1-10.
207. Popp, M.W. and H.L. Ploegh, *Making and breaking peptide bonds: protein engineering using sortase*. Angew Chem Int Ed Engl, 2011. **50**(22): p. 5024-32.
208. Schmohl, L. and D. Schwarzer, *Sortase-mediated ligations for the site-specific modification of proteins*. Curr Opin Chem Biol, 2014. **22C**: p. 122-128.

209. Strijbis, K., E. Spooner, and H.L. Ploegh, *Protein ligation in living cells using sortase*. Traffic, 2012. **13**(6): p. 780-9.
210. Kobashigawa, Y., et al., *Attachment of an NMR-invisible solubility enhancement tag using a sortase-mediated protein ligation method*. J Biomol NMR, 2009. **43**(3): p. 145-50.
211. Antos, J.M., et al., *A straight path to circular proteins*. J Biol Chem, 2009. **284**(23): p. 16028-36.
212. Chan, L., et al., *Covalent attachment of proteins to solid supports and surfaces via Sortase-mediated ligation*. PLoS One, 2007. **2**(11): p. e1164.
213. Clow, F., J.D. Fraser, and T. Proft, *Immobilization of proteins to biacore sensor chips using Staphylococcus aureus sortase A*. Biotechnol Lett, 2008. **30**(9): p. 1603-7.
214. Sinisi, A., et al., *Development of an influenza virus protein array using Sortagging technology*. Bioconjug Chem, 2012. **23**(6): p. 1119-26.
215. Parthasarathy, R., S. Subramanian, and E.T. Boder, *Sortase A as a novel molecular "stapler" for sequence-specific protein conjugation*. Bioconjug Chem, 2007. **18**(2): p. 469-76.
216. Zong, Y., et al., *Crystal structures of Staphylococcus aureus sortase A and its substrate complex*. J Biol Chem, 2004. **279**(30): p. 31383-9.
217. Chang, H.C., et al., *Involvement of the PPPGHR motif in T cell activation via CD2*. J Exp Med, 1990. **172**(1): p. 351-5.
218. Freund, C., et al., *The GYF domain is a novel structural fold that is involved in lymphoid signaling through proline-rich sequences*. Nat Struct Biol, 1999. **6**(7): p. 656-60.
219. Nishizawa, K., et al., *Identification of a proline-binding motif regulating CD2-triggered T lymphocyte activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 14897-902.
220. Freund, C., et al., *Dynamic interaction of CD2 with the GYF and the SH3 domain of compartmentalized effector molecules*. EMBO J, 2002. **21**(22): p. 5985-95.
221. Lagerbauer, B., et al., *The human U5 snRNP 52K protein (CD2BP2) interacts with U5-102K (hPrp6), a U4/U6.U5 tri-snRNP bridging protein, but dissociates upon tri-snRNP formation*. RNA, 2005. **11**(5): p. 598-608.
222. Kofler, M., et al., *Novel interaction partners of the CD2BP2-GYF domain*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(39): p. 33397-402.
223. Kofler, M., et al., *Recognition sequences for the GYF domain reveal a possible spliceosomal function of CD2BP2*. J Biol Chem, 2004. **279**(27): p. 28292-7.
224. Kofler, M., et al., *Proline-rich sequence recognition: I. Marking GYF and WW domain assembly sites in early spliceosomal complexes*. Mol Cell Proteomics, 2009. **8**(11): p. 2461-73.
225. Nielsen, T.K., et al., *Structural basis for the bifunctionality of the U5 snRNP 52K protein (CD2BP2)*. J Mol Biol, 2007. **369**(4): p. 902-8.
226. Palacios, E.H. and A. Weiss, *Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation*. Oncogene, 2004. **23**(48): p. 7990-8000.
227. Gropengiesser, J., et al., *The relative influence of phosphorylation and methylation on responsiveness of peptides to MALDI and ESI mass spectrometry*. J Mass Spectrom, 2009. **44**(5): p. 821-31.
228. Xue, Y., et al., *GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(9): p. 1598-608.
229. Cruz-Orcutt, N., et al., *Activated PLC-gamma1 is catalytically induced at LAT but activated PLC-gamma1 is localized at both LAT- and TCR-containing complexes*. Cell Signal, 2014. **26**(4): p. 797-805.
230. Shim, E.K., et al., *Association of the Src homology 2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kD (SLP-76) with the p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase*. FEBS Lett, 2004. **575**(1-3): p. 35-40.
231. Liu, D., *The adaptor protein Crk in immune response*. Immunol Cell Biol, 2014. **92**(1): p. 80-9.
232. Gelkop, S., et al., *Involvement of crk adapter proteins in regulation of lymphoid cell functions*. Immunol Res, 2003. **28**(2): p. 79-91.
233. Isakov, N., *A new twist to adaptor proteins contributes to regulation of lymphocyte cell signaling*. Trends Immunol, 2008. **29**(8): p. 388-96.

234. Gelkop, S., Y. Babichev, and N. Isakov, *T cell activation induces direct binding of the Crk adapter protein to the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (p85) via a complex mechanism involving the Cbl protein*. J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36174-82.
235. Gelkop, S. and N. Isakov, *T cell activation stimulates the association of enzymatically active tyrosine-phosphorylated ZAP-70 with the Crk adapter proteins*. J Biol Chem, 1999. **274**(31): p. 21519-27.
236. Au-Yeung, B.B., et al., *A genetically selective inhibitor demonstrates a function for the kinase Zap70 in regulatory T cells independent of its catalytic activity*. Nat Immunol, 2010. **11**(12): p. 1085-92.
237. Ichiba, T., et al., *Activation of C3G guanine nucleotide exchange factor for Rap1 by phosphorylation of tyrosine 504*. J Biol Chem, 1999. **274**(20): p. 14376-81.
238. Zhang, W., et al., *Negative regulation of T cell antigen receptor-mediated Crk-L-C3G signaling and cell adhesion by Cbl-b*. J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 23978-83.
239. Evans, J.C., et al., *Phosphorylation of serine 106 in Asef2 regulates cell migration and adhesion turnover*. J Proteome Res, 2014. **13**(7): p. 3303-13.
240. Kawasaki, Y., et al., *Identification and characterization of Asef2, a guanine-nucleotide exchange factor specific for Rac1 and Cdc42*. Oncogene, 2007. **26**(55): p. 7620-267.
241. Astoul, E., et al., *PI 3-K and T-cell activation: limitations of T-leukemic cell lines as signaling models*. Trends Immunol, 2001. **22**(9): p. 490-6.
242. Shan, X., et al., *Deficiency of PTEN in Jurkat T cells causes constitutive localization of Itk to the plasma membrane and hyperresponsiveness to CD3 stimulation*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(18): p. 6945-57.
243. Wang, X., et al., *The tumor suppressor PTEN regulates T cell survival and antigen receptor signaling by acting as a phosphatidylinositol 3-phosphatase*. J Immunol, 2000. **164**(4): p. 1934-9.
244. Seminario, M.C. and R.L. Wange, *Signaling pathways of D3-phosphoinositide-binding kinases in T cells and their regulation by PTEN*. Semin Immunol, 2002. **14**(1): p. 27-36.
245. Srivastava, N., R. Sudan, and W.G. Kerr, *Role of inositol poly-phosphatases and their targets in T cell biology*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 288.
246. Dong, S., et al., *T cell receptor for antigen induces linker for activation of T cell-dependent activation of a negative signaling complex involving Dok-2, SHIP-1, and Grb-2*. J Exp Med, 2006. **203**(11): p. 2509-18.
247. Edmunds, C., et al., *CD28 stimulates tyrosine phosphorylation, cellular redistribution and catalytic activity of the inositol lipid 5-phosphatase SHIP*. Eur J Immunol, 1999. **29**(11): p. 3507-15.
248. Kim, C.H., et al., *Altered responsiveness to chemokines due to targeted disruption of SHIP*. J Clin Invest, 1999. **104**(12): p. 1751-9.
249. Nishio, M., et al., *Control of cell polarity and motility by the PtdIns(3,4,5)P3 phosphatase SHIP1*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(1): p. 36-44.
250. Wain, C.M., J. Westwick, and S.G. Ward, *Heterologous regulation of chemokine receptor signaling by the lipid phosphatase SHIP in lymphocytes*. Cell Signal, 2005. **17**(10): p. 1194-202.
251. Barrow, A.D. and J. Trowsdale, *You say ITAM and I say ITIM, let's call the whole thing off: the ambiguity of immunoreceptor signalling*. Eur J Immunol, 2006. **36**(7): p. 1646-53.
252. Dragone, L.L., et al., *SLAP, a regulator of immunoreceptor ubiquitination, signaling, and trafficking*. Immunol Rev, 2009. **232**(1): p. 218-28.
253. O'Brien, R., et al., *Alternative modes of binding of proteins with tandem SH2 domains*. Protein Sci, 2000. **9**(3): p. 570-9.
254. Kliche, S., et al., *CCR7-mediated LFA-1 functions in T cells are regulated by 2 independent ADAP/SKAP55 modules*. Blood, 2012. **119**(3): p. 777-785.
255. Kumar, A., et al., *CXCR4 physically associates with the T cell receptor to signal in T cells*. Immunity, 2006. **25**(2): p. 213-24.

256. Okabe, S., et al., *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, 2006. **36**(2): p. 308-14.
257. Lin, Y.P., et al., *Zap70 controls the interaction of talin with integrin to regulate the chemotactic directionality of T-cell migration*. Mol Immunol, 2010. **47**(11-12): p. 2022-9.
258. Ottoson, N.C., et al., *Cutting edge: T cell migration regulated by CXCR4 chemokine receptor signaling to ZAP-70 tyrosine kinase*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 1857-61.
259. Ticchioni, M., et al., *Signaling through ZAP-70 is required for CXCL12-mediated T-cell transendothelial migration*. Blood, 2002. **99**(9): p. 3111-8.
260. Jordan, M.S., *Genetic reconstitution of bone marrow for the study of signal transduction ex vivo*. Methods Mol Biol, 2006. **332**: p. 331-42.
261. Flinta, C., et al., *Sequence determinants of cytosolic N-terminal protein processing*. Eur J Biochem, 1986. **154**(1): p. 193-6.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ADAP	<i>Adhesion and degranulation promoting adaptor protein</i>
AG	Arbeitsgruppe
AP1	<i>Activator protein 1</i>
APC	<i>Antigen presenting cell</i>
AQUA	<i>Absolute quantification</i>
ARP2/3	<i>Actin related protein 2/3</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCL10	<i>B-cell CLL-lymphoma 10</i>
BCR	B-Zellrezeptor
BIC	<i>Base peak ion chromatogram</i>
C3G	<i>CRK SH3-binding guanine-nucleotide-releasing protein</i>
ca.	<i>circa</i>
CALDAG	<i>Ca²⁺ and DAG-regulated</i>
CARMA1	<i>Caspase recruitment domain membrane-associated guanylate kinase protein 1</i>
CCL	<i>CC motif chemokine ligand</i>
CCR	<i>CC motif chemokine receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CID	<i>Collision induced dissociation</i>
CRK	<i>CT10 regulator of kinase</i>
CRKL	<i>CRK-like protein</i>
cSMAC	<i>central supramolecular activation cluster</i>
CXCL	<i>CXC motif chemokine ligand</i>
CXCR	<i>CXC motif chemokine receptor</i>
DAG	Diacylglycerol
DC	Dendritische Zelle
DMP	Dimethylpimelimidat
dSMAC	<i>distal supramolecular activation cluster</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
et al.	<i>et alii</i>
EVH1	<i>Ena/VASP homology 1</i>
EVL	<i>Ena-VASP-like</i>
FA	Ameisensäure (<i>formic acid</i>)
Fc	<i>Fragment crystallisable</i>
fDC	<i>Follicular dendritic cell</i>
F-Aktin	Filamentöses Aktin
FERM	<i>Four-point-one ezrin radixin moesin</i>
FYB	<i>FYN binding protein</i>
GADS	<i>Grb2-related adaptor downstream of shc</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i> (GTP-Austauschfaktor)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-(2-ethansulfonsäure)

HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
hSH3	<i>helical extended SH3</i>
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
ICAT	<i>Isotope-coded affinity tag</i>
Ig	Immunglobulin
IKK	<i>Inhibitor of kappa B kinase</i>
IP3	<i>Inositol-1,4,5-trisphosphat</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IS	Immunologische Synapse
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
ITRAQ	<i>Isobaric tags for relative and absolute quantitation</i>
I κ B α	<i>Inhibitor of kappa B alpha</i>
JAK	Januskinase
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
K _D	Dissoziationskonstante
LAD	<i>Leukocyte adhesion deficiency</i>
LAT	<i>Linker for activation of T cells</i>
LC	Flüssigchromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
LCK	<i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MALT1	<i>Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MST1	<i>Mammalian STE20-like protein kinase 1</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphat</i>
NCK	<i>Non-catalytic region of tyrosine kinase</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NF κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLS	<i>Nuclear localisation sequence</i>
OD	optische Dichte
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	<i>Protein data bank</i>
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PIK3R1	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha</i>
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKC θ	Proteinkinase C theta
PLC γ	Phospholipase C gamma
POM121C	<i>Pore membrane protein of 121 kDa C</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PRS	prolinreiche Sequenz
PSGL-1	<i>P-selektin glycoprotein ligand-1</i>
pSMAC	<i>peripheral supramolecular activation cluster</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PTM	Posttranslationale Modifikation
RAP1	<i>RAS-proximity-1</i>
RAPL	<i>Regulator of adhesion and cell polarization enriched in lymphoid tissues</i>

RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RIAM	<i>RAP1 GTP-interacting adaptor molecule</i>
RNAi	<i>RNA-Interferenz</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RP	<i>Reversed phase</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
SDS	<i>Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)</i>
SDS-PAGE	<i>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>
SF	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SH2	<i>Src homology 2</i>
SH3	<i>Src homology 3</i>
SHIP	<i>SH2-containing inositol phosphatase</i>
SHP-1/2	<i>SH2 containing protein tyrosine phosphatase-1/2</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
SILAC	<i>Stable isotope labeling with/by amino acids in cell culture</i>
SKAP55	<i>SRC kinase-associated phosphoprotein of 55 kDa</i>
SLAP130	<i>SLP-76-associated phosphoprotein of 130 kDa</i>
SLP76	<i>SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa</i>
S/N	<i>Signal-Rausch-Verhältnis (signal-to-noise ratio)</i>
SOS	<i>Son of sevenless</i>
SPATA13	<i>Spermatogenesis-associated protein 13</i>
SRC	<i>Sarcoma</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
SYK	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TAK1	<i>Transforming growth factor-beta-activated protein kinase</i>
tSH2	<i>Tandem src homology</i>
TCR	<i>T-Zellrezeptor</i>
TFA	<i>Trifluoressigsäure (trifluoroacetic acid)</i>
T _H -Zelle	<i>T-Helferzelle</i>
TLR	<i>Toll-like-receptor</i>
TOF	<i>Time of flight</i>
TRAF6	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
T _{reg} -Zelle	<i>regulatorische T-Zelle</i>
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule for VLA-4</i>
VLA-4	<i>Very late antigen 4</i>
WASP	<i>Wiskott-aldrich syndrome protein</i>
WAVE2	<i>WASP family member 2</i>
XIC	<i>Extracted ion chromatogram</i>
ZAP70	<i>Zeta chain-associated kinase of 70 kDa</i>

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Extravasation von T-Zellen	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung der immunologischen Synapse	7
Abbildung 3: Aktivierung des TCRs und Signaltransduktion	9
Abbildung 4: Die Konformationen des Integrins LFA-1.....	11
Abbildung 5: Schematische Darstellung des <i>inside-out/outside-in</i> -Signalweges in T-Zellen.....	12
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Adapterproteins ADAP mit bekannten Bindungsmotiven	16
Abbildung 7: Präparation von FYN-Kinase und ADAP aus <i>SF21</i> -Insektenzellen	47
Abbildung 8: <i>In vitro</i> -Phosphorylierung von ADAP mit FYN-Kinase.....	49
Abbildung 9: Eingesetzte ADAP-Peptide und ADAP-Konstrukte für SILAC-basierte <i>Pulldown</i> -Experimente	51
Abbildung 10: SILAC-basierte <i>Pulldown</i> -Experimente mit synthetischen ADAP-Peptiden.....	53
Abbildung 11: <i>In vitro</i> -Phosphorylierung von GST-hSH3 ^N mit FYN-Kinase	55
Abbildung 12: SILAC-basierte <i>Pulldown</i> -Experimente mit ADAP-hSH3 ^N	56
Abbildung 13: SILAC-basierte <i>Pulldown</i> -Experimente mit ADAP-600 und ADAP-dbl	59
Abbildung 14: NMR-Untersuchung der Y571-phosphorylierten ADAP-hSH3 ^N -Domäne	62
Abbildung 15: NMR-Untersuchung der ADAP-hSH3 ^N -Domäne nach Zugabe von ZAP0-tSH2.	63
Abbildung 16: NMR-Untersuchung von ZAP0-tSH2 nach Zugabe der ADAP-hSH3 ^N -Domäne	64
Abbildung 17: Ermittelte Bindungsepitope von ADAP-hSH3 ^N und ZAP70-tSH2 aus NMR-Bindungsstudien.....	65
Abbildung 18: MST-Untersuchungen zur Ermittlung der Bindungsaffinität von ADAP-hSH3 ^N und ZAP70-tSH2... 67	67
Abbildung 19: Nachweis der ADAP-ZAP70-Interaktion nach TCR- und CXCR4-Stimulation.	68
Abbildung 20: Exemplarische Darstellung eines GST-basierten <i>Pulldown</i> -Experiments	69
Abbildung 21: Reaktionsschema der Sortase A-vermittelten Ligation	70
Abbildung 22: Schematische Darstellung der Sortase A-vermittelten Immobilisierung	71
Abbildung 23: Optimierung der Reaktionsbedingungen	72
Abbildung 24: Sortase A-vermittelte Immobilisierung von Proteinen und Einfluss der Linkerlänge	73
Abbildung 25: Absolute Quantifizierung der Ligationsausbeute mittels MALDI-MS.....	74
Abbildung 26: Anwendung der Sortase A-vermittelten Immobilisierungstechnik für <i>Pulldown</i> -Experimente	76
Abbildung 27: Klassifizierung der identifizierten Proteine (CD2BP2-GYF- <i>Pulldown</i>).....	77
Abbildung 28: Entfernung dominierender Peptidsignale des Köderproteins durch den Einsatz der Sortase A	78
Abbildung 29: Vergleich der Vorhersagewerte für die Phosphorylierung von ADAP durch die FYN.....	81
Abbildung 30: Übersicht der phosphorylierungsabhängigen Interaktionspartner des Adapterproteins ADAP	89
Abbildung 31: Einfluss von ADAP-Y571 auf die Migration und Aktin-Polymerisation von Jurkat T-Zellen.....	94

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Peptidsequenzen	27
Tabelle 2: Verwendete Expressionskonstrukte	28
Tabelle 3: Komponenten zur Herstellung von 1 L M9-Minimalmedium.....	30
Tabelle 4: Phosphorylierungsabhängige Interaktionspartner von ADAP-Y571 aus Jurkat T-Zellen	53
Tabelle 5: Phosphorylierungsabhängige Interaktionspartner von ADAP-Y462 aus Jurkat T-Zellen	53
Tabelle 6: Phosphorylierungsabhängige Interaktionspartner von ADAP-hSH3 ^N aus Jurkat T-Zellen	57
Tabelle 7: Phosphorylierungsabhängige Interaktionspartner von ADAP-hSH3 ^N aus primären T-Zellen	57
Tabelle 8: Phosphorylierungsabhängige Interaktionspartner von ADAP-600 aus Jurkat T-Zellen	59
Tabelle 9: Phosphorylierungsabhängige Interaktionspartner von ADAP-dbl aus Jurkat T-Zellen	60

8.4 Publikationen

Publikationen im Rahmen dieser Arbeit

Kuropka, B., A. Witte, J. Sticht, N. Waldt, P. Majkut, C. Hackenberger, B. Schraven, E. Krause, S. Kliche, and C. Freund, *Analysis of phosphorylation-dependent protein interactions of ADAP reveals novel interaction partners required for chemokine-directed T cell migration*. Mol Cell Proteomics (eingereicht)

Kuropka, B., N. Royla, C. Freund, and E. Krause, *Sortase A-mediated site-specific immobilization for identification of protein interactions in affinity purification-mass spectrometry experiments*. Proteomics, 2015. doi: 10.1002/pmic.201400395.

Lang, D., S. Anker, **B. Kuropka**, and E. Krause, *Combining enzymatic O-18-labeling and 2-DLC-MS/MS for a study of protein interactions in primary T cells*. Analytical Methods, 2013. **5**(4): p. 1058-1061.

Witte, A., J. Degen, K. Baumgart, N. Waldt, **B. Kuropka**, C. Freund, B. Schraven and S. Kliche, *Emerging Roles of ADAP, SKAP55, and SKAP-HOM for Integrin and NF- κ B Signaling in T cells*. J Clin Cell Immunol, 2012. doi:10.4172/2155-9899.S12-002.

Publikationen im Zusammenhang mit anderen Projekten

Hebel, K., S. Weinert, **B. Kuropka**, J. Knolle, B. Kosak, G. Jorch, C. Arens, E. Krause, R. C. Braun Dullaes, and M. C. Brunner-Weinzierl, *CD4(+) T Cells from Human Neonates and Infants Are Poised Spontaneously To Run a Nonclassical IL-4 Program*. Journal of Immunology, 2014. **192**(11): p. 5160-5170.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt **Dr. Eberhard Krause** und **Prof. Dr. Christian Freund** für die Bereitstellung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung in wissenschaftlicher und persönlicher Hinsicht. Eure Unterstützung und Motivation haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Auch für die wertvollen Erfahrungen, die ihr mir durch verschiedene Konferenzbesuche ermöglicht habt, danke ich euch herzlich.

Allen derzeitigen und ehemaligen **Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Freund und Krause**, die mich in den letzten vier Jahren mit Rat und Tat unterstützt und begleitet haben, danke ich für die überaus angenehme Zusammenarbeit und das stets kollegiale Arbeitsklima.

Insbesondere gilt mein Dank **Dr. Diana Lang** und **Annika Manns** für die tolle gemeinsame Zeit im Labor und viele konstruktive Gespräche. Ebenso möchte ich mich bei **Dr. Michael Schümann** und **Heike Stephanowitz** für die freundliche Zusammenarbeit sowie die exzellente technische Unterstützung rund um die Massenspektrometrie bedanken. **Nadine Royla** danke ich vor allem für die Unterstützung im Sortase-Projekt.

Besonderem Dank gebührt auch **Dr. Bernhard Meineke** für seine Hilfsbereitschaft und die vielen praktischen Tipps zur Expression und Aufreinigung von Proteinen. Bei **Dr. Kirill Piotukh** möchte ich mich für seine Diskussionsbereitschaft sowie die Unterstützung in molekularbiologischen Fragestellungen bedanken. **Dr. Jana Sticht** danke ich vor allem für die Hilfestellung am NMR-Spektrometer. Für die organisatorische und praktische Unterstützung im Labor möchte ich mich herzlich bei **Kathrin Motzny** und **Claudia Kipar** bedanken.

Darüber hinaus möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei allen Kooperationspartnern zu bedanken. Vor allem **Prof. Dr. Burkhard Schraven**, **Dr. Stefanie Kliche** und **Amelie Witte** von der Universität Magdeburg danke ich für die Durchführung der funktionellen Studien sowie die angenehme und konstruktive Zusammenarbeit. Zudem danke ich **Dr. Paul Majkut** für die Unterstützung bei den MST-Messungen.

Abschließend bedanke ich mich ganz herzlich bei meiner **Familie** und meiner Freundin **Lisa**. Euer Glaube an mich und die kontinuierliche Unterstützung bedeuten mir sehr viel.



