

Proteomische und biophysikalische Analyse GYF-Domänen-vermittelter Interaktionen

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-Biochemikerin

Daniela Kosslick

aus Berlin

2012

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Christian Freund von Januar 2008 bis April 2012 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP), Berlin und der Freien Universität Berlin angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Christian Freund
Freie Universität Berlin
Institut für Chemie und Biochemie
Thielallee 63
14195 Berlin

Zweitgutachter: Prof. Dr. Markus Wahl
Freie Universität Berlin
Institut für Chemie und Biochemie
Strukturbiochemie
Takustr. 6
14195 Berlin

Datum der Disputation: 27. August 2012

Zusammenfassung

GYF-Domänen bezeichnen eine kleine Familie von Protein-Interaktionsdomänen, die prolinreiche Sequenzen (PRS) binden und über die Erkennung dieser mit anderen Proteinen interagieren. Benannt sind sie nach dem konservierten Motiv aus Glycin, Tyrosin und Phenylalanin (GYF) innerhalb der Domäne, das direkt an der Bindung des Liganden beteiligt ist. Aus dem Sequenzvergleich verschiedener GYF-Domänen wurden zwei Unterfamilien, die der CD2BP2- und Smy2-ähnlichen GYF-Domänen, definiert. Neben Sequenz- und Strukturunterschieden der Unterfamilien, sind sie auch in Proteinen unterschiedlicher Zellkompartimente enthalten. Während Proteine mit einer Domäne vom CD2BP2-Typ mit dem Spleißprozess im Zellkern assoziiert sind, weisen Proteine mit einer GYF-Domäne vom Smy2-Typ eine zytoplasmatische Lokalisation auf.

Es gibt bereits erste Hinweise auf Interaktionspartner der GYF-Domänen, jedoch ist die biologische Funktion von GYF-Proteinen noch weitgehend unbekannt. In dieser Arbeit wurde das direkte Interaktom der GYF-Domänen der humanen Proteine CD2BP2 und GIGYF2, sowie des Hefeproteins Smy2 mit dem Ziel untersucht, weitere Hinweise auf ihre Funktion zu erhalten. Hierzu wurden die isolierten GYF-Domänen in *Pulldown*-Experimenten eingesetzt und ihre Bindungspartner über Massenspektrometrie (MS) bestimmt. Durch Ausnutzung der quantitativen MS konnte eine spezifische Identifizierung des Interaktoms der jeweiligen PRS-Bindungsstellen durchgeführt werden. Für GIGYF2 und Smy2 war dies die erste Charakterisierung PRS-vermittelter Bindungspartner. Für CD2BP2 wurden bereits bestehende Interaktomdaten in einem organspezifischen Kontext neu untersucht.

Da eine Vielzahl essentieller, intrazellulärer Prozesse auf der Erkennung prolinreicher Sequenzen durch PRS-Bindungsdomänen (PRDs) beruht, ist diese Interaktion auch von therapeutischem Interesse. Daher wurden im zweiten Teil dieser Arbeit zwei Strategien zur spezifischen Inhibition dieser Proteininteraktion betrachtet. Die Validierung der Inhibitionsmethoden, entweder durch ein Peptidmimetikum oder durch ein Kleinmolekül, erfolgte durch NMR-spektroskopische Bindungsstudien.

In dieser weitreichenden Untersuchung direkter Bindungspartner der GYF-Domänen konnten neue, noch unbekannte Interaktionen ermittelt werden. Insbesondere die Daten für GIGYF2 und Smy2, Proteine, die sich durch eine zytoplasmatische Lokalisation und eine GYF-Domäne vom Smy2-Typ auszeichnen, lieferten Hinweise auf eine konservierte Funktion. Beide Proteine können im Kontext bereits beschriebener Funktionen und mittels der Ergebnisse dieser Arbeit in Verbindung mit mRNA-prozessierenden Proteinen und der vesikulären Transportmaschinerie gebracht werden. Für CD2BP2 legt die deutliche Expression in hämatopoetischen Organen adulter Mäuse eine potentielle Funktion im Immunsystem nahe. Auch wenn keine neuen, direkten Bindungspartner ermittelt wurden, untermauern die Ergebnisse die Assoziation mit spleißosomalen Komplexen. Darüber hinaus ist eine Funktion in Kombination mit weiteren mRNA-prozessierenden Proteinen im Zellkern möglich.

Während die Suche nach einem Kleinmolekül keine geeigneten Inhibitoren hervorbrachte, ergaben sich aus der Untersuchung des Peptidmimetikums erste Hinweise auf mögliche Ansatzpunkte zur Inhibition der PRS/PRD-Interaktion. Obwohl das Peptidmimetikum kein hoch affiner Ligand der GYF-Domäne war, ist es als Ausgangspunkt für weitere Optimierungsschritte nützlich.

Zusammenfassend tragen die Ergebnisse dieser Arbeit zum tieferen Verständnis von GYF-Domänen und deren Beteiligung an zellulären Prozessen teil.

Abstract

GYF domains belong to a small class of protein adapter domains, which recognize proline-rich sequences (PRS) within their binding partners. They are named after a conserved motif consisting of glycine, tyrosine and phenylalanine (GYF) in the domain that is directly involved in ligand binding.

GYF domains are divided into two subfamilies: the CD2BP2- and Smy2-like GYF domains which differ in sequence and structure. In addition to these differences, proteins containing either of these domains are found in different cellular compartments. While proteins containing a CD2BP2-type GYF domain are associated with splicing in the nucleus, proteins with a Smy2-type domain show cytoplasmic localization. The biological role of GYF proteins is still largely unknown, although there are few described interaction partners.

The aim of this work was to selectively detect proteins and protein complexes bound via proline-rich sequences to the GYF domains of the human proteins CD2BP2 and GIGYF2, as well as the yeast protein Smy2 to gain further information about their function.

For this reason, the isolated GYF domains were used in pull-down experiments in combination with quantitative mass spectrometry (MS). This was the first characterization of PRS-mediated binding partners for GIGYF2 and Smy2. For CD2BP2 this study was performed in an organ specific analysis of interaction partners as extension of previous studies.

As a variety of essential, intracellular processes is based on the recognition of proline-rich sequences by PRS-binding domains (PRDs), this interaction is also of therapeutic interest.

Therefore, in the second part of this work, two strategies for specific inhibition of this protein interaction (by either a peptide mimetic or a small molecule) were validated by NMR spectroscopic binding studies.

In this study new binding partner of the GYF domains were determined. In particular, for GIGYF2 and Smy2, that are characterized by a cytoplasmic localization and a Smy2-type GYF domain, this study provided information for a conserved function. Together with

previously described functions the results of this work links both proteins to mRNA-processing proteins and the vesicular transport.

The distinct expression of CD2BP2 in hematopoietic organs in adult mice refers to a potential role of CD2BP2 in the immune system. Even if no new direct binding partner has been identified, the results support the association with spliceosomal complexes. In addition, it is tempting to speculate about a function of CD2BP2 with other mRNA-processing proteins in the nucleus.

The small molecule approach did not result in the identification of specific PRS/PRD-inhibitors. Although the peptidomimetic was not a high affinity ligand for the GYF domain, it will be useful for further optimization steps.

In summary, the results of this study contribute in part to a deeper understanding of GYF domains and their involvement in cellular processes.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABSTRACT	III
INHALTSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Bindungsdomänen prolinreicher Liganden	2
1.2 Die GYF-Domäne	6
1.2.1 Struktur und Ligandenbindung	6
1.2.2 Bindungsspezifität der GYF-Domänen	8
1.3 Proteine mit GYF-Domänen	10
1.3.1 GIGYF2	10
1.3.2 Smy2	12
1.3.3 CD2BP2	14
1.3.4 Hinweise auf eine spleißosomale Funktion von CD2BP2	14
1.3.5 Beschriebene Interaktionen anderer GYF-Proteine	16
1.4 Regulation der Genexpression: von der Transkription bis zur Degradation von mRNA	16
1.5 Massenspektrometrie in der Proteomik	19
1.6 Zielsetzung	20
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Materialien	21
2.1.1 Allgemeine Chemikalien	21
2.1.2 Puffer, Lösungen und Medien	21
2.1.3 Enzyme	21
2.1.4 Reaktionschemikaliensätze	22
2.1.5 Vektoren	22
2.1.6 Oligonukleotide und DNA-Sequenzierungen	22
2.1.7 DNA-Konstrukte	24

2.1.8	Bakterienstämme und Phagen	24
2.1.9	Säugerzelllinien.....	25
2.1.10	Hefestämme	25
2.1.11	Antikörper, Peptide und Isotope.....	26
2.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	27
2.2.1	Geräte.....	27
2.2.2	Verbrauchsmaterialien	28
2.2.3	Wissenschaftliche Computerprogramme und Datenbanken.....	29
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	29
2.3.1	PCR-basierte Klonierung	29
2.3.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	30
2.3.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	30
2.3.4	Restriktionsverdau von DNA.....	30
2.3.5	DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	31
2.3.6	Herstellung elektrokompetenter Bakterien.....	31
2.3.7	Transformation von Bakterien	31
2.3.8	Kultivierung von Bakterien.....	32
2.3.9	Isolierung von Plasmid-DNA.....	32
2.3.10	Kultivierung von Hefezellen	32
2.3.11	Kultivierung von Hefezellen in synthetischem Minimalmedium.....	33
2.3.12	Transformation von Hefezellen.....	34
2.3.13	DNA-Extraktion aus Hefe	35
2.3.14	Chromosomales <i>Taggen</i> von Hefeproteinen	35
2.4	Proteinchemische und biochemische Methoden.....	36
2.4.1	Expression rekombinanter Proteine.....	36
2.4.2	Bakterienaufschluss durch Ultraschall	37
2.4.3	Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von His ₆ - und GST-Fusionsproteinen.....	37
2.4.4	Thrombinspaltung von Fusionsproteinen.....	38
2.4.5	Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration).....	38
2.4.6	Konzentrieren und Umpuffern von Proteinen	38
2.4.7	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Absorption	39
2.4.8	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	39
2.4.9	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
2.4.10	Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie	41
2.4.11	Western Blot und Immunchemische Detektion von Proteinen.....	41
2.4.12	GST- <i>Pulldown</i> -Analyse	42
2.4.13	PIP- <i>Strip</i> -Analyse	42
2.4.14	Phagen-Display	43
2.4.15	Tryptischer Verdau von Proteinen im SDS-Gel.....	46
2.4.16	¹⁸ O-Markierung von Peptiden	46
2.5	Zellbiologische Methoden.....	47
2.5.1	Kultivierung eukaryoter Zelllinien	47
2.5.2	Transiente Transfektion von HeLa S3-Zellen	47
2.5.3	Gewinnung von Lysat aus eukaryotischen Zellen.....	47
2.5.4	Metabolische Isotopenmarkierung von HeLa-S3 Zellen.....	48
2.5.5	Isotopenmarkierung von Hefeproteinen	48
2.5.6	Konfokale Lasermikroskopie	49
2.6	Biophysikalische Methoden.....	49
2.6.1	Massenspektrometrische Proteinanalytik	49

2.6.2	Quantitative Proteomik	50
2.6.3	SILAC	51
2.6.4	SILAC-Pulldown/MS-Experiment	51
2.6.5	Quantifizierung und Datenauswertung	53
2.6.6	NMR-Spektroskopie	54
2.6.7	Bestimmung von Bindungskonstanten	54
2.6.8	NMR-Bindungsstudien mit den <i>small molecules</i>	55
2.6.9	Fluoreszenztitration zur Bestimmung von Bindungskonstanten	55
2.6.10	Swiss-Model	56
3	ERGEBNISSE	57
3.1	Interaktom der GYF-Domänen vom Smy2-Typ	57
3.1.1	Peptid-vermittelte Inhibition der PRS-Bindungsstelle.	57
3.1.2	Strategie zur Identifizierung von Bindungspartnern	59
3.1.3	Das Interaktom der Smy2-GYF-Domäne	61
3.1.4	Das Interaktom der GIGYF2-GYF-Domäne	64
3.2	Validierung der SILAC-Ergebnisse für die GYF-Domänen vom Smy2-Typ	69
3.2.1	Interaktionspartner der GYF-Domäne von Smy2	69
3.2.2	Interaktionspartner der GYF-Domäne von GIGYF2	72
3.2.3	Verteilung von PPGΦ-Motiven in Proteinen aus Mensch und Hefe	74
3.2.4	Vergleich der beschriebenen Interaktionen mit den Ergebnissen der SILAC-Experimente	75
3.3	Analyse der Funktion der C-terminalen Domäne von Smy2	76
3.3.1	Phagen-Display	77
3.3.2	SILAC-Pulldown mit GST-Smy2-C631	77
3.3.3	Analyse von Lipid-Protein-Interaktionen	79
3.3.4	NMR Titration mit IP3	80
3.4	Interaktombestimmung der GYF-Domäne von CD2BP2	82
3.4.1	Die W8R Y33A-Mutante der GYF-Domäne von CD2BP2 bindet keine prolinreichen Sequenzen ...	82
3.4.2	Organspezifische Expression von CD2BP2 in der Maus	84
3.4.3	Bestimmung des CD2BP2-GYF Interaktoms mittels ¹⁸ O-Markierung	85
3.5	Inhibition der PRS-Bindungsstelle der GYF Domänen von CD2BP2 und GIGYF2	91
3.5.1	Inhibition der PRS-Bindungsstelle durch ein Peptidmimetikum	91
3.5.2	Bestimmung der Dissoziationskonstanten Fluorescein-gekoppelter Peptide	93
3.5.3	Validierung der <i>small molecules</i>	97
3.5.4	Verdrängungsexperiment mit D058-0287	100
4	DISKUSSION	103
4.1	Methoden der Proteomanalyse	103
4.1.1	Strategie zur Identifizierung neuer Interaktionspartner der GYF-Proteine	104
4.1.2	Bewertung der Versuchsdurchführung	106
4.2	Inhibition von PRS-Bindungsdomänen	108
4.2.1	Inhibition der GYF-Domäne von CD2BP2 mit einem Peptidmimetikum	108
4.2.2	Validierung der <i>small molecules</i> für das PRS-Bindungssepitop der CD2BP2- GYF-Domäne	109
4.2.3	Bewertung der Strategien zur Identifizierung von Inhibitoren	110
4.3	Die GYF-Domäne von Smy2 bindet an Proteine der mRNA-Prozessierung	111

4.3.1	Die C-terminale Domäne von Smy2 vermittelt keine Protein-Protein-Interaktion	112
4.3.2	Bewertung der Versuche mit der GYF- und der C-terminalen Domäne von Smy2	113
4.4	GIGYF2 interagiert mit Proteinen des sekretorischen Transportweges und des mRNA Metabolismus.....	114
4.4.1	Gemeinsamkeiten der Proteine mit Smy2-Typ GYF-Domäne.....	115
4.5	Die GYF-Domäne von CD2BP2 bindet mRNA-Prozessierungsfaktoren.....	116
4.6	Organspezifische Interaktionspartner der GYF-Domäne von CD2BP2.....	118
4.7	Schlussfolgerung	119
5	LITERATUR.....	121
6	ANHANG.....	129
6.1	Tabellenverzeichnis.....	129
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	129
6.3	Anreicherungs-faktoren der Proteine der Smy2-GYF-SILAC-Pulldown-Experimente	130
6.4	Anreicherungs-faktoren der Proteine der GIGYF2-GYF SILAC-Pulldown-Experimente	134
6.5	Proteinsequenz von SMN	140
6.6	Beschriebene Interaktionspartner von Smy2 und GIGYF2.....	140
6.7	Anreicherungs-faktoren der Proteine der CD2BP2-GYF-Pulldown-Experimente mit ¹⁸ O-Markierung.....	142
6.8	NMR-Untersuchungen mit den <i>small molecules</i>	145
6.9	Abkürzungsverzeichnis	147
	PUBLIKATIONEN	151
	DANKSAGUNG	153

1 Einleitung

Proteine spielen eine entscheidende Rolle für die zelluläre Funktionalität und sind an fast allen biologischen Vorgängen beteiligt. In der Regel sind Proteine lineare Polymere, die aus Aminosäuren aufgebaut sind. Neben dieser als Primärstruktur bezeichneten linearen Aminosäureabfolge weisen Proteine Sekundär- und Tertiärstrukturelemente auf, die die Eigenschaften eines Proteins deutlich beeinflussen. Die Sekundärstruktur der Polypeptidkette wird dabei durch Interaktionen zwischen den Aminosäuren definiert. Die häufigsten Sekundärstrukturelemente sind die Ausbildung helikaler Strukturen, den sogenannten α -Helices, oder der parallelen Anordnung einzelner Proteinsequenzabschnitte zueinander, den β -Faltblättern. Die Faltung eines Proteins führt zur sogenannten Tertiärstruktur, bei der die Sekundärstrukturelemente eine kompakte Anordnung unter Ausbildung eines hydrophoben Kerns zueinander aufweisen. Die Gesamtanordnung der Polypeptidkette kann dadurch zur Ausbildung globulärer Strukturen führen. Oftmals nimmt die Polypeptidkette eines Proteins nicht als gesamte Einheit eine Tertiärstruktur ein. Stattdessen bildet sie Proteindomänen aus, die solche globulären Strukturen einer Teilsequenz des Proteins sind. Proteine, die aus mehreren Polypeptidketten aufgebaut sind, besitzen zudem eine Quartärstruktur (Abbildung 1.1). Jede einzelne Polypeptidkette des Proteins wird als Untereinheit bezeichnet. Die räumliche Anordnung der Untereinheiten und ihre Wechselwirkungen untereinander beschreiben die Quartärstruktur. Nicht jede Polypeptidkette bildet jedoch dauerhafte Sekundär- und Tertiärstrukturen aus. Ein Beispiel dafür sind intrinsisch ungefaltete Proteine (IUPs), die sich durch große unstrukturierte Bereiche auszeichnen.

Die Funktionen von Proteinen ergeben sich neben ihrer zellulären Lokalisation auch aus deren dreidimensionaler Struktur. Proteine fungieren unter anderem als Gerüstproteine, Membranproteine, Enzyme, Hormone, Rezeptoren und Antikörper. Sie können sowohl miteinander als auch mit anderen Molekülgruppen wie etwa Nukleinsäuren oder Lipiden interagieren.

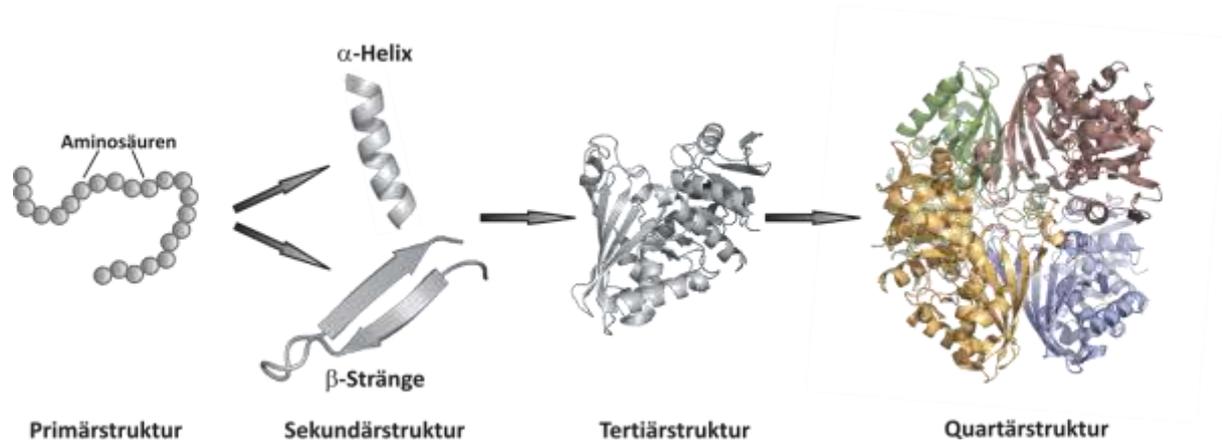


Abbildung 1.1: Proteinstrukturen. Die Polypeptidkette (Primärstruktur) eines Proteins nimmt eine räumliche Konformation (Tertiärstruktur) ein, die aus der Anordnung der Sekundärstrukturelemente (α -Helix, β -Stränge/Faltblatt) zueinander resultiert. Proteine, die aus mehreren Polypeptidketten aufgebaut sind, besitzen eine Quartärstruktur (PDB: 1Z9Q, GAPDH aus humaner Leber).

Protein-Protein-Interaktionen, wie beispielsweise die Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren sowie die Bildung funktioneller Proteinkomplexe, sind dabei von entscheidender Bedeutung. Die Vielzahl biologischer Funktionen basiert auf der Ausbildung von Protein-Komplexen, an denen modulare Proteindomänen maßgeblich beteiligt sind. Sogenannte Adapterproteine besitzen Domänen, die der Zusammenführung von Proteinbindungspartnern dienen und somit die Ausbildung größerer Signalkomplexe ermöglichen. Adapterproteine spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse, wie beispielsweise der Signaltransduktion, indem sie die Bindung an Proteine oder andere Biomakromoleküle wie Lipide oder Nukleinsäuren vermitteln^[1]. Die dafür notwendigen, als Adapterdomänen bezeichneten Proteinabschnitte besitzen keine enzymatische Aktivität und fungieren als Gerüstprotein^[2].

1.1 Bindungsdomänen prolinreicher Liganden

Eine wichtige Klasse von Protein-Protein-Interaktionen basiert auf der spezifischen Erkennung prolinreicher Sequenzen (PRS) durch PRS-Interaktionsdomänen (PRDs). Bei dieser Art der Protein-Protein-Wechselwirkungen werden Peptidsequenzen innerhalb der Bindungspartner mit mittlerer Affinität ($K_d \sim 1 - 100 \mu\text{M}$)^[3] und meist mit geringer Spezifität gebunden. In eukaryotischen Proteomen sind prolinreiche Sequenzen häufig vertreten. Die Interaktion zwischen PRDs und prolinreichen Sequenzen ist in höheren Eukaryoten für Prozesse wie der Signalübertragung durch Tyrosinkinase-Rezeptoren^[4], der endosomalen Sortierung^[5], der Umlagerung des Zytoskeletts^[6, 7], der Transkription^[8] und dem Spleißprozess von Bedeutung^[9].

Die meisten PRS-Bindungsdomänen erkennen nur kurze Abschnitte in der Proteinsequenz des Bindungspartners, die die Aminosäure Prolin enthalten^[10]. Es gibt aber auch längere Proteinsequenzen die durch PRS-Bindungsdomänen gebunden werden. Ein Beispiel dafür ist die EVH1-Domäne von N-WASP deren Bindung an das Protein WIP auf mindestens 25 Aminosäuren beruht^[11].

Die als das Kernmotiv bezeichnete Sequenz umfasst 3-6 Aminosäuren und ist oftmals kein spezifisches Motiv für eine einzige Domäne. Häufig erkennen weitere Mitglieder einer Domänenfamilie und auch anderer Domänenfamilien ebenfalls dieses Motiv. Andererseits kann eine einzelne Domäne sequenzvariable Peptide mit unterschiedlicher Bindungsaffinität binden. Flankierende Epitope des Kernmotivs modulieren dabei die Bindungsaffinität. Einzelne oder auch mehrere Aminosäuren, sowie posttranslationale Modifikationen können zusätzliche Interaktionen mit den Aminosäureseitenketten der gegebenen Domänenoberfläche eingehen. Die Bindungsenergien, die durch diese zusätzlichen Interaktionen entstehen, können die Affinität einer PRS-Domäne für ein bestimmtes Motiv modifizieren. Dies führt dazu, dass die Domänen einer bestimmten Familie eine Präferenz für ein bestimmtes Motiv zeigen. Die variierenden Bindungsaffinitäten einer Domäne für verschiedene Peptide erlaubt dieser, mehrere oder auch übergreifende Funktionen auszuüben^[10]. Die Gruppe der PRS-Interaktionsdomänen umfasst SH3 (*Src-homology 3*)-^[12, 13], EVH1 (*Ena/Vasp Homology domain 1*)-^[14], WW (Tryptophan-Tryptophan)-^[15], UEV (*ubiquitin E2 variant*)-^[16, 17] und die GYF-(Glycin-Tyrosin-Phenylalanin)-Domänen^[17, 18] sowie Profilin^[19] (Abbildung 1.2).

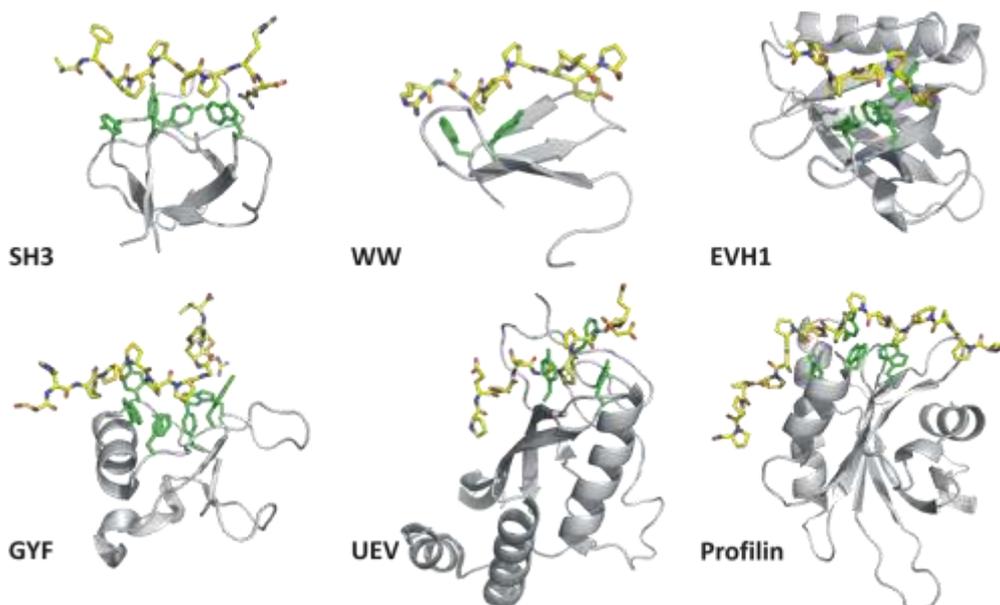


Abbildung 1.2: Strukturen der PRS-Interaktionsdomänen. Abgebildet sind Vertreter der einzelnen PRDs im Komplex mit einem Liganden. In Grün sind die aromatischen Aminosäureseitenketten hervorgehoben, die an der Bindung des prolinreichen Liganden (in Gelb) beteiligt sind. PDB-Einträge: 1PRM (SH3), 1EG4 (WW), 1EVH (EVH1), 1L2Z (GYF), 1M4P (UEV) und 1CJF (Profilin).

Die Bindung des prolinreichen Liganden erfolgt bei PRDs über eine aus aromatischen Aminosäureseitenketten gebildete Bindungstasche, die über Stapel-Wechselwirkung mit den Prolinringen des Liganden interagieren. Die Spezifität der PRS-Erkennung wird dabei von der Ausrichtung der aromatischen Seitenketten und ihren Abständen zueinander bestimmt. Der Ligand einer PRD ist nicht notwendigerweise immer eine prolinreiche Sequenz, wie sich am Beispiel von SH3-Domänen zeigt. Für diese Domänenfamilie wurden auch Interaktionen mit anderen Peptidsequenzen, die nicht dem charakteristischen PxxP-Motiv entsprechen sowie anderen Proteindomänen und auch Lipiden beschrieben^[20-22].

Wie aus den in Tabelle 1.1 aufgeführten Domänen deutlich wird, nimmt die Anzahl an SH3-, WW- und EVH1-Domänen im betrachteten Proteom mit der Komplexität des Organismus zu.

Tabelle 1.1: Häufigkeit von PRDs in verschiedenen Organismen. Die Angaben stammen aus der Uniprot Datenbank (Uniprot Release 2011_09, 17.418.984 Einträge) für die Proteine, die als bestätigt angegeben waren.

Organismus	SH3	WW	EVH1	GYF	UEV	Profilin
<i>Arabidopsis thaliana</i>	8	7	0	6 ^b	6	21
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44 ^a	7	1	3	1	10
<i>Caenorhabditis elegans</i>	19	4	1	4 ^b	0	3
<i>Drosophila melanogaster</i>	36	15	2	3 ^b	2	0
<i>Mus musculus</i>	346	101	13	3	8	21
<i>Homo sapiens</i>	416	118	17	3	9	24

^a Es handelt sich dabei um den Hefestamm ATCC 204508 / S288c. ^b Die Anzahl der Proteine mit einer GYF-Domäne ergibt sich aus einer BLAST-Analyse (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) gegen die Sequenzen der GYF-Domänen von Smy2 und CD2BP2 (Beschreibung der Proteine siehe 1.3).

Prolinreiche Motive besitzen die Eigenschaft, eine Polyprolin-Typ II (PPII)-Helix auszubilden (Abbildung 1.3), bei der es sich um eine linksgängige Helix mit drei Prolin-Resten pro Windung handelt^[23-25]. Die Helix entsteht, da die Prolin-Seitenketten Pyrrolidinringe ausbilden, die die möglichen Torsionswinkel des Peptidrückgrats einschränken.

Eine Besonderheit der Helix besteht in der internen C₃-Rotationssymmetrie entlang der Helixachse, die aus der Anordnung der Prolin-Seitenketten und den Carbonylgruppen des Peptidrückgrats resultiert. Die Seitenketten und die Carbonylgruppen zeigen von der Helixachse weg und sind in regelmäßigen Intervallen der umgebenden Lösung zugewandt (Abbildung 1.3, A). Intramolekulare Wasserstoffbrücken können in der PPII-Struktur nicht ausgebildet werden, da Prolin kein freies Amidwasserstoffatom besitzt, und somit nur die Carbonylgruppen der prolinreichen Motive an intermolekularen Wasserstoffbindungen mit den PRS-Domänen teilnehmen. Daraus ergibt sich ein einzigartiges Erkennungsmotiv. Neben

der C_3 -Rotationsymmetrie entlang der Helixachse gibt noch es eine C_2 -Pseudosymmetrie: Stelle man sich vor, dass die Rotationsachse dabei senkrecht zur Helixachse (N- zu C-Orientierung) steht, so wird eine 180° -Rotation um diese Achse lediglich die Position der ersten und der dritten Prolin-Seitenkette austauschen (Abbildung 1.3, B). Es entstünde eine inverse Orientierung des Liganden vom C- zum N-Terminus, die Ausrichtung der Prolin-Seitenketten und des Peptidrückgrats änderte sich dagegen kaum^[10]. Dadurch ergibt sich die prinzipielle Möglichkeit, Liganden in zwei Orientierungen zu binden. Die Fähigkeit der bidirektionalen Ligandenbindung wurde bereits für SH3-, WW-Domänen und Profilin beschrieben^[26-28]. Insbesondere die Liganden der SH3-Domänen können aufgrund ihres Bindungsmodus in die Klassen I (N- zu C-Orientierung) und II (C- zu N-Orientierung) eingeteilt werden.

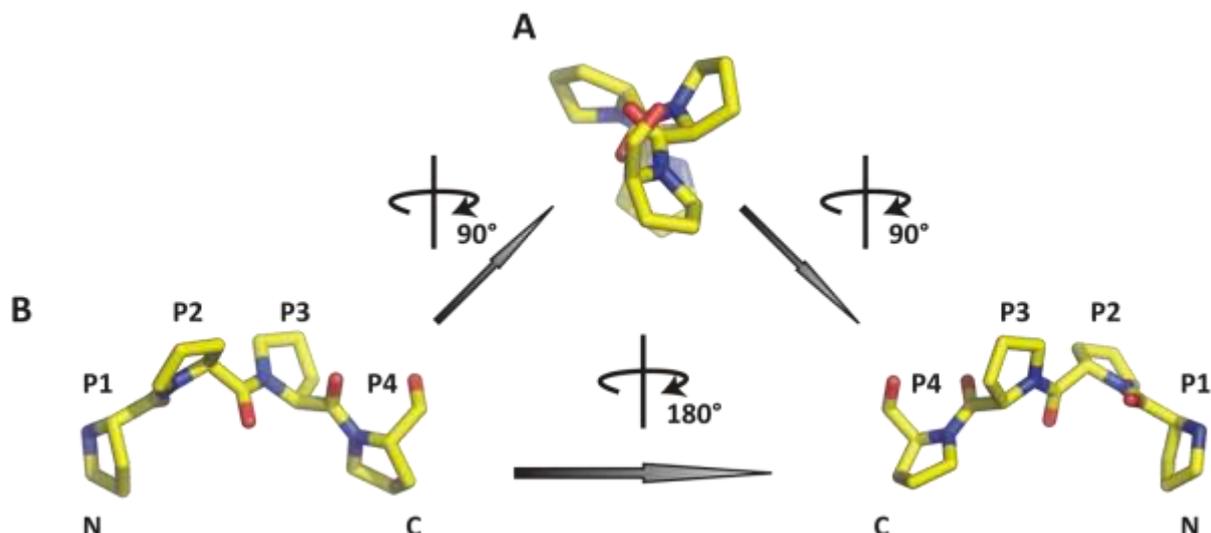


Abbildung 1.3: Symmetrie in der PPII-Helix. Gezeigt sind die vier Proline der Kristallstruktur aus Abbildung 1.5 (PDB: 1L2Z). (A) Aus der Struktur eines PPPP-Motivs wird ersichtlich, dass die PPII-Helix eine C_3 -Rotationsymmetrie entlang der Helixachse besitzt. Jeder vierte Rest weist die gleiche Orientierung auf. (B) Eine Drehung des Liganden um 180° ändert aufgrund der C_2 -Pseudosymmetrie kaum die Ausrichtung der ersten und dritten Prolin-Seitenketten (P1-P3 bzw. P2-P4).

Die meisten Mitglieder der Gruppe der PRDs erkennen mindestens zwei Proline im Bindungsmotiv^[29]. Obwohl Prolin zu den häufig vertretenen Aminosäuren innerhalb der PPII-Helix gehört, bilden auch Sequenzbereiche von Proteinen eine PPII-Helix aus, in der kein Prolin enthalten ist. Die meisten Aminosäuren stören die Ausbildung der PPII-Helix nicht, jedoch sind die Aminosäure Glycin sowie aromatische Aminosäuren weniger häufig in dieser Struktur zu finden^[30]. Auch für Peptide die durch MHC-Komplexe der Klasse II präsentiert werden und keine Proline enthalten, wurde die Polyprolin-Typ II Helix beschrieben^[31].

1.2 Die GYF-Domäne

GYF-Domänen bezeichnen eine Familie der Protein-Interaktionsdomänen, die prolinreiche Sequenzen (PRS) erkennen. Benannt wurden sie nach dem konservierten Motiv aus Glycin, Tyrosin und Phenylalanin (GYF) innerhalb der Domäne, das zur Bindung des Liganden beiträgt. Die erste GYF-Domäne wurde im humanen Protein CD2BP2 (CD2-bindendes Protein 2) identifiziert (s. 1.3.3)^[32]. Anschließende Datenbanksuchen führten zur Identifizierung weiterer Proteine mit einer GYF-Domäne, beispielsweise der humanen Proteine GIGYF1 und GIGYF2.

Proteine, die eine GYF-Domäne enthalten, sind in den meisten Eukaryoten vertreten. Der Vergleich mit Proteinen, die SH3- und WW-Domänen aufweisen, zeigt, dass nur wenige Proteine eine GYF-Domäne besitzen (Tabelle 1.1). Unter Verwendung des PSI-BLAST Algorithmus wurden erstmals auch prokaryotische Proteine mit GYF-Domänen identifiziert^[33]. Aus dem Sequenzvergleich verschiedener GYF-Domänen wurden zwei Unterfamilien (Abbildung 1.4), die der CD2BP2- und Smy2-ähnlichen GYF-Domänen, definiert. Benannt wurden diese Unterfamilien nach den Proteinen in denen sie zuerst identifiziert wurden (s. 1.3). Während die Strukturen und Bindungseigenschaften verschiedener GYF-Domänen bereits charakterisiert wurden^[34-37], ist die biologische Rolle von Proteinen mit GYF-Domänen weitgehend unbekannt.

GYF-Domänen sind weiterhin der Klasse der RAGNYA-Super-Familie zugeordnet. Diese Domänenfamilie ist benannt nach Proteinen, die verschiedene strukturelle Varianten dieser Domäne besitzen (Ribosomales Protein L1 und L3, ATP *grasp* modules, GYF-Domänen, NinB, Y-Familie der DNA-Polymerasen und AMMECR1). RAGNYA-Domänen zeichnen sich durch eine kleine zweilagige α - β -Faltung aus, die aus zwei β -Strängen und einer α -Helix bestehen^[33]. Für die meisten Mitglieder dieser Gruppe wurde eine Interaktion mit Nukleotiden und Nukleinsäuren beschrieben, während die GYF-Domäne als reine Peptidbindungsdomäne bekannt ist.

1.2.1 Struktur und Ligandenbindung

GYF-Domänen weisen die konservierte Aminosäuresequenz GPF-X₄-[M/V/I]-X₂-W-X₃-GYF auf, die eine *bulge*-Helix-*bulge*-Struktur ausbildet und maßgeblich an der Bindung des prolinreichen Liganden beteiligt ist. Struktur- und Sequenzunterschiede die C-terminal auf die Konsensussequenz folgen (Abbildung 1.4) sowie Ligandenpräferenzen charakterisieren die beiden Unterfamilien der GYF-Domänen. Gegenüber der CD2BP2-Familie weist die GYF-

Domäne im Smy2-Protein eine zusätzliche Helix auf, die zur Stabilisierung dieser Domäne notwendig ist^[38].

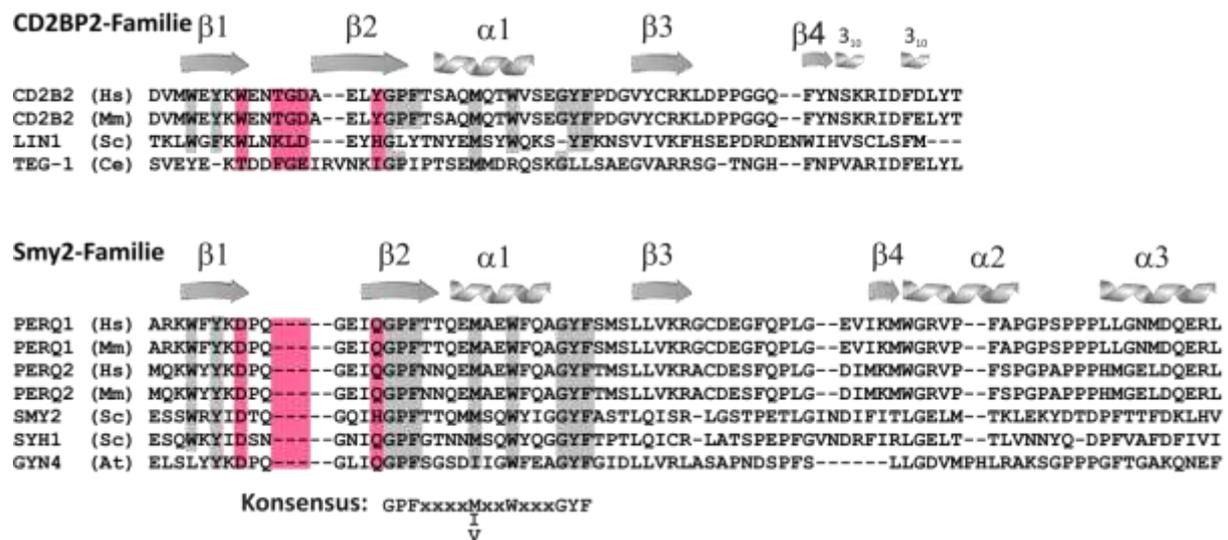


Abbildung 1.4: Sequenzvergleich der Unterfamilien von GYF-Domänen. Gezeigt sind die Proteinsequenzen repräsentativer Mitglieder der Smy2- und CD2BP2-ähnlichen GYF-Domänen. Konservierte Reste sind grau unterlegt, rot unterlegte Aminosäuren weisen auf die Reste hin, die beide Familien unterscheiden und für unterschiedliche Bindungsspezifitäten verantwortlich sind. Die Sekundärstrukturelemente für die CD2BP2-Familie sind abgeleitet von der Struktur PDB: 1L2Z und die der Smy2-Familie von der Struktur PDB: 3FMA. (Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Hs: *Homo sapiens*, Mm: *Mus musculus*, Ce: *Caenorhabditis elegans*, At: *Arabidopsis thaliana*).

Ein charakteristischer Unterschied zwischen den beiden Unterfamilien besteht im Aminosäurerest an der Position 8: CD2BP2-ähnliche GYF-Domänen besitzen an dieser Position einen Tryptophan-Rest, wohingegen in Smy2-GYF-Domänen an dieser Stelle ein Aspartat-Rest zu finden ist (Abbildung 1.4). Außerdem ist die Schleife zwischen dem β1- und β2-Strang bei Smy2-GYF-Domänen kürzer als bei der CD2BP2-GYF-Domäne^[18, 39].

Aus der in Abbildung 1.5 gezeigten NMR-Struktur des Komplexes der CD2BP2-GYF-Domäne mit dem CD2-Peptid (PDB: 1L2Z) wird deutlich, dass die vier Prolin-Reste des Liganden eine Polyprolin-Helix vom Typ II einnehmen. Die α-Helix der Domäne ist dem β-Faltblatt abgewandt, wodurch die konservierten aromatischen Reste an der Proteinoberfläche die hydrophobe Bindungsfurche für den Liganden ausbilden können. Eine Besonderheit dabei ist die β-turn-Konformation des Peptidliganden, die bei den Liganden anderer PRDs nicht zu beobachten ist.

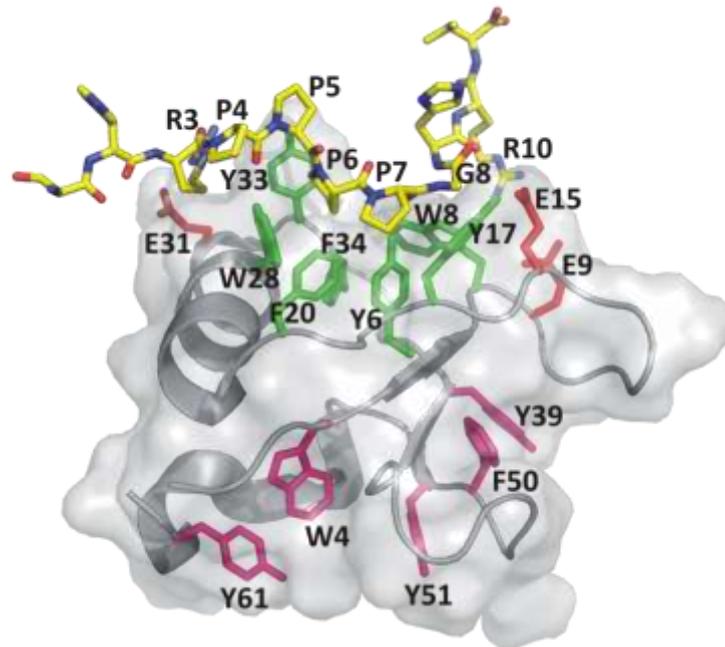


Abbildung 1.5: Die Struktur der GYF-Domäne von CD2BP2 im Komplex mit dem CD2-Peptid SHRPPPPGHRV (PDB: 1L2Z). Die Seitenketten der Aminosäuren (Y6, Y33, F34, Y17, W8, F20 und W28), die die hydrophobe Bindungstasche ausbilden und direkt an der Bindung des prolinreichen Liganden beteiligt sind, sind in Grün hervorgehoben. Die Reste 6-8 (P6, P7, G8) des Peptidliganden sind im direkten Kontakt mit den Aminosäureseitenketten der hydrophoben Bindungstasche. In Pink sind die Aminosäureseitenketten (Y61, W4, Y51 und Y39) hervorgehoben, die an der Bindung von U5-15K beteiligt sind (s. 1.3.4).

1.2.2 Bindungsspezifität der GYF-Domänen

Die Bindungsmotive verschiedener GYF-Domänen wurden mittels Phagen-Display und Peptidsubstitutionsanalyse (SPOT Analyse) charakterisiert^[36, 37]. Generell binden GYF-Domänen das prolinreiche Motiv PPG Φ (Φ : hydrophobe Aminosäure), wobei für die Unterfamilien der GYF-Domänen leicht unterschiedliche Spezifitäten für ihre prolinreichen Zielsequenzen ermittelt wurden.

Die Liganden für CD2BP2-ähnliche GYF-Domänen sind in zwei Klassen eingeteilt. Neben dem PPG Φ -Motiv können auch Liganden der sogenannten CD2-Klasse mit dem Motiv PPGX+ (+: R/K) gebunden werden. Für derartige prolinreiche Sequenzen (PRS) muss mindestens ein positiv geladener Rest das Motiv flankieren. Zudem binden diese Domänen bevorzugt Liganden mit dem Motiv PPGW^[36, 37]. Diese Ligandeneigenschaften sind dabei spezifisch für die GYF-Domänen des CD2BP2-Typ. Smy2-ähnliche Domänen zeigen eine Präferenz für einen auf das PPG-Motiv folgenden aliphatischen oder aromatischen Rest, nicht jedoch für das Motiv PPGW^[39].

Die unterschiedliche Motivpräferenz wird anhand der Kristall- und NMR-Strukturen der GYF-Domänen von CD2BP2 und Smy2 im Komplex mit einem prolinreichen Peptidliganden

deutlicher (Abbildung 1.6). Der Aminosäureunterschied an Position 8 ist entscheidend für die Ligandenpräferenz der beiden Unterfamilien.

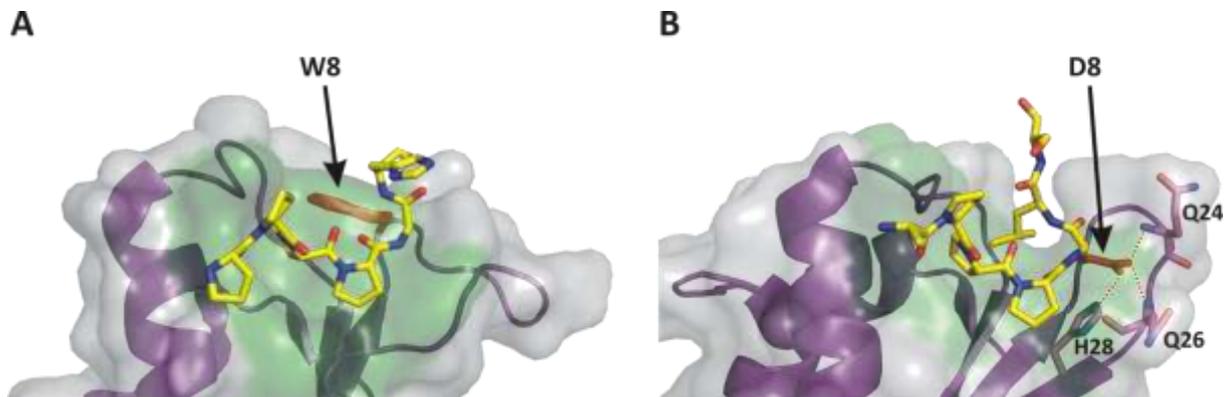


Abbildung 1.6: Peptidbindung der GYF-Domänen von CD2BP2 und Smy2. (A) NMR-Struktur der GYF-Domäne von CD2BP2 im Komplex mit dem Peptid PPPPGHR (PDB: 1L2Z), (B) Kristallstruktur von Smy2-GYF im Komplex mit dem Peptid SSIAPPPGLSG (PDB: 3FMA). Grün unterlegt ist die hydrophobe Bindungstasche, in Rot sind die Aminosäuren an der Position 8 hervorgehoben, die maßgeblich an der Bindungsspezifität der Domänen beteiligt sind.

In der CD2BP2-GYF-Domäne ist die Seitenkette des Tryptophan-Restes zur Bindungstasche orientiert, wodurch die Bindungsfurche im Vergleich zu der von Smy2-GYF verkürzt ist. Die Bindung des PPGW-Motivs durch die GYF-Domäne von CD2BP2 erfolgt dabei durch eine Stapel-Wechselwirkung zwischen dem Tryptophan-Rest der Domäne und dem des Liganden^[36]. In der GYF-Domäne von Smy2 ist die Seitenkette des Aspartats im Gegensatz zur CD2BP2-GYF-Domäne nicht zur Bindungstasche orientiert. Seine Ausrichtung wird durch Wasserstoffbrücken zwischen dem Aspartat und den Glutaminen an Position 24 und 26 (Q24, Q26) und dem Histidin an Position 28 (H28) stabilisiert^[38] (Abbildung 1.6, B). Es bildet sich im Vergleich zu CD2BP2-GYF eine verlängerte hydrophobe Bindungsfurche in der Smy2-GYF-Domäne aus, in der ein hydrophober Rest aufgenommen werden kann. Ein Tryptophan-Rest scheint allerdings zu groß zu sein, um effektiv in der erweiterten Tasche der Domäne gebunden zu werden. Innerhalb einer Unterfamilie gibt es zudem weitere Ligandenpräferenzen. So zeigt sich für die Smy2-GYF-Domäne eine Tendenz zu längeren Prolin-Wiederholungen in Liganden. Diese Tendenz zeigt sich dagegen nicht für die GYF-Domäne von Syh1, die zur gleichen Unterfamilie gehört^[40].

Trotz einer gewissen Präferenz für ein bestimmtes Bindungsmotiv existieren auch prolinreiche Sequenzen, die neben der GYF-Domäne von anderen PRDs gebunden werden. SH3-Domänen besitzen ähnliche Bindungseigenschaften wie die GYF-Domäne. Beispielsweise konnte in NMR-Titrationsversuchen gezeigt werden, dass das PPGHR-Motiv,

neben der GYF-Domäne von CD2BP2 auch von der SH3-Domäne der Fyn-Kinase gebunden wird^[34].

1.3 Proteine mit GYF-Domänen

Die in dieser Arbeit näher untersuchten GYF-Proteine sind die humanen Proteine CD2BP2 und GIGYF2, sowie das aus der Bäckerhefe stammende Protein Smy2. GIGYF2 und Smy2 enthalten Vertreter der Unterfamilie der Smy2-ähnlichen GYF-Domänen. Im Vergleich zum nukleären CD2BP2 wurde für Smy2 und GIGYF2 eine zytoplasmatische Lokalisation beobachtet^[38, 41, 42]. In Eukaryoten können den Proteinen somit unterschiedliche funktionale Rollen zugeordnet werden^[43-45].

1.3.1 GIGYF2

GIGYF2 (GRB10-interagierendes GYF Protein 2) mit einem Molekulargewicht von 150 kDa ist neben GIGYF1 das einzige humane Protein mit einer Smy2-ähnlichen GYF-Domäne. GIGYF1 und GIGYF2 besitzen eine Aminosäure-Sequenzidentität von 52%. Insbesondere die GYF-Domänen der beiden Proteine sind auf Aminosäure-Ebene stark konserviert und weisen eine Sequenzidentität von 81% auf. GIGYF2 besitzt eine Proteinlänge von 1299 Aminosäuren mit einer auffälligen Häufung der Aminosäuren Prolin, Glutamat, Arginin und Glutamin. Insgesamt machen diese Reste etwa 40% der Proteinsequenz aus, daher lautete der ursprüngliche Proteinname PERQ2 (Prolin, Glutamat, Arginin, Glutamin reiches Protein mit GYF-Domäne). Ein weiteres Charakteristikum sind Segmente aufeinanderfolgender Glutaminreste (*polyglutaminstretches*) innerhalb des C-Terminus (Abbildung 1.7).

Der Name GIGYF2 folgte aus der Beobachtung, dass das homologe Protein GIGYF2 in der Maus mit der N-terminalen Region des zytoplasmatischen Proteins Grb10 (*Growth factor receptor-bound protein 10*) interagiert. Grb10 fungiert als Adapterprotein, das an aktivierte Tyrosinkinase-Rezeptoren wie den IGF-1-Rezeptor (*Insulin-like growth factor 1*) und den Insulinrezeptor bindet^[45]. Die für die Interaktion als verantwortlich beschriebene prolinreiche Sequenz ist nicht im humanen homologen Protein zu finden^[39]. Für die humanen Proteine GIGYF2 und GIGYF1 wurde eine Interaktion mit dem Protein RQCD1 (*Required for Cell Differentiation 1 homolog*) gezeigt. Diese drei Proteine sind in Brustkrebszellen hochreguliert, was mit einer Aktivierung des Akt-Signalweges einhergeht^[46]. Die Interaktion zwischen den Proteinen GIGYF1 und GIGYF2 mit RQCD1 wird dabei nicht durch die GYF-Domänen vermittelt. Der für die Interaktion verantwortliche Proteinabschnitt liegt im C-terminalen Sequenzbereich der Proteine GIGYF1 und GIGYF2^[47].

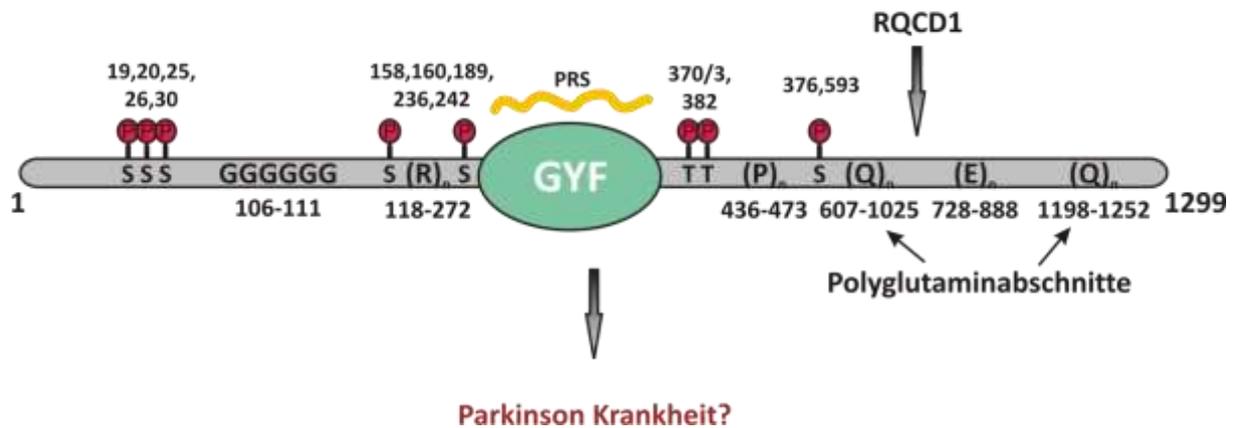


Abbildung 1.7: Proteinorganisation von GIGYF2 (Hs). Das Protein weist neben der GYG Domäne keine vorhergesagten Sekundär- oder Tertiärstrukturen auf. Verstärkt gibt es Abschnitte, in denen häufig die Aminosäuren Arginin (R), Prolin (P), Glutamin (E) und Glutamat (Q) auftreten. Solche sich wiederholenden Abschnitte sind mit $()_n$ bezeichnet. Die Phosphorylierungen (P) der Aminosäure-Reste Threonin (T) und Serin (S) entstammen aus Annotationen der Uniprot-Datenbank. Für GIGYF2 wurde eine Interaktion mit dem Protein RQCD1 beschrieben. GIGYF2 wurde auch in Verbindung mit der Parkinson Krankheit gebracht (siehe Haupttext).

Im Jahr 2008 wurde das humane GIGYF2 erstmals in Verbindung mit der Parkinson-Krankheit gebracht. Die Sequenzierung des Gens in verschiedenen Patienten wies auf sieben verschiedene Mutationen hin, die sich auf die Aminosäuresequenz auswirken^[48]. Folgestudien konnten dies nicht belegen und legten die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen Mutationen um natürliche Polymorphismen handelt, ohne eine Assoziation zu Parkinson^[49, 50]. Die Beteiligung von GIGYF2 am erblichen Parkinson ist daher nicht bestätigt.

Untersuchungen des murinen GIGYF2 erfolgten in einem *Knockout*-Mausmodell. Homozygote *GIGYF2-knockout*-Mäuse zeigten eine normale embryonale Entwicklung. Postnatal waren sie jedoch nicht in der Lage Nahrung aufzunehmen, was mit dem Tod der Tiere innerhalb von zwei Tagen einherging. Heterozygote Mäuse entwickelten sich innerhalb der ersten Lebensmonate normal. Im Alter von 12-15 Monaten zeigten sie einen neurodegenerativen Phänotyp in Form einer leichten motorischen Dysfunktion^[51].

In *Yeast-2-Hybrid*-(Y2H)-Experimenten wurden die spleißosomalen Proteine SmB/B' und snRNP-N sowie dem Spleißprozess-assoziierte Proteine als potentielle GIGYF2-Interaktionspartner identifiziert^[37]. Aufgrund der zytoplasmatischen Lokalisation von GIGYF2 ist fraglich, inwiefern die postulierten auch den tatsächlichen Interaktionspartnern entsprechen.

1.3.2 Smy2

Das Protein Smy2 (*suppressor of myosin 2*) ist neben Syh1 (*SMY2 homolog 2*) eines der beiden in *S. cerevisiae* vorkommenden Proteine, die eine Smy2-ähnliche GYF-Domäne enthalten (Abbildung 1.8, A). Neben der GYF-Domäne besitzt das 740 Aminosäureumfassende Protein eine *coiled-coil* Domäne, sowie eine C-terminale Domäne mit α -helikaler Sekundärstruktur unbekannter Funktion (persönliche Kommunikation, C. Freund). Diese strukturellen Elemente werden auch im homologen Protein Syh1 gefunden. Auf die zelluläre Funktion von Smy2 gibt es nur wenige Hinweise. Bisherige Beschreibungen von Smy2 weisen auf Funktionen beim vesikulären Transport, der Translationsregulation, sowie der mRNA-Prozessierung hin (Abbildung 1.8, B).

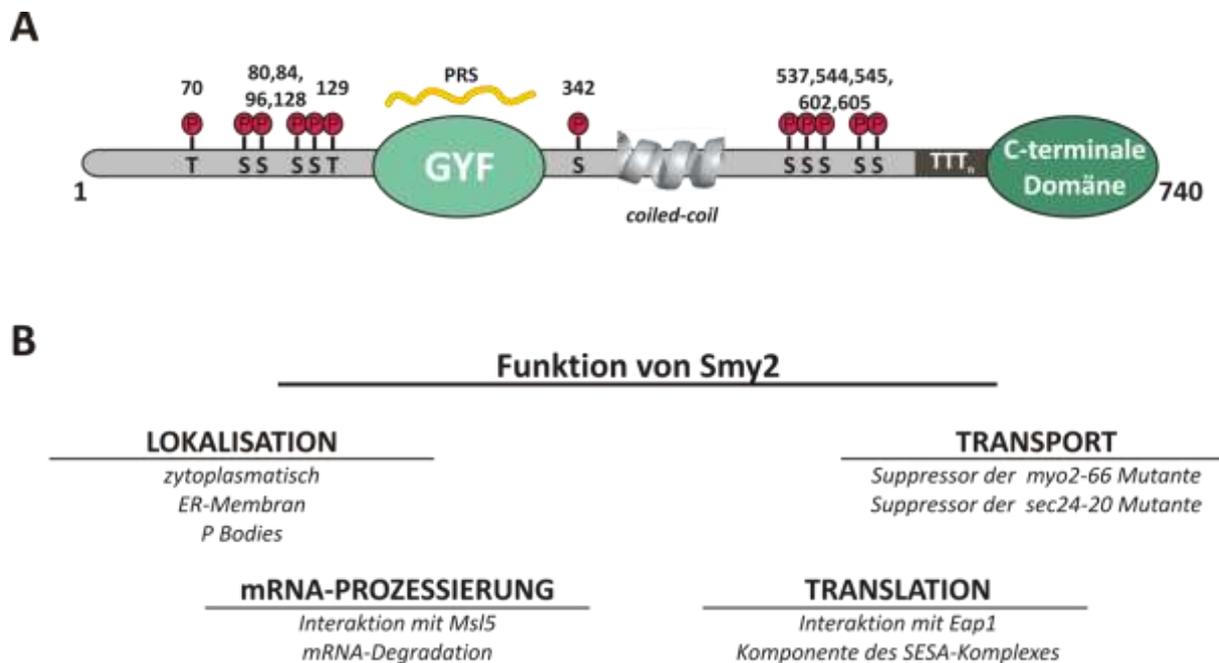


Abbildung 1.8: Proteinorganisation und -funktion von Smy2. (A) Das Protein Smy2 (Sc) besitzt neben der GYF-Domäne eine C-terminale Domäne unbekannter Funktion. Weiterhin gibt es phosphorylierte Serin- und Threonin-Reste (P-S, P-T), sowie eine *coiled-coil* Struktur (die Angaben wurden der Uniprot-Datenbank entnommen). (B) Beschriebene Funktionen von Smy2. Abkürzungen sind dem Haupttext zu entnehmen.

Smy2 (*suppressor of myosin*) wurde ursprünglich als Suppressor des temperaturempfindlichen Phänotyps der Mutante *myo2-66* in *S. cerevisiae* entdeckt^[52]. Diese Mutante trägt eine Mutation im Motorprotein Myo2, einem Typ V Myosin, welches am Aktin-basierten Transport von Vesikeln und Organellen entlang des Zytoskeletts während der Zellteilung beteiligt ist^[53]. Diese genetische Interaktion zwischen Myo2 und Smy2 lieferte einen ersten

Hinweis auf eine Funktion von Smy2 an vesikulären Transportprozessen. Auch die Identifizierung von Smy2 als Suppressor des temperatursensitiven Phänotyps der *sec24-20* Mutante stützt die Vermutung einer Transport-assoziierten Funktion von Smy2^[54]. Sec24 gehört zu einem Proteinkomplex, der an der Bildung von COPII-Vesikeln beteiligt ist, die für den anterograden Proteintransport vom ER zum Golgi-Apparat verantwortlich sind^[55]. Weiterhin wird vermutet, dass Smy2 an der ER-Membran lokalisiert ist^[54].

Neben einer möglichen Beteiligung am sekretorischen Transportweg gibt es Hinweise auf eine Funktion von Smy2 bei der mRNA-Prozessierung. In einem *Yeast-2-Hybrid*-(Y2H)-Experiment wurde das Hefe-*Branchpointbinding* Protein Msl5 als potentieller Bindungspartner der GYF-Domäne von Smy2 identifiziert^[37, 56, 57]. Msl5 ist an der Assemblierung des Spleißosoms beteiligt und ein essentieller Bestandteil des *Splicing-Commitment*-Komplexes 2 in der Hefe^[58].

Funktionelle Hinweise auf eine Beteiligung von Smy2 an spleißosomalen Prozessen gibt es nicht. Auch die im Gegensatz zur nukleären Lokalisation von Msl5 zytoplasmatische Lokalisation von Smy2 lässt vermuten, dass es sich bei den Y2H-Ergebnissen um eine artifiziell begünstigte Interaktion handelt, die nicht die tatsächliche zelluläre Situation widerspiegelt^[40, 42, 54]. Eine Beteiligung von Smy2 an mRNA-assoziierten Prozessen im Zytoplasma ist hingegen wahrscheinlich. Die beschriebenen Interaktionen lassen eine Funktion bei der posttranskriptionellen Genregulation (mRNA-Abbau und Translationsinitiation) vermuten.

In silico Vorhersagen möglicher Interaktionspartner der GYF-Domäne von Smy2, die auf dem PPG Φ -Erkennungsmotiv basierten, lieferten Hinweise auf eine Funktion von Smy2 bei der zytoplasmatischen mRNA-Degradation. Dabei wurden als potentielle Bindungspartner Proteine des CCR4-Not-Komplexes vorhergesagt^[40]. Der CCR4-Not-Deadenylasekomplex ist für den Abbau des Poly(A)-Schwanzes von mRNA in zytoplasmatischen *Processing (P) Bodies* verantwortlich. Bei ihnen handelt es sich um Aggregate aus Proteinen und translationsinhibierten mRNAs, deren Aufgabe in der Zwischenlagerung, dem *Decapping* und der Degradation von mRNA besteht^[59]. Es wurde gezeigt, dass Smy2, ebenso wie die isolierte GYF-Domäne, in *P Bodies* lokalisiert ist^[40]. Ebenso wurde dem Protein Myo2 eine Verbindung zu *P Bodies* zugeschrieben^[60].

Die Interaktion der Smy2-GYF-Domäne mit Eap1, einem Inhibitor der Translationsinitiation, weist zudem auf eine Funktion von Smy2 bei der Regulation der Translation hin^[37, 61]. Für Eap1 wurde eine Beteiligung bei der Translationskontrolle in Zellen gezeigt, die Mutationen in Proteinen aufweisen, welche am sekretorischen Weg beteiligt sind^[62]. Smy2 und Eap1

wurden auch als Bestandteil des SESA-Proteinkomplexes identifiziert, der die ER-lokalisierte Translationsinitiation des Kernmembranproteins POM34 reguliert^[63]. Die Interaktion zwischen der GYF-Domäne von Smy2 und dem PRS-Motiv in Eap1 ist dabei essentiell für die Translationsinhibition der POM34-mRNA.

1.3.3 CD2BP2

Das humane CD2-bindende Protein 2 (CD2BP2) wurde ursprünglich als Bindungspartner des zytoplasmatischen C-Terminus des CD2-Rezeptorproteins identifiziert. Die Bindung erfolgt über die GYF-Domäne von CD2BP2 an zwei Membran-nahe PPPPGHR Motive. Da diese Sequenzmotive für die CD2-abhängige Produktion von Interleukin-2 (IL-2) notwendig sind und eine Überexpression der GYF-Domäne zu einer verstärkten IL-2-Produktion in Jurkat-Zellen führte, wurde für CD2BP2 eine Funktion im T-Zellsignalweg vermutet^[32, 64, 65]. Untersuchungen der Produktion von IL-2 und anderen Zytokinen in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) nach partiellem, siRNA-vermitteltem *knockdown* von CD2BP2 konnten eine Funktion von CD2BP2 bei der IL-2-Produktion nicht bestätigen^[66]. Auch die in HeLa-Zellen beobachtete Kernlokalisation (im Gegensatz zur Membranlokalisation von CD2 in T- und NK-Zellen) eröffnet die Frage, ob eine Interaktion der beiden Proteine nur unter bestimmten, bisher unbekanntem, Bedingungen möglich ist.

1.3.4 Hinweise auf eine spleißosomale Funktion von CD2BP2

Die Kernlokalisation von CD2BP2 ist besser mit dem bereits beschriebenen spleißosomalen Kontext vereinbar, da sich Hinweise auf eine Beteiligung von CD2BP2 an spleißosomalen Prozessen häufen (Abbildung 1.9, A). CD2BP2 wurde als ein Protein des spleißosomalen U5 snRNP (*small nuclear ribonucleoprotein particles*) identifiziert und aufgrund seines apparenten Molekulargewichtes im SDS-Gel als U5-52K bezeichnet^[67, 68]. Über die Existenz von CD2BP2 in anderen spleißosomalen snRNPs gibt es verschiedene Angaben. Es wurde einst als phosphoryliertes Protein im U4/U6.U5 tri-snRNP beschrieben^[68]. In einer späteren Untersuchung konnte CD2BP2 nicht im U4/U6.U5 tri-snRNP oder dem aktiven Spleiß-Komplex identifiziert werden, vielmehr wurde die Dissoziation des Proteins aus dem U5 snRNP bei Bildung des tri-snRNP beobachtet. Somit wurde CD2BP2 eine vermeintliche Funktion bei der Assemblierung des tri-snRNP und spleißosomal-assoziierten Prozessen zugesprochen anstelle einer Beteiligung am aktiven Spleißprozess von prä-mRNA^[43]. Mildere Aufreinigungsbedingungen führten wiederum zur Identifizierung von CD2BP2 sowohl im prä-Spleißosom (Komplex A) als auch im spleißosomalen Komplex B^[69, 70]. Auch direkte

Protein-Protein-Interaktionen von CD2BP2 mit spleißosomalen Proteinen, wie dem in allen snRNPs enthaltenden Protein SmB/B', wurden nachgewiesen^[41, 66]. Als Bindungspartner von CD2BP2 wurden weiterhin die Proteine U5-15K und U5-102K (Prp6) identifiziert^[43]. U5-15K ist ein evolutionär hoch konserviertes Protein, das im U5 snRNP und im U4/U6.U5 tri-snRNP enthalten ist^[71]. Die Interaktion zwischen U5-15K und CD2BP2 erfolgt über die GYF-Domäne, nicht aber über eine PRS-vermittelte Bindung. Die GYF-Domäne von CD2BP2 besitzt somit zwei definierte Bindungsstellen für Interaktionen mit anderen Proteinen (Abbildung 1.9, B)^[43].

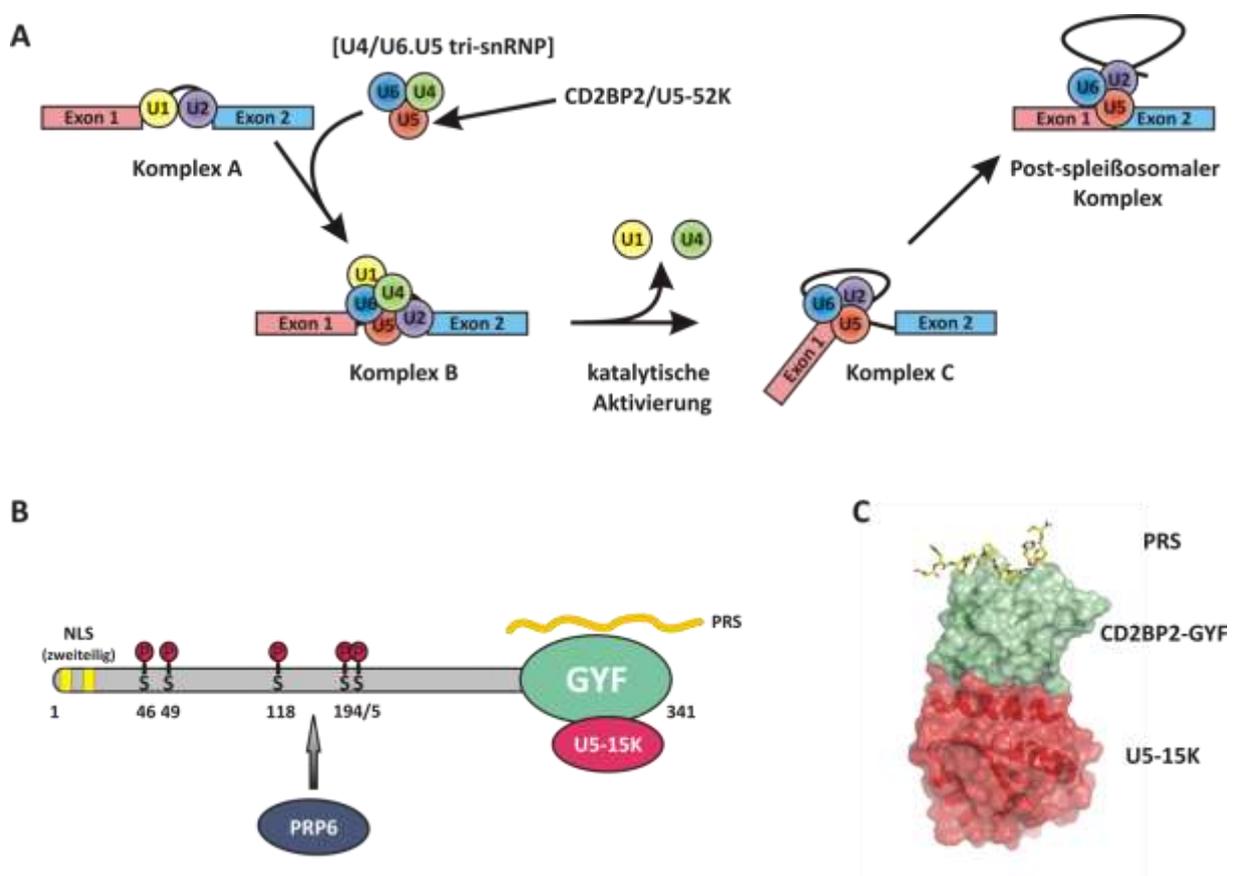


Abbildung 1.9: Proteinorganisation, Interaktionen und mögliche Funktionen von CD2BP2. (A) Gezeigt ist der schematische Ablauf der Spleißreaktion unreifer prä-mRNA. Das Spleißosom, bestehend aus den U snRNPs 1,2,4,5 und 6 katalysiert dabei die Excision der nicht-kodierenden Sequenzen (Introns). Der makromolekulare Spleiß-Komplex erfährt dabei mehrere Umordnungsschritte. CD2BP2 wurde lediglich als Komponente des U5-snRNP identifiziert (Abbildung modifiziert nach^[83]). (B) CD2BP2 besitzt eine geteilte Kernlokalisationssequenz (NLS) und weist phosphorylierte Serin-Reste auf. Die C-terminal lokalisierte GYF-Domäne kann neben prolinreichen Sequenzen auch das spleißosomale Protein U5-15K in einer PRS-unabhängigen Weise binden. Für den N-terminalen Bereich von CD2BP2 wurde eine Interaktion mit dem spleißosomalen Protein PRP6 beschrieben. (C) Bifunktionalität der CD2BP2-GYF-Domäne. Neben der Erkennung prolinreicher Sequenzen interagiert die Domäne an einer differentiellen Bindungsstelle mit dem Protein U5-15K (PDB: 1L2Z und 1SYX).

1.3.5 Beschriebene Interaktionen anderer GYF-Proteine

Aufgrund der wenigen verfügbaren Informationen ist es schwierig, die Funktion der GYF-Proteine klar zu definieren. In der Tabelle 1.2 sind die beschriebenen Interaktionen der Proteine aufgelistet, die eine GYF-Domäne enthalten.

Tabelle 1.2: Beschriebene Interaktionen weiterer Proteine mit GYF-Domänen.

Protein	Homolog von	Beschreibung	Referenz
Lin1 (Sc)	CD2BP2	Y2H-Interaktion mit Proteinen, die an der Chromosomenkohäsion und -kondensation, der DNA-Replikation und des Spleißens vom mRNA beteiligt sind	[72]
		Bestandteil des U5-snRNP	[73]
		Y2H-Interaktion mit den Proteinen Prp8 und SmB/B'	[41, 66, 72]
		zytoplasmatische Lokalisation	[40, 42, 74]
Syh1 (Sc)	Smy2	in <i>P Bodies</i> lokalisiert	[40]
		Hinweis auf eine Beteiligung am sekretorischen Transportweg	[74]
		Interaktion mit Translationsinitiationsfaktoren und polysomalen Komplexen	[75-77]
		kein funktionales Homolog von Smy2	[54]
GYN4 (At) (Q9FMM3)	Smy2	Y2H-Interaktion mit den Spleißproteinen Mud2 und Msl5	[56]
		Y2H-Interaktion mit dem Homolog des humanen CNOT4-Proteins	[37]
TEG-1 (Ce)	CD2BP2	Interaktion mit UAF-1 (U2AF65 Hs) Spleißfaktor, reguliert die Entscheidung zwischen Proliferation und Meiose in <i>C. elegans</i>	[78]

(**Sc:** *Saccharomyces cerevisiae*; **Hs:** *Homo sapiens*, **Ce:** *Caenorhabditis elegans*, **At:** *Arabidopsis thaliana*)

Auch andere Proteine mit GYF-Domäne zeigen eine potentielle Funktion im mRNA-Metabolismus, wie etwa dem Spleißen von mRNA, der Translationskontrolle, dem mRNA-Abbau sowie eine Beteiligung an Transportprozessen. Inwiefern GYF-Proteine die in enger funktionaler Verbindung stehenden Prozesse der Translationsinitiation und des mRNA-Abbaus möglicherweise miteinander verbinden ist unbekannt.

1.4 Regulation der Genexpression: von der Transkription bis zur Degradation von mRNA

Da für die GYF-Domänen sowohl nukleäre als auch zytoplasmatische Interaktionspartner beschrieben wurden, die an mRNA-Prozessierungsschritten und am mRNA-Abbau beteiligt sind, soll an dieser Stelle ein kurzer Überblick über den mRNA-Lebenszyklus gegeben werden.

Die Genexpression, ein an mehreren Stufen streng regulierter Prozess, erfolgt sowohl auf der Transkriptions-, der Translations- als auch auf der posttranslationalen Ebene. Die Regulation der Genexpression auf der mRNA-Ebene erfolgt über viele mRNA-bindende und -modifizierende Proteine, die während der einzelnen Schritte zur mRNA rekrutiert werden. Die verschiedenen Prozesse stehen dabei in Verbindung und sind eng miteinander gekoppelt^[79]. Bevor die mRNA aus dem Zellkern exportiert wird, durchläuft sie bei ihrer Reifung mehrere Schritte, die von der Transkription über die drei wesentlichen Prozessierungsstufen (*Capping*, Spleißen, 3'-Prozessierung) bis zum Export aus dem Zellkern führen (Abbildung 1.10).

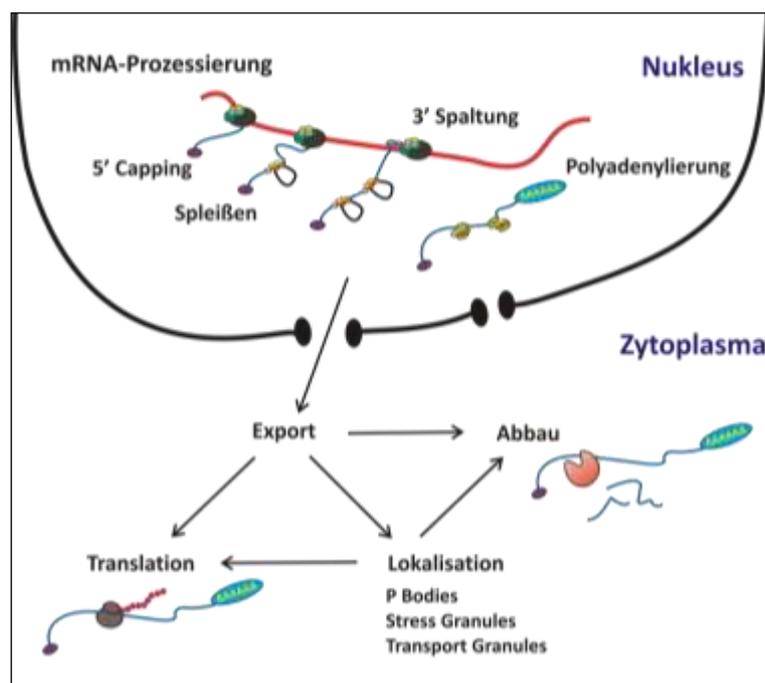


Abbildung 1.10: mRNA-Metabolismus in Eukaryoten. Im Nukleus erfolgt die Transkription der unreifen prä-mRNA, die über kotranskriptionale Prozessierungsschritte zur reifen mRNA gemacht wird. In Form von mRNPs wird die mRNA ins Zytoplasma transportiert. Nach dem Export wird die mRNA entweder translatiert, für eine spätere Translation gespeichert oder abgebaut. (Abbildung modifiziert nach McKee und Silver, 2007^[80])

Bei der Transkription wird erst eine unreife prä-mRNA durch die RNA-Polymerase II synthetisiert. Bereits nach der Synthese der ersten 20-30 Nukleotide des wachsenden mRNA-Strangs erfolgt das Anfügen der m⁷G-Kappe am 5'-Ende (*Capping*), die für die Stabilisierung der mRNA und ihre Translation notwendig ist^[81]. Die Kodierungssequenz der meisten mRNAs enthält nicht-kodierende Bereiche (Introns), die entfernt werden müssen, um eine funktionale mRNA zu generieren. Dieser als Spleißen bezeichnete Prozess erfolgt kotranskriptional und wird für die überwiegende Mehrheit von Introns vom Hauptspleißosom durchgeführt, einem makromolekularen katalytischen Komplex, der aus den fünf snRNPs

(*small nuclear ribonucleoprotein particles*) U1, U2, U4, U5 und U6 und einer Vielzahl assoziierter Proteine besteht^[82, 83]. Die finalen Prozessierungsschritte sind die endonukleolytische Spaltung der prä-mRNA und das Anfügen des Poly(A)-Schwanzes. Ebenso wie die Spleißreaktion wird der Polyadenylierungsschritt von einem aus mehreren Proteinen bestehenden Komplex ausgeführt, der unter anderem das Heterooligomer CPSF (*cleavage and specificity polyadenylation factor*) enthält. Nachdem der Poly(A)-Schwanz eine Länge von etwa 250 Nukleotiden erreicht hat, wird diese Reaktion beendet. Bis auf einige Histon-mRNAs besitzen alle eukaryotischen mRNAs einen Poly(A)-Schwanz^[84], der für den Export der mRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma, aber auch für die Stabilisierung der mRNA und die Initiation der Translation von großer Bedeutung ist. Für den Export der prozessierten mRNA aus dem Kern, wird diese mit Proteinen ebenfalls kotranskriptional in mRNPs (*messenger ribonucleoprotein complexes*) verpackt und durch die Kernmembran ins Zytoplasma transportiert.

Im Zytoplasma kann die mRNA unterschiedliche Schicksale erfahren. Einige mRNAs werden sofort an Ribosomen translatiert, andere für eine spätere Translation zurückgehalten oder abgebaut. Auf Translationsebene kann ebenfalls eine Regulation, beispielsweise durch Translationsinhibition, erfolgen. Die Kontrolle der Genexpression erfolgt aber auch durch Regulation der mRNA-Stabilität. Dabei spielt die gerichtete Degradation von mRNA eine Rolle. Der Abbau der meisten mRNAs beginnt mit dem Entfernen des Poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende durch den CCR4-Not-Komplex. Dieser Komplex besteht aus mehreren Untereinheiten, unter ihnen die beiden Exonukleasen CCR4 und CAF1/POP2. Nach der Deadenylierung erfolgt der mRNA-Abbau entweder vom 3'- oder vom 5'-Ende der mRNA. Der Abbau vom 3'-Ende erfolgt durch das Exosom, einem Komplex aus 3'-5'-Exonukleasen. Beim Abbau vom 5'-Ende lagert sich der Lsm1-7 Komplex an das 3'-Ende an und induziert das Entfernen der m⁷G-Kappe der mRNA (*Decapping*) durch den Dcp1/Dcp2-Komplex. Danach ist die mRNA für den Abbau durch die 5'-3'-Exoribonuklease Xrn1 zugänglich und wird von dieser degradiert^[85]. Die Proteine dieser Abbaumaschinerie sind in zytoplasmatischen Aggregaten aus Proteinen und translationsinhibierten mRNAs, den sogenannten *P Bodies*, zu finden. In *P Bodies* kann mRNA entweder durch den CCR4-Not-Komplex abgebaut werden, oder die mRNA wird dort gespeichert, bis sie wieder in den aktiven Translationszyklus übergeht^[86, 87].

Eine verwandte, aber doch von *P Bodies* zu unterscheidende Art zytoplasmatischer mRNPs sind die sogenannten *Stress Granules* (SGs), die in ihrer Translation blockierte mRNAs beinhalten und sich unter Stressbedingungen (oxidativer Stress, Wirkstoffe etc.) bilden. Eine

Degradation von mRNA findet in ihnen nicht statt, sodass nach der Stress-Antwort die zwischengelagerten mRNAs wieder in den aktiven Translationszyklus entlassen werden können^[88]. Einige der Proteine, die in *Stress Granules* zu finden sind, kommen auch in *P Bodies* vor. Trotz der Ähnlichkeit zu *P Bodies* und einigen gemeinsamen Proteinkomponenten sind SGs unterschiedliche subzelluläre Einheiten, die auch SG-spezifische Proteinkomponenten wie Translationsinitiations-Faktoren (z.B. eIF3, eIF4G und PABP-1) enthalten^[89].

1.5 Massenspektrometrie in der Proteomik

Da an fast allen zellulären Vorgängen Proteine beteiligt sind, ist für das Verständnis der komplexen Prozesse innerhalb der Zelle die Analyse von Proteinen von großer Bedeutung. Die Proteomanalyse (Proteomik) bezeichnet die Erforschung aller innerhalb einer Zelle oder eines Organismus vorliegenden Proteine mit dem Ziel der detaillierten Beschreibung ihrer Struktur, ihrer Funktion und der Kontrolle von biologischen Systemen.

Die Erweiterung um schonende Methoden, die sich für die Ionisierung von Proteinen eignen, macht die Massenspektrometrie (MS) heutzutage zu einer der wichtigsten Technologien der Proteinanalyse. Der Hauptfortschritt in der MS-basierten Proteomanalyse besteht in der deutlichen Verbesserung der Datenqualität, die sich aus der Entwicklung neuer Instrumente, besserer Fragmentierungsmethoden, größerer Sensitivität und verbessertem Auflösungsvermögen sowie besseren Auswertungsstrategien ergab. Neben der technischen Verbesserung sind auch der Zugang zu Protein- oder DNA-Sequenzdatenbanken und die Verwendung von Computeralgorithmen entscheidend dafür, dass die MS-basierte Proteomanalyse vielseitige Informationen liefern kann sowie die Möglichkeit besteht komplexe Peptidgemische zu analysieren.

Die MS findet Anwendung in der Bestimmung der spezifischen Eigenschaften eines Proteins, die unter anderem die Primärstruktur, posttranslationale Modifikationen und die subzellulären Verteilung umfassen. Durch die neuesten Entwicklungen in der chemischen Markierung und der Markierung von Proteinen mit stabilen Isotopen kann die MS neben der qualitativen Analyse auch für die Quantifizierung von Proteinen genutzt werden. Durch quantitativen Vergleich des Proteoms zu unterschiedlichen Zeitpunkten eignet sich die MS somit auch für die Analyse der dynamischen Eigenschaften und des Proteinumsatzes eines zellulären Systems. Für die Bestimmung der Zusammensetzung von Proteinkomplexen und die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen durch Affinitätsexperimente ist die Massenspektrometrie zunehmend die Methode der Wahl um das Verständnis der zellulären Funktion zu verbessern.

1.6 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, das Interaktom der Proteine CD2BP2, GIGYF2 und Smy2 genauer zu definieren. Diese Proteine zeichnen sich durch eine GYF-Domäne aus, die prolinreiche Sequenzen bindet. Zur näheren Charakterisierung wurden die GYF-Domänen der drei Proteine in *Pulldown*-Experimenten in Kombination mit quantitativer MS und spezifischer Inhibition der PRS-Bindungsstelle eingesetzt. Die aus der MS-Analyse resultierende Identifizierung der Bindungspartner lieferte neue, bisher noch unbekannte Interaktionen, die der Aufklärung der zellulären Funktion dieser Proteine weitere Hinweise lieferten.

Da die Interaktion zwischen prolinreichen Sequenzen und ihren Bindungsdomänen auch eine Rolle bei der Entstehung von Krankheiten spielt, wurden im Weiteren zwei verschiedene Inhibitionsmethoden der GYF/PRS-Interaktion mittels NMR-spektroskopischer Bindungsstudien validiert. Die untersuchten Inhibitionsmethoden umfassen ein Peptidmimetikum und organische Kleinmoleküle.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Allgemeine Chemikalien

Alle für molekularbiologische und biochemische Arbeiten notwendigen Chemikalien besaßen einen Reinheitsgrad von $\geq 99\%$. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Seelze) und Applichem (Darmstadt) bezogen.

2.1.2 Puffer, Lösungen und Medien

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer, Lösungen und Medien ist in den entsprechenden Sektionen angegeben. Bei Bedarf wurden die Lösungen für 20 Min. bei 120 °C und 2 bar autoklaviert oder durch einen Membranfilter mit der Porengröße 0,2 μm steril filtriert.

2.1.3 Enzyme

Tabelle 2.1: Liste der verwendeten Enzyme

Enzym	Konzentration	Reaktionspuffer	Hersteller
T4 DNA-Ligase	400 U/ μl	10x T4 DNA-Ligase Reaktionspuffer	NEB, Frankfurt am Main
Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP)	10 U/ μl	10x NEB-Puffer 2, 3 oder 4	NEB, Frankfurt am Main
KOD Hot Start DNA-Polymerase	1 U/ μl	10X PCR-Puffer für KOD Hot Start DNA Polymerase	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt
OptiTaQ DNA-Polymerase	5 U/ml	10x Pol Puffer B oder C	Roboklon GmbH, Berlin
Taq DNA-Polymerase	5 U/ μl	10x ThermoPol-Puffer	NEB, Frankfurt am Main

Restriktionsenzyme mit zugehörigen Puffern wurden von der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main) bezogen und gemäß den Herstellerangaben verwendet.

2.1.4 Reaktionschemikaliensätze

Die Reaktionschemikaliensätze (*Kits*) für die Aufreinigung von PCR Fragmenten, für die Gelextraktion von DNA, sowie für die Plasmidpräparation wurden von der Qiagen GmbH (Hilden), der Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) und Invitrogen (Darmstadt) bezogen.

2.1.5 Vektoren

Tabelle 2.2: Liste der verwendeten Vektoren

Eukaryote Expressionsvektoren

Vektor	Hersteller	Bemerkung
pEGFP-C3/-N1	BD Biosciences Clontech, Heidelberg	Expressionsvektoren für N- und C-terminale GFP-Fusionsproteine; stärkere fluoreszierende Variante des grünfluoreszierenden Proteins (GFP)
pcDNA3-CFP/YFP	Prof. Michael Schäfer	Modifizierte pcDNA3.1 Vektoren (Invitrogen) für die Herstellung von N- und C-terminalen CFP- oder YFP-Fusionsproteinen; Ampicillinresistenz ^[90]

Bakterielle Expressionsvektoren

Vektor	Hersteller	Bemerkung
pGex-4T-1	Amersham Biosciences	Expressionsvektor N-terminaler Glutathion-S-Transferase-(GST)-Fusionsproteine; Thrombin-Substratsequenz zwischen GST und inseriertem Protein; Ampicillin-Resistenzgen.
pET28a	Novagen-Merck KGaA, Darmstadt	Expressionsvektor N-terminaler Hexahistidin (His ₆)-Fusionsproteine; Thrombin-Substratsequenz zwischen His ₆ -Tag und inseriertem Protein; Kanamycin-Resistenzgen.
pET28a-Mod	AG Freund	Modifizierter pET28a-Vektor; zwischen die Restriktionsschnittstellen <i>NcoI</i> und <i>HindIII</i> wurde eine veränderte Nukleotidsequenz eingefügt, mit zusätzlicher <i>BamHI</i> -Schnittstelle; N-terminale His ₆ -Tag; Thrombinerkennungssequenz

NcoI *BamHI* *HindIII*

ATCCATGGCGCATCATCATCATCATCTTGTCCAAGAGGATCCATCTTCTATAAGCTTATCTAT

M A H H H H H H L V P R G S

2.1.6 Oligonukleotide und DNA-Sequenzierungen

Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG-Biotech AG (Ebersberg) und BioTeZ GmbH (Berlin) synthetisiert. DNA-Sequenzierungen wurden von den Firmen SeqLab Sequence Laboratories (Göttingen) und MWG-Biotech AG (Ebersberg) durchgeführt.

Tabelle 2.3: Liste der verwendeten Oligonukleotide

Nr	Name	Nukleotidsequenz 5'-3'	Bemerkung
1	CCR4-HA fw	GCAAGATTTGAATTTATGAAGACAAACACAGGC AGTAAGAAAGTACGGATCCCCGGGTTAATTAA	für die chromosomale HA-Markierung des CCR4-Gens, Vorwärtsprimer
2	CCR4-HA rev	GTGAGATTGGGATCGTTTCAATTTTATAATGAGG TAGTGTACAGAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	für die chromosomale HA-Markierung des CCR4-Gens, Rückwärtsprimer
3	GST-C631 d	CTACTGGATCCATGAACAATGTTTCTCCCCG	Smy2-Teilkonstrukt: Beginn AS 631 , <i>BamHI</i> -Schnittstelle, Vorwärtsprimer
4	GST-C631 r	AGTAGCTCGAGTCAGTGTTTTCTACCTTCTTCTT G	Smy2-Teilkonstrukt: Ende AS 740, <i>XhoI</i> -Schnittstelle, Rückwärtsprimer
5	GST-GYF (280-)	CTACTGGATCCGATGTGATGTGGGAATATAAG	CD2BP2-GYF-Domäne: Beginn AS 280 , <i>BamHI</i> -Schnittstelle, Vorwärtsprimer
6	GST-GYF (-342*)	AGTAGCTCGAGTTAGGTGTAGAGGTCAAAGTCA AT	CD2BP2-GYF-Domäne: Ende AS 342, <i>XhoI</i> -Schnittstelle, Rückwärtsprimer
7	GST-PERQ2 GYF d	ATCTATGGATCCGAAGCAATGCAGAAGTGG	GIGYF2-GYF-Domäne: Beginn AS 531 , <i>BamHI</i> -Schnittstelle, Vorwärtsprimer
8	GST-PERQ2 GYF r	CTATCTCGAGTTATGGACCTGGAGAAAAGGGAA C	GIGYF2-GYF-Domäne: Ende AS 596 , <i>XhoI</i> -Schnittstelle, Rückwärtsprimer
9	GYF62 W8R d	GGGAATATAAGCGTGAGAACACGG	Mutationsprimer W8R für CD2BP2- GYF-Domäne, Vorwärtsprimer
10	GYF62 W8R r	CCGTGTTCTCACGCTTATATTCCC	Mutationsprimer W8R für CD2BP2- GYF-Domäne, Rückwärtsprimer
11	GYF62-Y33A d	GGGTGAGTGAAGGCGCTTCCCGGACGG	Mutationsprimer Y33A für CD2BP2- GYF-Domäne, Vorwärtsprimer
12	GYF62-Y33A r	CCGTCCGGGAAAGCGCCTTCACTCACCC	Mutationsprimer Y33A für CD2BP2- GYF-Domäne, Rückwärtsprimer
13	LSM5-HA fw	GCCATCCTTGTCAGGCGGCAAAAAGACCCCTA CGGAGGCGTTGCGGATCCCCGGGTTAATTAA	für die chromosomale HA-Markierung des Lsm5-Gens, Vorwärtsprimer
14	LSM5-HA rev	AAGAAACACTTGATTTCTTTATCTATTTTTATACT TAATTATTTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	für die chromosomale HA-Markierung des Lsm5-Gens, Rückwärtsprimer
15	PERQ2-down	GCATCACTCGAGTAGTCATCCAACGTCTCG	Klonierungsprimer für GIGYF2, <i>XhoI</i> - Schnittstelle, Rückwärtsprimer
16	PERQ2-up	GCATCAGGATCCAGCCACCATGGCAGCGGAAAC GCAG	Klonierungsprimer für GIGYF2, <i>BamHI</i> und <i>NcoI</i> -Schnittstelle, Vorwärtsprimer
17	pGEX 4T-1 dir	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	pGEX-Sequenzierungsprimer, vorwärts
18	pGEX 4T-1 rev	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	pGEX-Sequenzierungsprimer, rückwärts
19	SMY631_LIC_ TEV_fo	AACCTGTATTTCCAGGGAATGAACAATGTTTCTC CC	C-terminale Domäne von Smy2: Beginn AS 631
20	SMY740_LIC_ ba	GAGGAGAAGCCCGGTTCAAGTGTGTTTTCTACCTT	C-terminale Domäne von Smy2: Ende AS 740
21	T7 forw	TAATACGACTCACTATAGG	bindet an die T7-Promotor-Region, Vorwärtsprimer
22	T7 rev	GCTAGTTATTGCTCAGCGGT	bindet an die T7-Terminator-Region, Rückwärtsprimer

2.1.7 DNA-Konstrukte

Tabelle 2.4: Übersicht der verwendeten DNA-Konstrukte

*¹ Kloniert von Dr. M. Kofler

*² Kloniert von K. Thiemke

Protein	Swissprot ID	Aminosäuren	Konstruktnamen	Vektor	Primer
CD2BP2	O95400	280-342	GST-GYF62 wt * ¹	pGEX-4T1	5/6
CD2BP2	O95400	280-342	His-GYF62 wt	pET28a-Mod	5/6
CD2BP2	O95400	280-342	GST-GYF62 W8R Y33A	pGEX-4T1	5-12
GIGYF2	Q6Y7W6	1-1299	PERQ2-CFP/YFP	pcDNA3-YFP/CFP	15/16
GIGYF2	Q6Y7W6	531-596	GST-PERQ2 GYF * ¹	pGEX-4T1	11/12
Smy2	P32909	631-740	GST-SMY2 C631	pGEX-4T1	3/4
Smy2	P32909	193-290	GST-SMY2 GYF * ¹	pGEX-4T1	7/8
Smy2	P32909	631-740	GST-His-TEV Smy2 C631 * ²	pET-41 Ek/LIC	19/20

Kommerziell erworbene Konstrukte

Marker	Konstruktnamen	bezogen von
ER	pECFP-ER	BD Bioscience Clontech, Heidelberg
Golgi	pEYFP-Golgi	BD Bioscience Clontech, Heidelberg

2.1.8 Bakterienstämme und Phagen

E. coli BL21(DE3)

Dieser Stamm wurde zur Expression von GST- und His-Fusionsproteinen benutzt. Genotyp: F⁻ ompT gal [dcm] [lon] hsd SB (r-B m-B) mit λ -Prophage DE3 (trägt T7 RNA-Polymerase Gen)

E. coli XL1-Blue

Dieser Stamm wurde für alle molekularbiologischen Arbeiten verwendet. Genotyp: F[']::Tn 10 proA+B+ lacIq Δ (lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 (r-k m+k) glnV44 relA1 lac

Beide Stämme wurden von Stratagene (La Jolla, Kalifornien, USA) bezogen.

VCS-M13 Helferphagen

Diese Phagen wurden für die Phagen-Amplifikation im Phagen-Display genutzt. Aufgrund einer Mutation im Replikationsursprung dienen sie lediglich der Verpackung der neuen Phagen. Sie sind abgeleitet von der M13 K07 Mutante und besitzen ein Kanamycinresistenz-Gen. Bezogen von Stratagene (La Jolla, Kalifornien, USA).

M13-(X9)-Phagen

Diese Phagen präsentieren auf ihrer Oberfläche eine randomisierte Nonapeptidsequenz, die als Fusionsprotein des Capsidproteins pVIII exprimiert wird. Die Herstellung dieser Phagen erfolgt durch Transformation von *E. coli* XL-1 Blue Zellen mit dem PC89 Konstrukt^[91] und anschließender Superinfektion mit den VCS-M13 Helferphagen.

2.1.9 Säugerzelllinien

HeLa S3 Zellen

Es handelt sich hierbei um eine humane Zervix-Adenokarzinom Zell-Linie. Bei der HeLa S3 Zell-Linie handelt es sich um einen Subklon der Original-Hela Zell-Linie (DSM ACC 57)^[92].

2.1.10 Hefestämme

YAL6B

Dieser *Saccharomyces cerevisiae* Hefe-Stamm ist auxotroph für Arginin und Lysin und wird für die Herstellung von SILAC-Hefelysaten verwendet, bei denen die selektive Markierung der Proteine mit den schweren Aminosäureisotopen von Arginin (¹³C₆-Arg oder ¹³C₆¹⁵N₄-Arg) und Lysin (¹³C₆-Lys) erfolgt (s. 2.5.5)^[93].

Genotyp: MATa; his3Δ leu2Δ met15Δ ura3Δ lys1::KanMX6 arg4::KanMX4

TAP SMY2

Dieser *Saccharomyces cerevisiae* Hefestamm exprimiert das Protein Smy2 mit einer C-terminalen Tandemaffinitätsaufreinigungs-(TAP)-Markierung. Diese Markierung (*Tag*) besteht aus einem Calmodulin-Bindungspeptid und zwei IgG-Bindungsdomänen von Protein A aus *Staphylococcus aureus*. Zwischen den beiden *Tags* befindet sich eine TEV-Schnittstelle. Für die Herstellung dieses Hefestammes wurde die genetische Information für den TAP-*Tag* C-terminal in das offene Leseraster (ORF) des Smy2-Gens integriert. Als Ausgangsstamm diente der haploide parentale Hefestamm ATCC 201388 (Genotyp: MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0). Die C-terminale TAP-Insertionskassette beinhaltet zudem die Kodierungssequenz für das Selektionsmarkergen His (Thermo Scientific Open Biosystems).

2.1.11 Antikörper, Peptide und Isotope

Tabelle 2.5: Übersicht der verwendeten Antikörper

Primärantikörper				
Antigen	Natur	Wirt	Name	Quelle
CD2BP2	polyklonal	Kaninchen	-	Herstellung AG Freund
CD2BP2	polyklonal	Ziege	ab32899	Abcam plc, Cambridge, UK
GAPDH	monoklonal	Kaninchen	GAPDH (14C10)	NEB GmbH, Frankfurt am Main
GIGYF2	polyklonal	Kaninchen	-	Herstellung AG Freund
GST	polyklonal	Kaninchen	GST (Z-5): sc-459	Santa Cruz, Heidelberg
Sec31	monoklonal	Maus	Sec31A	BD Biosciences, Heidelberg
SmB	polyklonal	Kaninchen	Sm B/B'/N (FL-240): sc-25372	Santa Cruz, Heidelberg
SmB	polyklonal	Ziege	Sm B/B'/N (N-18): sc-5485	Santa Cruz, Heidelberg
CBP Tag	polyklonal	Ziege	CBP Tag (K-24): sc-33000	Santa Cruz, Heidelberg
HA	polyklonal	Kaninchen	HA-probe (Y-11): sc-805	Santa Cruz, Heidelberg
TIA-1/TIAR	monoklonal	Maus	TIA-1/TIAR (D-9): sc-48371	Santa Cruz, Heidelberg

Sekundärantikörper		
Antigen	Wirt	Quelle
IgG (Ziege), IRDye800-konjugiert	Esel	LI-COR GmbH, Bad Homburg
IgG (Kaninchen), IRDye®800-konjugiert	Esel	LI-COR GmbH, Bad Homburg
IgG (Maus), IRDye680-konjugiert	Esel	LI-COR GmbH, Bad Homburg
IgG (Kaninchen), Peroxidase-konjugiert	Ziege	Biomol (Rockland), Hamburg
anti-Maus IgG (H+L)-Cy™2-konjugiert	Kaninchen	DIANOVA GmbH, Hamburg
anti-Kaninchen IgG (H+L)-Cy™3-konjugiert	Ziege	DIANOVA GmbH, Hamburg

Tabelle 2.6: Übersicht der verwendeten Peptide

Alle Peptide tragen eine Amidgruppe am C-Terminus.

* Peptidsequenz stammt aus Phagen-Display Versuchen mit einer X₉-Bibliothek

Name	Sequenz	Protein	Aminosäuren
MSL5-L1	SIAPPPLSGPPGFSN	Msl5	441-456
SmB-2	GTPMGMPPPGMRPPPPGMRGLL	SmB	210-231
PD1	EFGPPPGWLGR	*	
PD2	HVGPPPGLEVQ	*	
PD3	EFFGPPGLDRP	*	

Stabile Isotope:

¹³C₆-Arg, ¹³C₆¹⁵N₄-Arg, ¹³C₆-Lys, ¹⁵NH₄Cl, H₂O¹⁸

Die Isotope wurden von den Firmen Silantes GmbH (München), Euriso-Top GmbH (Saarbrücken) und Campro Scientific GmbH (Berlin) bezogen.

2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav Bakterienbrutschrank	H+P Labortechnik, Oberschleißheim WTB BINDER, Tutlingen
Chromatographiesysteme	
ÄKTApurifier™	GE Healthcare, München
ÄKTAFPLC™	GE Healthcare, München
Profinia™ Protein Purification System	Bio-Rad, München
Chromatographische Säulen	
HiLoad 16/60 Superdex 75	GE Healthcare, München
HiLoad 16/60 Superdex 200	GE Healthcare, München
GSTrap™ FF 5 ml	GE Healthcare, München
HiTrap™ Chelating HP 5 ml	GE Healthcare, München
Elektroporationsgerät	
Gene Pulser X cell™, Shock Pod™	Bio-Rad, München
Elektrophoresesysteme	
für Agarosegele	OWL Separation Systems, Inc., Portsmouth, NH USA
für SDS-PAGE : Mini-Protean II	Bio-Rad, München
für SDS-PAGE und Western Blots : XCell SureLock™ Mini-Cell	Invitrogen (Darmstadt)
Flüssigkulturschüttler Multitron FRENCH® Press Lumineszenzdetektor LumiImager	Infors, Bottmingen, Schweiz SLMAminco, Rochester, USA Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
NMR-Geräte	
AV600, Bruker, abgeschirmt, 54 mm Bohrung	Bruker
AV750, Magnex, 52 mm Bohrung	Magnex
Massenspektrometer	
Q-Tof Ultima API-Massenspektrometer (Micromass) mit nanoLC	Waters Eksigent
LTQ Orbitrap XL-Massenspektrometer mit nanoLC	Thermo-Fisher CapLC, Waters

Odyssey Imager

PCR-Gerät Mastercycler® epgradient S

pH-Meter 766 calimatic

pH-Mikroelektrode U402-M3-S7/200

S20 - SevenEasy™ pH

Quarzküvette QS 10 mm

Scanner Astra 4500

Spektralphotometer Ultraspec 2100 pro

LI-COR Biosciences, Lincoln,
Nebraska, USA

Eppendorf, Hamburg

Knick, Berlin

Mettler-Toledo GmbH, Giessen

Mettler-Toledo GmbH, Giessen

Hellma Optik GmbH Jena, Jena

Umax Systems, Willich

Amersham Pharmacia Biotech,
Piscataway, USA

Ultraschallgerät

DIGITAL Sonifier® UNITS Models W-250D
mit Ultraschallkopf (Model 102C)

Branson Sonifier

Zentrifugen

Centrifuge 5415 D / R, 5804 R, 5814 R

Avanti™ J-25 centrifuge

Thermo-Savant SPD 1010 SpeedVac System

Integrated SpeedVac System ISS 100

Eppendorf, Hamburg

Beckman Coulter™, Fullerton, USA

Thermo Fisher Scientific,

Langenselbold, DE

Savant Instruments Inc.,

Farmingdale, NY

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units

Anti-HA Affinity Matrix from rat IgG₁

Calmodulin-Agarose

Glutathione Sepharose™ 4B

Human IgG Whole Molecule Agarose

Conjugated

Micro Bio-Spin 30 Columns

Nitrocellulose Membran, 0.45 µm

NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel

NuPAGE® Novex 4-20% Tris-Glycine Gel

SuperSignal West PICO Chemiluminescent
Substrate

Vivaspin 20

Vivaspin 6

Millipore GmbH, Schwalbach am Taunus

Roche Diagnostics Deutschland GmbH,
Mannheim

Sigma Aldrich, Seelze

GE Healthcare, München

Biomol GmbH, Hamburg

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Invitrogen, Darmstadt

Invitrogen, Darmstadt

Thermo Fisher Scientific, Bonn

Sartorius AG, Göttingen

Sartorius AG, Göttingen

2.2.3 Wissenschaftliche Computerprogramme und Datenbanken

Software / Datenbank	Hersteller / Referenz
BioGRID ^{3.1}	http://www.thebiogrid.org [94] [95]
ClustalW2	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/ [96]
ExPASy ProtParam tool	http://web.expasy.org/protparam/ [97]
IntAct	http://www.ebi.ac.uk/intact/ [98] [99]
LSM Image Browser	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Mascot Distiller	Matrix Science Ltd., London, UK
MaxQuant	[100]
MsQuant	[101]
Odyssey 2.0	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
Origin 6.0	OriginLab Corporation, Northampton, USA
Scaffold	Proteome Software, Inc., Portland, USA
ScanProsite	http://prosite.expasy.org/scanprosite [102] [103]
Sigma Plot 11	Systat Software GmbH, Erkrath
Sparky 3	Goddard & Kneller, UCSF, USA
SpecWin	Instrument Systems GmbH, München
STRING ^{9.0}	http://string-db.org/ [104]
SWISS-MODEL	http://swissmodel.expasy.org/ [105, 106]
TopSpin™	Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten
Uniprot	http://www.uniprot.org/ [107]
XWIN-NMR	Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten
Zeiss LSM Image Browser	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 PCR-basierte Klonierung

Die zu inserierenden DNA-Fragmente wurden durch PCR amplifiziert und entsprechend den Herstellerangaben mithilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) für den anschließenden Restriktionsverdau aufgereinigt. Die PCR-Fragmente und der Zielvektor wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten. Zur Dephosphorylierung des Vektors wurde 30 min vor Beendigung des Restriktionsverdaus der Probe 1 µl CIP (Alkalische Phosphatase) [1U/µl] zugesetzt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung (s. 2.3.2) des geschnittenen Inserts und des geschnittenen Vektors und anschließender Gel-Extraktion wurde das Insert mit dem Vektor ligiert. Die Vektor-DNA (50 – 600 ng) wurde mit der Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:5 für den Ligationsansatz eingesetzt. Für die Ligation wurden 1 µl T4 DNA-Ligase [400U/µl] und 2 µl 10x T4 Ligase-Puffer verwendet, das Gesamtvolumen des Ligationsansatzes betrug 20 µl. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert.

2.3.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Molekülen wurden horizontale 1-2% (w/v) Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer durch Aufkochen vollständig gelöst, mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml versetzt und in einen Gelschlitten gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurde es in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte, horizontale Elektrophoresekammer eingesetzt. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen 10x DNA-Probenpuffer versetzt. Parallel wurde ein Größenstandard (100 bp, 1 kb, HindIII-verdaute λ-DNA von NEB) mitgeführt. Die Elektrophorese wurde für 30-40 Min. bei einer Spannung von 140 V durchgeführt.

Durch den interkalierenden und fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid konnten die DNA-Fragmente durch Bestrahlung des Gels mit UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht werden.

50 x TAE-Puffer, pH 8:

2M Tris, 1M Essigsäure, 50 mM EDTA

10 x DNA-Probenpuffer:

3 mg/ml Bromphenolblau, 50 % Glycerin (100%), 33,3 mM EDTA pH

2.3.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration c doppelsträngiger DNA (dsDNA) wurde in einer Quarzküvette photometrisch anhand der Absorption bei 260 nm (A_{260}) wie folgt ermittelt:

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

Alternativ konnten bei der gelelektrophoretischen Auftrennung von DNA-Molekülen durch Vergleich der Bandenintensitäten des parallel mitgeführten Größenstandards die aufgetragenen DNA-Mengen abgeschätzt werden.

2.3.4 Restriktionsverdau von DNA

Zum Schneiden doppelsträngiger DNA wurden Restriktionsendonukleasen in den entsprechenden Reaktionspuffern und bei den geeigneten Temperaturen nach Herstellerangaben verwendet. 1-2 U der Endonukleasen wurden pro µg DNA eingesetzt, die Inkubationszeiten variierten zwischen 1 und 5 h. Analytische Restriktionen wurden in einem

10 µl Reaktionsansatz durchgeführt, präparative Restriktionen in einem Ansatz von 20-100 µl. Anschließend wurden die Restriktionsansätze über Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt.

2.3.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Für die Präparation von Vektor- und Insert-DNA wurden die Restriktionsansätze elektrophoretisch über Agarosegele aufgetrennt und die gewünschten DNA-Fragmente unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

2.3.6 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

50 ml LB-Medium wurden mit einem Einzelklon einer frisch ausgestrichenen Kultur inokuliert und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Mit 25 ml dieser Flüssigkultur wurden 500 ml LB-Medium beimpft und die Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 wachsen gelassen. Anschließend wurde die Kultur für 30 min auf Eis abgekühlt und für 15 Min. bei 1000 x g und 4 °C geerntet. Das Bakterienpellet wurde in 500 ml eisgekühltem Wasser resuspendiert und erneut für 20 Min. bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde dann in 10 ml einer eisgekühlten Glycerinlösung (10%, v/v) resuspendiert und noch einmal wie zuvor zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml GYT-Medium resuspendiert, als 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

LB-Medium:

10 g/l Trypton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt in H₂O, autoklaviert

LB-Agar:

15 g Agar (Carl Roth GmbH & Co. KG) in 1l LB-Medium, autoklaviert

GYT-Medium:

0,125 % Hefeextrakt (w/v), 0,25 % Trypton (w/v), 10 % Glycerin (v/v)

2.3.7 Transformation von Bakterien

Ligationsansätze wurden über Micro Bio-Spin 30 Säulen (Bio-Rad) entsalzt, mit 50 µl elektrokompetenten Bakterien (XL1 Blue oder BL21 (DE3)) gemischt und in gekühlte Elektroporationsküvetten mit einem Elektrodenabstand von 1 mm überführt. Die Elektroporation erfolgte mit dem Gene Pulser X cell™ (Bio-Rad) bei 1,8 kV, 200 Ω und 25 µF. Sofort nach dem Puls wurden die Bakterien in 1 ml LB- (s. 2.3.6) oder SOC-Medium überführt und eine Stunde schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Der gesamte Transformationsansatz

wurde dann auf LB-Agarplatten, die ein Antibiotikum entsprechend dem Resistenzgen des transformierten Vektors enthielten, ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

SOC-Medium:

20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,6 g/l Natriumchlorid, 0,2 g/l Kaliumchlorid, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose*

*Die Glucoselösung wurde entweder über einen Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm steril filtriert oder separat autoklaviert.

2.3.8 Kultivierung von Bakterien

Für die Proteinexpression und die Plasmidisolierung aus Bakterien wurden LB-, 2xYT- oder M9-Medium (s. 2.4.1) mit einer von einer Agarplatte gepickten Bakterienkolonie inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm schüttelnd inkubiert. Den Agarplatten und dem Kulturmedium wurden entsprechende Antibiotika zugesetzt. Die Kanamycinsulfat-Konzentration betrug 35 µg/ml, die Ampicillin-Konzentration 100 µg/ml.

2.3.9 Isolierung von Plasmid-DNA

2-5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin oder 35 µg/ml Kanamycinsulfat wurden mit plasmidtragenden Bakterien inokuliert und bei 37 °C über Nacht schüttelnd inkubiert. Die dicht gewachsene Flüssigkultur wurde 10 Min. bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert. Aus dem Zellpellet wurde die Plasmid-DNA mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) nach Angaben des Herstellers isoliert. Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden aus 100-200 ml einer Übernachtskultur mit dem PureLink™ HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.3.10 Kultivierung von Hefezellen

Eine einzelne Hefekolonie wurde in einem Volumen von 30-50 ml Medium vollständig resuspendiert. Die Kultur wurde über Nacht (16-18 h) bei 30 °C und 230 rpm schüttelnd inkubiert. Zur Anzucht untransformierter Hefestämme wurde YPD Medium genutzt.

Für die Herstellung von Kulturen, die sich noch in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurde frisches Medium mit der Übernachtskultur inokuliert und bei 30 °C und 230 rpm für 3-5 Stunden schüttelnd inkubiert. Die Anfangsdichte der Kultur sollte dabei zwischen OD₆₀₀ = 0,2-0,3 liegen.

YPD-Medium, 1 l:

20 g Pepton, 10 g Hefeextrakt, 2% Glucose*

für Agarplatten:

20 g/l Agar

*50 ml einer 40%igen und separat autoklavierten Glucoselösung

2.3.11 Kultivierung von Hefezellen in synthetischem Minimalmedium

Zur Selektion transformierter Hefestämme wurden diese in synthetischem Minimalmedium (*synthetic dropout medium*, SD Medium), dem ein oder mehrere spezifische Metaboliten fehlten, kultiviert. Die Selektion erfolgt hierbei nicht über Antibiotikaresistenzen, sondern über plasmidvermittelte Stoffwechselprototrophien. Je nach Selektionsbedingungen fehlten in der *Dropout* (DO)-Lösung Nährstoffe, wodurch das daraus resultierende SD Medium nur für das Wachstum der Hefen geeignet ist, die in der Lage sind diese selbst zu synthetisieren. Die Zusammensetzung des Mediums ist somit abhängig vom Hefestamm und dem transformierten Plasmid.

SD Medium:

6.7 g Hefe-Stickstoff-Base ohne Aminosäuren

850 ml H₂O

100 ml der entsprechenden 10x *Dropout*-Lösung

50 ml 40% (w/v) Glucose-Lösung (vorher separat autoklaviert)

pH 5,8

für Agarplatten:

20 g/l Agar

10x Dropout- (DO) Lösung:

200 mg/l	L-Adenin Hemisulfat	500 mg/l	L-Phenylalanin
200 mg/l	L-Arginin HCl	2000 mg/l	L-Threonin
200 mg/l	L-Histidin HCl Monohydrat	200 mg/l	L-Tryptophan
300 mg/l	L-Isoleucin	300 mg/l	L-Tyrosin
1000 mg/l	L-Leucin	200 mg/l	L-Uracil
300 mg/l	L-Lysin HCl	1500 mg/l	L-Valin
200 mg/l	L-Methionin		

Serin, Asparaginsäure und Glutaminsäure werden dem Medium nicht zugegeben, da Hefen diese Aminosäuren endogen synthetisieren können. Für Selektionsmedium ohne Methionin wird Asparaginsäure in 10x DO-Lösung in einer Konzentration von 1000 mg/l eingesetzt. 10x DO-Lösungen wurden autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

2.3.12 Transformation von Hefezellen

Die Transformation von Hefezellen erfolgte nach der Lithium-Acetat-Methode, bei der Hefezellen kompetent für die Aufnahme von Fremd-DNA gemacht werden^[108]. In Anwesenheit alkalischer Ionen, Träger-DNA, Polyethylenglycol (PEG) und DMSO erfolgt die Transformation mittels Hitzeschock. Die Transformation (*Small-scale LiAc Yeast Transformation Procedure*) erfolgte nach dem Protokoll von Clontech (*Yeast Protocols Handbook*).

Für die Transformation wurden zunächst kompetente Zellen wie folgt hergestellt: Eine YPD-Kultur (300 ml) wurde mit etwa 30 ml einer Übernachtskultur einer Einzelkolonie bis zu einer Anfangsdichte von $OD_{600} = 0,2-0,3$ inokuliert und für drei Stunden bei 30 °C bei 230 rpm inkubiert. Die Kultur wurde bei Raumtemperatur (RT) für 5 Min. bei 1000 x g geerntet und das Pellet mit sterilem H₂O gewaschen. Die Hefezellen wurden in 1,5 ml einer 1x LiAc-Lösung resuspendiert. 100 µl dieser Hefesuspension wurden mit 0,1 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA und einem Überschuß an Träger-DNA (0,1 mg Heringssperma-DNA) gemischt. Polyethylenglykol (PEG) und eine geeignete Menge an LiAc (0,6 ml PEG/LiAc-Puffer) wurde diesem Gemisch beigefügt und das Gemisch aus DNA und Hefe für 30 Min. bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Nach der Inkubation werden 70 µl DMSO zugefügt und die Zellen einem Hitzeschock (15 Min., 42 °C) mit anschließender Inkubation für 2 Min. auf Eis ausgesetzt. Um Transformanten, die das eingefügte Plasmid enthalten, zu selektieren, wurden die Zellen für 5 sek bei 200 x g pelletiert, in 0,5 ml 1x TE-Puffer resuspendiert und anschließend auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert. Die Selektion transformierter Hefestämme erfolgte durch die Verwendung des entsprechenden Selektionsmediums (s. 2.3.11). Die Platten wurden bei 30 °C inkubiert.

Träger-DNA (10 mg/ml):

Heringssperma-DNA (Sigma-Aldrich) wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in Wasser aufgenommen. Kurz vor Gebrauch wurde die DNA für 20 Min. bei 95 °C aufgeköcht und danach sofort auf Eis gekühlt.

PEG/LiAc Lösung (Polyethylenglykol/Lithiumacetat), 10 ml:

8 ml 50% PEG 3350-Lösung, 1 ml 10x TE-Puffer, 1 ml 10x LiAc-Puffer

10X TE-Puffer:

0.1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5, autoklaviert

10X LiAc-Lösung:

1 M Lithiumacetat, pH 7,5, autoklaviert

2.3.13 DNA-Extraktion aus Hefe

Zur Isolierung genomischer DNA aus Hefe wurde eine Kolonie in 5 ml nicht-selektives YPD Medium überführt und für 18-24 Stunden bei 30 °C und ständigem Schütteln bei 230 rpm inkubiert. Danach wurden 1,5 ml dieser Zellsuspension pelletiert und das Zellpellet in 200 µl GP-Puffer resuspendiert. Weiterhin wurden etwa 0,3 g Glas-Kügelchen (Sigma; 425-600 µm Durchmesser) und 200 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben und alles für drei Minuten gründlich gemischt. Anschließend wurden 250 µl Wasser zugegeben, nochmals gemischt und 5 Min. bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 1 ml Ethanol und anschließender Zentrifugation gefällt. Das DNA Pellet wurde nochmals mit 1 ml 70%-igem Ethanol gewaschen und in 500 µl Wasser resuspendiert.

GP-Puffer:

2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8

2.3.14 Chromosomales *Taggen* von Hefeproteinen

Für die Expression HA-markierter Hefeproteine unter der Kontrolle ihres natürlichen Promotors wurden die Zielgene chromosomal mit der genetischen Information für den *Tag* fusioniert. Eine geeignete Methode für die Modifikation chromosomaler Gene ist die PCR-vermittelte homologe Rekombination. Die Insertion der Kodierungssequenz eines HA-*Tags* in die chromosomale DNA der Zielgene erfolgte durch Transformation eines linearen PCR-Fragmentes in die Hefezellen. Durch homologe Rekombination sollten dann die PCR-Fragmente in ihren Zielgenort inserieren. Als Template-DNA für die Amplifikation des PCR-Produktes wurde das Plasmid pFA6a-3HA-kanMX6 verwendet^[109]. Auf diesem Plasmid befindet sich eine Insertionskassette für einen 3x HA-*Tag* und die kanMX6-Kassette. Die kanMX6-Kassette kodiert für das heterologe *E. coli* kan^r-Gen, welches die Resistenz gegen G418/Geneticin vermittelt und als Markergen für die Selektion der Transformanten dient^[110, 111]. Aufgrund des heterologen Ursprungs soll diese Kassette selbst nicht in das Zielgenom rekombinieren.

Zur Generierung der PCR-Fragmente wurden Oligonukleotide genutzt, deren 5'-Enden der Zielgenesequenz entsprachen. Für eine effektive Rekombination und die Genspezifität sollte dieser Bereich etwa 40 Nukleotide abdecken. Das 3'-Ende der Oligonukleotide (~20 bp) diente der Amplifikation der Insertionskassette.

PCR-Programm:

95 °C - 4:00
95 °C - 00:30 } 10 Zyklen
50 °C - 00:30 }
70 °C - 1:00 }
95 °C - 00:30 } 20 Zyklen
50 °C - 00:30 }
70 °C - 1:20 }
70 °C - 4:00
4 °C - ∞

Die Transformation der PCR-Fragmente erfolgte nach der Lithium-Acetat-Methode (s. 2.3.12).

2.4 Proteinchemische und biochemische Methoden

2.4.1 Expression rekombinanter Proteine

Die zu exprimierenden Konstrukte lagen kloniert in pGEX-4T-1 und/oder pET28a-Mod-Vektoren vor. Für die Proteinexpression wurden *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen mit einem Expressionsplasmid transformiert und auf LB-Agarplatten, die ein entsprechendes Antibiotikum enthielten, ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Anzucht der Zellen erfolgte in Medium, das das entsprechende Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin oder 35 µg/ml Kanamycinsulfat) enthielt. Für die Expression unmarkierter Proteine wurden 500-1000 ml 2x YT-Medium mit mit einem Einzelklon inokuliert und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Für die Expression ¹⁵N-markierter Proteine wurden die Zellen in Minimalmedium kultiviert. Die Proteinexpression wurde bei einer OD₆₀₀ = 0,5 durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Expressionsdauer betrug 4 Stunden bei 37 °C. Die Expression wurde durch Zentrifugation der Kultur für 20 Min. bei 18600 x g und 4 °C beendet. Das Zellpellet wurde bei -80 °C gelagert.

2x YT-Medium:

16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,0

M9-Minimalmedium:

10 ml Spurenelementlösung, 1 ml 1M MgSO₄, 300 µl 1M CaCl₂, 100 ml 10x M9 Salzlösung, 10 ml 40% Glucose, 1,5 ml Thiamin (1mg/ml), 15 ml Biotin (0,1mg/ml), 750 mg ¹⁵NH₄Cl, ad 1 l H₂O + Antibiotikum

Spurenelementlösung:

2,5 g EDTA, 250 mg FeSO₄, 25 mg ZnCl₂, 5 mg CuSO₄, ad 500 ml H₂O, pH 7,6

10x M9-Salzlösung:

80 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 20 g KH₂PO₄, 5 g NaCl, ad 1 l H₂O

2.4.2 Bakterienaufschluss durch Ultraschall

Das Zellpellet (s. 2.3.8) wurde je nach zu verwendendem Reinigungssystem in 10 ml des entsprechenden Lysepuffers, versetzt mit einer Tablette *Protease Inhibitor Cocktail* (Roche Diagnostics), resuspendiert (s. 2.4.3). Zum Aufschließen der Bakterien wurden diese für 5 Min. mit Ultraschall (Branson Sonifier W-250D) mit einer Amplitude von 20% behandelt. Die Probe wurde dabei auf Eis gekühlt und mithilfe eines Temperaturfühlers eine maximale Proben temperatur von 15 °C gestattet.

Unlösliche Zellbestandteile wurden durch folgende Zentrifugation bei 4 °C und 15557 x g für 20 Min. pelletiert und der proteinhaltige Überstand durch einen 0,22 µm Filter filtriert.

2.4.3 Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von His₆- und GST-Fusionsproteinen

Proteine mit einem N-terminalen His-Tag wurden durch native Nickel-Chelat Affinitätschromatographie unter Verwendung von Nickelionen beladenen HiTrap™ Chelating HP-Affinitätssäulen gereinigt. Für die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen wurden Glutathion Sepharose 4B Säulen (GE Healthcare) verwendet.

Die Proteinaufreinigung erfolgte mit dem Profinia-System (Bio-Rad) nach der Standardmethode „Native IMAC“ mit einer 5 ml HiTRAP Säule für His₆-Fusionsproteine. GST-Fusionsproteine wurden über eine 5 ml GSTrap Säule mit der Standardmethode „GST“ gereinigt. Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Elutionsfraktionen wurden für die anschließende Gelfiltration aufkonzentriert.

2x Profinia Native IMAC Lyse-, Equilibrierungs- & Waschpuffer 1 (Puffer I)

600 mM KCl, 100 mM KH₂PO₄, 10 mM Imidazol, pH 8,0

2x Profinia Native IMAC Waschpuffer 2 (Puffer II)

600 mM KCl, 100 mM KH₂PO₄, 20 mM Imidazol, pH 8,0

2x Profinia Native IMAC Elutionspuffer

600 mM KCl, 100 mM KH₂PO₄, 500 mM Imidazol, pH 8,0

2x Profinia GST Lyse-, Equilibrierungs- & Waschpuffer

300 mM NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, 10 mM EDTA, pH 7,4

2x Profinia GST Elutionspuffer

40 mM Glutathion, 200 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0

2.4.4 Thrombinspaltung von Fusionsproteinen

Zum Abspalten der GST-Markierung wurde die Elutionsfraktion aus 2.3.3 mit 1 U Thrombin pro mg Protein für ca. 16h bei 4 °C inkubiert. Die Trennung von GST und dem Zielprotein erfolgte durch Gelfiltration.

2.4.5 Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)

Proteinlösungen, die nach der Affinitätschromatographie noch Verunreinigungen enthielten, wurden durch Gelfiltrations-Chromatographie gereinigt. Für die Reinigung von Proteinlösungen mittels Größenausschlusschromatographie wurde eine HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 Gelfiltrationssäule (Amersham Pharmacia) verwendet, die über eine computergestützte FPLC-Anlage (Amersham Pharmacia) bedient wurde. Die zu reinigende Proteinlösung, deren Volumen maximal 5 ml betrug, wurde auf die Gelfiltrationssäule geladen und mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Als Laufmittel wurde 1x PBS verwendet. Mit einem Fraktionssammler wurden Fraktionen zu je 1 ml gesammelt. Durch photometrische Messung der Extinktion bei 280 nm wurden die proteinenthaltenden Fraktionen ermittelt und je 7 µl der Fraktionen auf ein SDS-Gel aufgetragen (s. 2.4.9). Fraktionen die reines Protein enthielten, wurden vereinigt und aufkonzentriert (s. 2.4.6). Das gereinigte Protein wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

10x PBS:

1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄, pH 7,3

2.4.6 Konzentrieren und Umpuffern von Proteinen

Aufkonzentrierung und Pufferaustausch von Proteinlösungen erfolgte mittels Ultrafiltrations-Konzentratoren (Amicon, Vivaspin) bei 4 °C und 3220 x g abzentrifugiert, bis das gewünschte Volumen erreicht war. Die molekulare Trenngrenze (MWCO, *molecular weight cutt off*) lag bei 3 kDa für Proteine mit einem geringeren Molekulargewicht als 10 kDa. GST-Fusionsproteine wurden über eine Membran mit einem MWCO von 10 kDa filtriert. Zum Umpuffern wurde das Volumen der Proteinlösung auf 0,2-1 ml eingengt und mit dem gewünschten Puffer bis zur maximalen Füllhöhe der Konzentratoren gefüllt und der Vorgang 4-5-mal wiederholt. Die Proteine wurden bei 4 °C gelagert.

2.4.7 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Absorption

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgte durch Messung der Extinktion bei 280 nm. Für die Messung wurde eine Quarzküvette mit 100 µl einer 1:50 oder 1:100 Verdünnung der Proteinlösung verwendet. Als Referenzwert wurde die Lösung benutzt, die für die Verdünnung verwendet wurde. Mit dem Extinktionskoeffizienten konnte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die Proteinkonzentration bestimmt werden:

$$E_{280} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

ε : Extinktionskoeffizient

c : Konzentration [mg/ml]

d : Schichtdicke der Küvette (1cm)

Der Extinktionskoeffizient E_{280} wurde für jedes Protein aus der Aminosäuresequenz mithilfe der Software ExPasy ProtParam^[97] anhand folgender Gleichung ermittelt:

$$E_{280} \text{ Protein} = \text{Anzahl}_{\text{Tyr}} \cdot \varepsilon_{\text{Tyr}} + \text{Anzahl}_{\text{Trp}} \cdot \varepsilon_{\text{Trp}} + \text{Anzahl}_{\text{Cys}} \cdot \varepsilon_{\text{Cys}}$$

wobei $\varepsilon_{\text{Tyr}} = 1490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\varepsilon_{\text{Trp}} = 5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und $\varepsilon_{\text{Cys}} = 125 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ entsprach.

2.4.8 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration von Zell-Lysaten erfolgte mit dem Protein Assay (Bio-Rad) und basiert auf dem Farbumschlag von Coomassie Brilliantblau G-250 in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration^[112]. Der Farbstoff bindet an basische und aromatische Aminosäurereste. Der ungebundene Farbstoff besitzt ein Absorptionsmaximum bei 470 nm, wohingegen der Farbstoff-Protein-Komplex ein Absorptionsmaximum bei 595 nm besitzt. Dabei korreliert die Zunahme der Absorption bei 595 nm im Vergleich zum ungebundenen Farbstoff mit der Proteinkonzentration der untersuchten Lösung.

Verschiedene Verdünnungen der Zell-Lysate sowie eine BSA-Eichreihe (0,2-0,9 mg/ml) wurden in Doppelbestimmung angelegt. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 20 µl der Proteinlösungen mit 1 ml des Reagenz inkubiert. Die Durchführung und Auswertung der Bradfordbestimmung erfolgten daraufhin gemäß Herstellerangaben.

2.4.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli aufgetrennt^[113]. Die Zusammensetzung der nach Laemmli modifizierten Gele ist in Tabelle 6 angegeben.

Die Proteinproben wurden vor dem Beladen des Gels mit demselben Volumen an 2x SDS-Probenpuffer gemischt, 5 Min. bei 95 °C gekocht und 3 Min. bei 16000 x g zentrifugiert. Es wurden 10 µl des Größenstandards Mark12™ (Invitrogen) für Coomassie-Färbung, bzw. 3 µl des vorgefärbten SeeBlue® Plus2 Markers (Invitrogen) für Western Blots in einer separaten Geltasche mitgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung des Proteingemisches erfolgte für 30 Min. bei einer Spannung von 300 V.

Tabelle 2.7: Zusammensetzung der SDS-Gele

Volumenangaben für ein Gel, bestehend aus Trenn- und Sammelgel. Aufgrund des im Trenngel enthaltenen Glycerins konnte das Sammelgel direkt auf das Trenngel gegossen werden.

Lösungen	Sammelgel 4%	Trenngel 15 %	Trenngel 17%
30% AA/BIS	260 µl	2 ml	2,27 ml
H ₂ O	1,21 ml	630 µl	370 µl
1,5 M Tris, pH 8,8	-	1,08 ml	1,08 ml
1M Tris, pH 6,8	500 µl	-	-
10 % SDS	20 µl	40 µl	40 µl
100 % Glycerin	-	220 µl	220 µl
10 % APS	10 µl	22 µl	22 µl
TEMED	2 µl	2 µl	2 µl

30% AA/BIS:

37,5:1 Acrylamid:Bisacrylamid

2x SDS-Probenpuffer:

355µl H₂O, 125µl 0,5M Tris-HCl, pH 6,8, 250µl 100% (w/v) Glycerin, 200µl 10% (w/v) SDS-Lösung, 20µl 0,5% (w/v) Bromphenolblau-Lösung, 50µl 14,3M 2-Mercaptoethanol

10 x Elektrodenpuffer:

30,3 g Trisbase, 144 g Glycin, 10 g SDS, ad 1 l H₂O

2.4.10 Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie

Proteine können direkt in SDS-Polyacrylamidgelen mit dem organischen Farbstoff Coomassie Brilliant Blau R 250 angefärbt werden. Der Farbstoff bindet an kationische und unpolare Seitenketten der Aminosäuren.

Zum schnellen Färben der Gele wurden diese in der Färbelösung in der Mikrowelle kurz aufgeköcht. Die in der Färbelösung enthaltene Essigsäure fixierte die Proteine in den Gelen. Durch Aufkochen der Gele in Entfärberlösung und mehrmaligen Wechsel der Lösung wurden die Gele entfärbt. Zur Dokumentation wurden die Gele fotografiert.

Färbelösung:

500 ml Methanol, 100 ml 1,7 M Essigsäure, 2,5 g Coomassie Brilliant Blue R250, *ad* 1 l H₂O

Entfärberlösung:

300 ml Methanol, 100 ml 1,7 M Essigsäure, *ad* 1 l H₂O

2.4.11 Western Blot und Immunchemische Detektion von Proteinen

Für eine immunchemische Analyse wurden die Proteine nach der Elektrophorese im elektrischen Feld auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Towbin et al., 1979). Der Transfer erfolgte entweder mit dem Semi-dry- (Bio-Rad) oder dem Tankblot-System (Invitrogen).

Schwämme (nur beim Tankblot-System), Membran und Filterpapiere wurden mit Transferpuffer getränkt, und dann in einer vorgegebenen Anordnung zwischen den beiden Blotelektroden eingespannt. Die Membran war dabei auf der Seite der Anode, das SDS-Gel auf der Seite der Kathode angeordnet. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte beim Semi-dry-Blot bei 18 V für 45 Min. und beim Tankblot-System für 60 Min. bei 30V.

Der erfolgreiche Proteintransfer auf die Membran konnte nach dem Blotten mittels Ponceaufärbung überprüft werden. Dazu wurde die Membran kurz in Ponceau S-Lösung geschwenkt und überschüssige Färbelösung durch vorsichtiges Spülen mit H₂O entfernt. Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Schwenken in 4,5% (w/v) BSA/TBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) blockiert. Die Membran wurde mit dem Primärantikörper für eine Stunde in 4,5% (w/v) BSA/TBS-T bei RT inkubiert und danach dreimal für 10 Min. mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (1:10000 in TBS-T) für 30-60 Min. bei RT inkubiert und erneut dreimal

mit TBS-T und einmal mit TBS für jeweils 10 Min. gewaschen. Die Detektion Fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper erfolgte mit dem Odyssey®Infrarot-Scanner (LI-COR).

Die Detektion HRP-konjugierter Sekundärantikörper erfolgte wie unter 2.3.11 angegeben.

Transferpuffer:

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

Ponceau S-Lösung:

2% (v/v) Essigsäure, 0,2% (w/v) Ponceau S

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

2.4.12 GST-Pulldown-Analyse

Zur Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen wurden gereinigte GST-Fusionsproteine aus *E. coli* über den GST-Tag an einer Glutathion-Sepharose-Matrix (GE Healthcare) immobilisiert und mit Zell-Lysat oder aufgereinigtem Protein inkubiert. Pro Ansatz wurden 25 µl GSH-Matrix zuerst dreimal mit PBS gewaschen und pro ml Bettvolumen mit 5 mg GST, bzw. 6 mg GST-Fusionsprotein (MW ca. 35 kDa) beladen. Die Matrix wurde mit dem GST-Fusionsprotein 30 Min. bei 4 °C rotierend inkubiert. Ungebundenes Protein wurde durch dreimaliges Waschen mit je 1 ml PBS entfernt. Die Matrix wurde dafür jeweils 5 Min. bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Inkubation der Matrix mit Lysat oder Protein erfolgte rotierend über Nacht bei 4 °C. Die Konzentrationen der Lysate und Proteinlösungen lagen bei ca. 0,5-3 mg/ml und wurden in einem Volumen von 0,5-1,5 ml eingesetzt. Durch erneutes Waschen wurden nicht bindende Proteine entfernt. Nach dem dritten Waschschritt wurde der Waschpuffer vollständig entfernt und die Matrix in einem geeigneten Volumen (25 – 50 µl) an 2x SDS-Probenpuffer für 5 Min. bei 95 °C aufgeköcht. Die Matrix wurde durch Zentrifugation (5 Min., 16.000 x g) pelletiert und der Überstand auf ein SDS-Gel geladen. Die Analyse gebundener Interaktionspartner aus Zell-Lysaten erfolgte mittels Western Blot oder Massenspektrometrie. Eine Interaktion zwischen exprimierten und aufgereinigten Proteinen konnte auch über eine SDS-PAGE analysiert werden, ohne darauffolgende Western Blot Analyse.

2.4.13 PIP-Strip-Analyse

Für die Untersuchung von Protein-Lipid-Interaktionen sollte eine PIP-Strip-Analyse durchgeführt werden. Dabei handelt es sich um einen Inkubationstest des zu untersuchenden GST-fusionierten Proteins mit einer hydrophoben Membran (PIP-Strip, Echelon) auf der Phospholipide immobilisiert waren. Nach kurzem Waschen der Membran mit TBS (10 Min.,

RT) wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation für eine Stunde bei RT mit Blockierlösung (TBS mit 3% (w/v) fettsäurefreiem BSA und 0,1% (w/v) Tween-20) blockiert. Das zu untersuchende Protein wurde dann über Nacht bei 4 °C in einer Konzentration von 10 µg/ml in Blockierlösung schwenkend mit der Membran inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit TBS-T für jeweils 10 Min. wurde gebundenes Protein über das GST mithilfe eines anti-GST Antikörpers detektiert. Inkubation mit dem Primärantikörper anti-GST (1:1000 in Blockierlösung) erfolgte für zwei Stunden bei RT. Erneut wurden die Membranen viermal gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper anti-*rabbit* HRP-konjugiert in TBS-T (0,1% (w/v) Tween-20) für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für jeweils 10 Min. und einem finalen Waschschriff mit TBS erfolgte die Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers. Die Detektion über Chemilumineszenz erfolgte am ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad), nach Inkubation mit dem „super Signal Western Pico Kit“ (Pierce).

Um eine über GST vermittelte Bindung zu identifizieren, wurde parallel als Kontrolle eine Membran mit GST inkubiert.

2.4.14 Phagen-Display

Die Methode des Phagen-Display wurde angewandt, um zu untersuchen, ob die C-terminale Domäne von Smy2 bestimmte Peptidsequenzen mit einer Länge von 9 Aminosäuren bindet. Die zu untersuchende Proteindomäne wurde als GST-Fusionsprotein eingesetzt und an Glutathion-Sepharose immobilisiert. Potentielle Peptidbindungssequenzen wurden über Phagen, die verschiedene rekombinante Peptide auf ihrer Oberfläche präsentieren, untersucht. Dies wurde durch die Klonierung einer randomisierten Nonapeptid-(X₉)-Bibliothek in die Kodierungssequenz des pVIII-Capsidproteins des Phagemid Vektors pC89 erreicht^[91].

Es sollte untersucht werden, ob es innerhalb von zwei bis drei Selektionsrunden gebundener Phagen (*Panning*) zu einer Anreicherung spezifisch bindender Phagen für die C-terminale Domäne von Smy2 (bezeichnet als Smy2-C631) kommt. Um diese spezifische Anreicherung zur erfassen, wurde in einem Kontrollexperiment die unspezifische Bindung an GST untersucht.

Der Ablauf der einzelnen experimentellen Schritte ist in den folgenden Unterpunkten angegeben.

1. Panning

Die Glutathion-Sepharose™ 4B-Matrix wurde pro ml Bettvolumen mit 8,3 mg des 44,6 kDa schweren GST-His-TEV-SMY2-Protein C631 wurden 8,3 mg pro ml Matrix zum Beladen dieser eingesetzt. Die spezifische Anreicherung wurde durch einen parallelen GST-Kontrollansatz überprüft. Zur Beladung der Matrix mit dem wesentlich kleinerem GST-Protein (~27 kDa) wurden 5mg pro ml Matrix eingesetzt. Pro Versuchsansatz wurden 25µl Glutathion-Sepharose eingesetzt. Die Matrices wurden für 30 Min. rotierend bei 4 °C mit den Proteinen inkubiert, nicht gebundenes Protein anschließend durch sechsmaliges Waschen mit je 1 ml PBS-T (0,1% (v/v) Tween 20) und einem finalen Waschschrift mit PBS entfernt. Alle Zentrifugationsschritte beim Waschen wurden bei RT für 5-10 Sek. und 800 x g durchgeführt. In dem sogenannten „Panning“ wurden 500 µl der Peptidpräsentierenden Phagensuspension (2·10¹² cfu/ml in PBS-T mit 5 mg/ml BSA) mit den immobilisierten Proteinen inkubiert und die nicht gebundenen Phagen nach Rotation für eine Stunde bei RT und 5 rpm durch drei kurze und einen längeren Waschschrift mit PBS für eine Stunde bei RT entfernt. Diese Abfolge wurde ein weiteres Mal wiederholt und mit zwei weiteren kurzen PBS-T Waschschriften und einem finalen PBS-Schritt beendet.

2. Elution und Titerbestimmung

Spezifisch gebundene Phagen wurden dagegen über einen pH-Schritt mit 500 µl einer 0,1 M Glycinlösung (pH 2,2) durch Inkubation für 15 Min. bei RT von den Proteinen eluiert. Nach Zentrifugation wurden der phagenhaltige Überstand abgenommen und mit 29 µl einer 2 M Trislösung neutralisiert. Für die Titerbestimmung wurden 5 µl der Phagensuspension verwendet und die restlichen Phagen bis zur weiteren Verwendung mit 15% (v/v) Glycerin versetzt und bei -20 °C gelagert.

Die eluierten Phagen wurden für die Infektion des *E. coli*-Stamms XL1 Blue verwendet, da dieser auf seiner Oberfläche F-Pili trägt, die der M13-Phage für die Infektion des bakteriellen Wirtes nutzen kann.

Ziel war es zum einen, den Phagentiter zu bestimmen, zum anderen sollten die gebundenen Phagen amplifiziert werden. Für die Titerbestimmung wurde eine *E. coli* XL1 Blue-Kultur in 2x YT-Medium mit 15 µg/ml Tetracyclin bis zu einer OD₆₀₀ (Optische Dichte bei 600 nm) von 0,5 wachsen gelassen. Von den Phagensuspensionen wurden Verdünnungen (1:10-1 bis 10-3) in 2x YT-Medium angesetzt und 45 µl der Phagenverdünnungen mit 50 µl der *E. coli* Kultur gemischt, 10 Min. bei 37 °C inkubiert und anschließend auf Selektionsagarplatten mit

Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Anzahl der Kolonien am folgenden Tag bestimmt.

3. Amplifikation der Phagen

Für die Amplifikation der Phagen wurde eine 20 ml XL1 Blue-Kultur in 2x YT-Medium (supplementiert mit 15 µg/µl Tetracyclin) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 wachsen gelassen. Die Infektion dieser Kultur erfolgte durch Zugabe von 250 µl der von dem GST-His-TEV-Smy2-C631 eluierten Phagensuspension und ruhender Inkubation für 30 Min. bei 37 °C. Anschließend erfolgte eine schüttelnde Inkubation bei 100 rpm und 37 °C für 30 Min. Nach Zugabe von 80 ml frischen 2x YT Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wurde die Kultur für 3-4 Stunden bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die OD₆₀₀ sollte danach etwa 0,2 betragen.

Das Phagemid des M13-Phagen kodiert für die rekombinante Version des Phagencapsidproteins und trägt zudem die Information für die Verpackung der DNA in Phagenpartikel. Da der M13-Phage den Wirt nicht jedoch nicht lysiert, wurde die Bildung der Phagenpartikel nach der Infektion der Phagemid-enthaltenden *E. coli*-Kultur durch die Helferphagen VCSM13 (Stratagene) induziert. Dazu wurde zu der infizierten XL1 Blue Kultur 20 ml 2x YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin gegeben sowie 150 µl einer Helferphagensuspension. Diese Kultur wurde wiederum ruhend für 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden erneut 80 ml 2x YT Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Kanamycin hinzu gegeben und die Kultur über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt.

Die amplifizierten Phagen wurden von den Bakterien durch Zentrifugation für 15 Min. bei 4 °C und 18.000 x g getrennt. Der phagenhaltige Überstand wurde zur Fällung der Phagen mit 40 ml einer 20% (v/v) PEG/2,5 M NaCl-Lösung für eine Stunde auf Eis inkubiert und die Phagen durch Zentrifugation für 15 Min. bei 4 °C und 18.000 x g pelletiert und das Sediment wurde in 1 ml PBS resuspendiert. Restliche Bakterien wurden durch erneute Zentrifugation für 10 Min. bei RT und 16.000 x g pelletiert. Pro ml Überstand wurden 150 µl der 20% (v/v) PEG/2,5 M NaCl-Lösung zugesetzt, und dieser Ansatz 20 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 10 Min. bei RT und 16.000 x g. Der phagenhaltige Überstand wurde abgenommen, der Titer bestimmt und für eine erneute *Panning*-Runde eingesetzt.

Wiederholtes *Panning*, bestehend aus Selektion durch Bindungsvermögen und anschließender Amplifikation der gebundenen Phagen sollte in einer spezifischen Anreicherung der Phagen resultieren. Im Erfolgsfall wurde die Peptidsequenz mittels Sequenzierung bestimmt.

2.4.15 Tryptischer Verdau von Proteinen im SDS-Gel

Die über eine diskontinuierliche SDS-PAGE (4 – 20%, Invitrogen) aufgetrennten Proteinbanden wurden nach Coomassie-Färbung aus dem Gel mit einem Skalpell herausgeschnitten und im Gel durch die Endoprotease Trypsin, die Peptidbindungen carboxyterminal von Arginin- und Lysinresten spaltet, verdaut.

Dazu wurden zunächst die ausgeschnittenen Gelbanden durch zweimaliges Waschen mit Wasser, einmal mit 50% (v/v) Acetonitril in 25 mM Ammoniumbicarbonatlösung und einmal mit 50 mM Ammoniumbicarbonatlösung entfärbt. Alle Waschschritte wurden für 10 Min. bei 300 rpm und 30 °C ausgeführt. Nach anschließender Dehydrierung mit Acetonitril wurden die Gelstücke in einer Vakuumzentrifuge (Thermo-Servant SPD 1010 SpeedVac System) vollständig getrocknet. Der enzymatische Verdau erfolgte durch Rehydratisierung der Gelstücke mit 50 ng Trypsin (*sequencing grade modified*, Promega Corporation) in 10 µl einer 50 mM Ammoniumbicarbonatlösung und Inkubation für 17-20 Stunden bei 37 °C. Durch Zugabe von 10 µl 0,5% TFA (v/v) in Acetonitril wurde die Reaktion gestoppt. Nach 5-minütiger Ultraschallbehandlung wurde der Überstand in ein MS-Probengefäß überführt und in einer Vakuumzentrifuge (Integrated SpeedVac System ISS 100) getrocknet. Die Proben wurden in 6 µl 0,1% (v/v) TFA in Wasser: ACN (95:5) aufgenommen und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

2.4.16 ¹⁸O-Markierung von Peptiden

Die ¹⁸O-Markierung der Peptide erfolgte während der enzymatischen Spaltung der Proteine durch Trypsin über den Einbau von ¹⁸O-Atomen in die Carboxylgruppe der Peptide^[114]. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Unabhängigkeit der Verwendung der Zellkultur. Somit konnten primäre murine Organlysate für die Interaktionsstudie der CD2BP2-GYF-Domäne verwendet werden.

Die zu vergleichenden Proben wurden parallel mit Organlysaten inkubiert und in separaten Gelbahnen aufgetrennt. Die Vorbereitung der Gelbanden für den tryptischen Verdau wurde wie in Abschnitt 2.3.13 beschrieben durchgeführt. Der tryptische Verdau für der zu vergleichenden Experimente erfolgte in Anwesenheit von H₂¹⁸O (97% (w/v) ¹⁸O; Campro Scientific GmbH, Berlin) bzw. H₂¹⁶O. Der Einbau zweier ¹⁸O-Atome resultierte in einer Massendifferenz von 4 Da zwischen markierten und unmarkierten Peptiden.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Kultivierung eukaryoter Zelllinien

HeLa S3-Zellen wurden in DMEM Medium (Biochrom) mit 10% (v/v) FCS bei 37 °C in einer 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert und alle 2-3 Tage nach Bedarf passagiert. Für die Passage dieser adhärenen Zelllinie wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen einmal mit PBS gespült und für 5 Min. bei 37 °C je nach Größe der Kulturschalen mit 1-3 ml einer 0.25% (w/v) Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit 10 ml frischem Kulturmedium versetzt und in einer neuen Kulturflasche eine geeignete Zellverdünnung (1:4 bis 1:10) mit neuem Medium angesetzt.

2.5.2 Transiente Transfektion von HeLa S3-Zellen

Die Transfektion von HeLa S3-Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte mit den Transfektionsreagenzien Fugene HD und Fugene 6 (Roche) gemäß den Herstellerangaben. Die für die Transfektion verwendete Plasmid-DNA wurde wie in 2.2.1.9 angegeben präpariert. Transfizierte Zellen wurden für Immunopräzipitationen und für konfokale Lasermikroskopie eingesetzt.

2.5.3 Gewinnung von Lysat aus eukaryotischen Zellen

Der Aufschluss von HeLa-Zellen erfolgte durch 30-minütige Inkubation der Zellen in Solubilisierungspuffer auf Eis. Zelldebris wurde durch anschließende Zentrifugation für 20 Min. bei 4 °C und 16.000 x g in einer Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde für folgende Experimente weiterverwendet und die Proteinkonzentration mittels Bradfordtest (2.2.3.8) bestimmt.

Für die Lyse von Hefezellen wurden diese im gleichen Volumen Hefelyse-Puffer aufgenommen, mit dem halben Volumen an Glas-Kügelchen (Durchmesser 425-600 µm) versetzt und 5x für 1 Min. gevortext. Die Glasperlen wurden entfernt und das Zell-Lysat für 20 Min. bei 4 °C und 16.000 x g zentrifugiert. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde bestimmt und die Zell-Lysate bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Solubilisierungspuffer*:

1% NP-40, 1mM PMSF, 1mM DTT, 5mM EDTA, 1µM Pepstatin A

Hefelyse-Puffer*:

1% Triton X-100, 1mM PMSF, 5mM DTT, 1,5 µM PMSF

* Beide Puffer basierten auf PBS, es wurden jeweils 2 Tabletten *Protease Inhibitor Cocktail* (Roche) pro 15 ml Puffer verwendet.

2.5.4 Metabolische Isotopenmarkierung von HeLa-S3 Zellen

HeLa S3-Zellen wurden für SILAC-Experimente in Arginin- und Lysin-defizientem SILAC-DMEM-Medium (Invitrogen, Pierce) kultiviert. Proteine wurden dabei über 6-8 Passagen entweder „leicht“ (Zugabe von $^{12}\text{C}_6$ -Lys und $^{12}\text{C}_6^{14}\text{N}_4$ -Arg) oder schwer (Zugabe von $^{13}\text{C}_6$ -Lys und $^{13}\text{C}_6$ -Arg oder $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ -Arg) vollständig markiert. Diese Aminosäuren wurden gewählt, um im Versuchsablauf folgenden in-Gel-Trypsinverdau carboxyterminal markierte Peptide zu erhalten. Der vollständige Einbau der markierten Aminosäuren in das Proteom wurde mittels Massenspektrometrie bestimmt und durfte 90% Isotopenmarkierung nicht unterschreiten.

2.5.5 Isotopenmarkierung von Hefeproteinen

Für die Herstellung markierter Hefeprotein-Lysate für SILAC-Experimente wurde der für Lysin und Arginin auxotrophe Hefestamm YAL6B in definiertem Hefe-SILAC-Kulturmedium kultiviert. Für die Markierung der Proteine wurden die stabilen Isotope der Aminosäuren Arginin (5 mg/ml $^{13}\text{C}_6$ -Arg) und Lysin (30 mg/ml $^{13}\text{C}_6$ -Lys) eingesetzt. Für den SILAC-Versuchsansatz wurde parallel eine Kultur mit den unmarkierten Aminosäuren angesetzt.

Es wurden zwei Hefe-Kulturen zu je 1 Liter in SILAC-Kulturmedium mit einem kleinen Volumen einer stationären YAL6B-Kultur in YPD-Medium inokuliert (1:6000). Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 30 °C und 180 rpm kultiviert und durch Zentrifugation für 20 Min. bei 5000 x g und 4 °C geerntet. Das Zellsediment wurde einmal in eiskaltem H₂O resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Hefelysate wurden wie in 2.3.7.2 angegeben hergestellt, deren Proteinkonzentration bestimmt und die Lysate mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Hefe-SILAC-Kulturmedium:

6,7 g/l YNB, 200 mg/l Adenin, 10 mg/l Histidin, 60 mg/l Leucin, 10 mg/l Methionin, 60 mg/l Phenylalanin, 40 mg/l Tryptophan, 200 mg/l Tyrosin, 20 mg/l Uracil, 5 mg/l Arginin (^{12}C oder ^{13}C), 30 mg/l Lysin (^{12}C oder ^{13}C), 20 g/l Glucose*, pH 5,8

* Separat autoklaviert.

2.5.6 Konfokale Lasermikroskopie

Für die Mikroskopie an lebenden Zellen wurden HeLa S3-Zellen auf mit Poly-Ornithin beschichteten Deckgläsern ($\varnothing=30$ mm) ausgesät und mit pEGFP- oder pcDNA-CFP Konstrukten transfiziert. Die Transfektion erfolgte wie in 2.4.2 angegeben. Für die Mikroskopie wurde das Medium entfernt, die Deckgläser in einer Küvette eingespannt und die Zellen mit PBS (ohne Mg und ohne Ca) bedeckt. Zum Anfärben endogener Proteine wurden 1×10^4 HeLa S3-Zellen auf Polyornithin-beschichteten Deckgläschen ausgesät und mit 4% (w/v) Paraformaldehyd fixiert. Nach Permeabilisierung der Zellen mit Methanol (-20 °C) und dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit den Primär- und den Sekundärantikörpern in 0,2% (w/v) Fischgelatine/PBS. Gefärbte Zellen wurden in Mowiol (Roth) eingedeckt.

Die Zellen wurden an dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop LSM 510 Meta (Carl Zeiss) mit einem 100x/1.3-Objektiv betrachtet. Die Anregung von YFP, CFP und Cy2 erfolgte mit einem Argon-Laser bei Wellenlängen von 514 nm (für YFP), 458 nm (für CFP) und 488 nm (für Cy2). Cy3 wurde mit Helium-Neon-Laser bei einer Wellenlänge von 543 nm angeregt. Die Bildbearbeitung wurde mit dem Zeiss LSM Image Browser durchgeführt.

2.6 Biophysikalische Methoden

2.6.1 Massenspektrometrische Proteinanalytik

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine äußerst sensitive und sehr präzise Untersuchungsmethode zur Bestimmung der Masse von freien gasförmigen Molekülen im Hochvakuum. Der prinzipielle Ablauf einer Massenanalyse umfasst die Ionisierung der neutralen Analytmoleküle, die anschließende Trennung der Ionen im Massenanalysator nach ihrem Masse/Ladungs-(m/z)-Verhältnis und der schließlichen Identifizierung der Ionen im Detektor. Die Entwicklung schonender Ionisierungsmethoden machte die Massenspektrometrie zu einer der wichtigsten Methoden in der Proteinanalytik. Schonende Ionisierungsmethoden sind u.a. die Elektrospray Ionisierung (ESI) und die Matrix-unterstützte-Laserdesorption/ionisation (MALDI), die sich dadurch auszeichnen, dass sie keine überschüssige Energie auf das Analytmolekül übertragen und dadurch kaum Fragmentierung auftritt. Daher eignen sich diese Methoden insbesondere für die Analyse großer Moleküle und somit sehr gut für die Peptid- und Proteinanalytik. Die Ionisierung der Proben in den durchgeführten Experimenten erfolgte mittels ESI, bei der die Ionisierung durch Versprühen der Proteinlösung in ein starkes elektrisches Feld erfolgt. Die Identifizierung einzelner Proteine kann bereits durch

proteolytische Spaltung und die Analyse der entstandenen Peptide erfolgen (Peptidmassen-Fingerabdruck, PMF). Die erhaltenen Peptidfragmentmassen können für eine Datenbanksuche herangezogen werden, bei der *in silico* alle Proteine der gewählten Datenbank mit derselben Protease verdaut und die theoretischen mit den gemessenen Peptidmassen verglichen werden. Aus diesem Vergleich kann das Protein eindeutig identifiziert werden. Genaue Sequenzinformationen einer ausgewählten Peptidmasse liefert die Tandem-MS-Analyse, bei der zwei Massenanalytoren miteinander gekoppelt werden. Im ersten Massenanalysator werden Molekülmassen der durch proteolytischen Verdau entstandenen Peptide gefiltert und im zweiten Massenanalysator Fragmentionmassen nach der Fragmentierung dieser Peptide bestimmt. Da so auch Peptidsequenzen bestimmt werden können, kann die MS neben der Identifizierung von Proteinen in komplexen Proteingemischen auch zur positionsgenauen Analyse von Proteinmodifikationen wie beispielsweise Phosphorylierungen und Acetylierungen genutzt werden.

2.6.2 Quantitative Proteomik

Neben qualitativen Informationen kann die MS auch zur Gewinnung quantitativer Informationen herangezogen werden. Die Voraussetzung dafür ist, dass die zu untersuchenden Proteine und die daraus resultierenden Peptide sich in ihrer Masse von denen der zu vergleichenden Probe unterscheiden und somit eindeutig zugeordnet werden können. Für die Markierung von Proteinen eignen sich Isotope, da sie sich von unmarkierten Proben lediglich um eine dem Isotop-entsprechende Massendifferenz unterscheiden, sonst jedoch physikochemisch dieselben Eigenschaften wie die natürlichen Isotope aufweisen. Diese Eigenschaft wird bei der massenspektrometrischen Analyse ausgenutzt. Die Markierung mit stabilen Isotopen kann sowohl auf Protein- als auch auf Peptidebene erfolgen, wobei man zwischen metabolischen, chemischen oder enzymkatalysierten Isotopenmarkierungsverfahren unterscheidet. Die Quantifizierung erfolgt durch den Vergleich der Ionenintensitäten von Peptidpaaren (nicht markiert und isotopenmarkiert). Daraus wird das als Anreicherungsfaktor bezeichnete Verhältnis von schwer zu leicht (oder umgekehrt) bestimmt. Um die umfangreichen MS-Datensätze auf quantitativer Ebene analysieren zu können, gibt es MS-basierte Quantifizierungsprogramme wie MSQuant^[101], MaxQuant^[100] und Mascot Distiller, die eine schnelle und automatisierte Quantifizierung komplexer MS-Datensätze ermöglichen.

2.6.3 SILAC

SILAC (*stable isotope labelling with amino acids in cell culture*) ist eine MS-basierte Methode zur *in vivo* Markierung von Proteinen. Sie erlaubt die relative Quantifizierung von Proteinen in zwei (oder drei) verschiedenen Zuständen (z.B. gesund vs. krank, Wildtyp vs. Mutante, nicht modifiziert vs. modifiziert)^[115]. Die Markierung der Proteine erfolgt durch den metabolischen Einbau von Aminosäuren, die mit stabilen Isotopen (z.B. ^2H , ^{13}C , ^{15}N) markiert sind. Der Einbau der stabilen Aminosäuren-Isotope ins Proteom erfolgt durch den natürlichen Umsatz der Zelle während der Zellkultivierung im SILAC-Medium, dem die verschiedenen Isotope zugesetzt sind. Für ein Experiment können bis zu drei Zellpopulationen parallel kultiviert werden, die sich lediglich in den zugegebenen Aminosäure-Isotopen unterscheiden. Die markierten und die natürlich vorkommenden Aminosäuren unterscheiden sich kaum in ihren chemischen Eigenschaften, daher verhalten sich die Zellpopulationen identisch. Durch den Einbau der schweren Isotope kommt es zu einer Erhöhung des Molekulargewichtes der markierten Peptide und somit zu einer Verschiebung des Signals im Massenspektrum.

2.6.4 SILAC-Pulldown/MS-Experiment

GST-Fusionsproteine der untersuchten GYF-Domänen wurden an einer Glutathion-Sepharosematrix immobilisiert (s. 2.4.12) und mit Zell-Lysaten über Nacht (ca. 20 h) bei 4 °C inkubiert. Zur Bestimmung der Proteine, die über die PRS-Bindungsstelle an die GYF-Domäne binden wurden zwei parallele *Pulldown*-Experimente durchgeführt. Die PRS-Bindungsstelle war dabei entweder zugänglich oder blockiert. Die Inhibition der PRS-Bindungsstelle erfolgte durch Zugabe an inhibitorischem Peptid mit PPG Φ -Motiv in einer Konzentration von 2 mM oder durch eingefügte Mutation. Für die Domänen vom Smy2-Typ wurde das *Pulldown*-Experiment der WT-Domäne mit ^{13}C -markierten ($^{13}\text{C}_6$ -Lys/ $^{13}\text{C}_6$ -Arg oder $^{13}\text{C}_6$ $^{15}\text{N}_4$ -Arg) SILAC-Zell-Lysaten (s. 2.5.4/5) durchgeführt. Das parallel durchgeführte Experiment mit der blockierten PRS-Bindungsstelle dagegen mit unmarkierten HeLa- oder Hefe-Lysaten. Nach der Inkubation mit den Lysaten wurden unspezifisch gebundene Proteine durch dreimaliges Waschen mit je 1 ml PBS entfernt und die Ansätze vereint. Die interagierenden Proteine wurden durch Aufkochen in SDS-Probenpuffer von dem GST-Fusionsprotein gelöst und über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden aus dem Gel herausgeschnitten, tryptisch verdaut (s. 2.4.15) und schließlich massenspektrometrisch analysiert (Abbildung 2.1).

Alternativ zur Verwendung von SILAC-Zell-Lysaten erfolgte die für die Isotopenmarkierung der Peptide beim tryptischen Verdau in ^{18}O -Wasser (s. 2.4.16). Die GST-fusionierte und immobilisierte GYF-Domäne von CD2BP2 wurde mit unmarkiertem murinem Milzlysate inkubiert, wobei die sich zu vergleichenden Experimente ebenfalls durch eine zugängliche und eine blockierte PRS-Bindungsstelle auszeichneten. Die Inhibition der Bindungsstelle erfolgte hierbei durch Mutation. Die an die GYF-Domäne gebundenen Proteine beider Ansätze wurden in separaten Gelbahnen aufgetrennt. Als zu vergleichende Proben wurden die Banden, die in beiden Gelbahnen auf gleicher Höhe liefen, ausgewählt. Der tryptische Verdau der Proteine des einen *Pulldown* erfolgte dann in schwerem Wasser (H_2O^{18}), wohingegen der des zu vergleichenden *Pulldown* in normalem Wasser erfolgte. Anschließend wurden die Proben vereint und massenspektrometrisch vermessen.

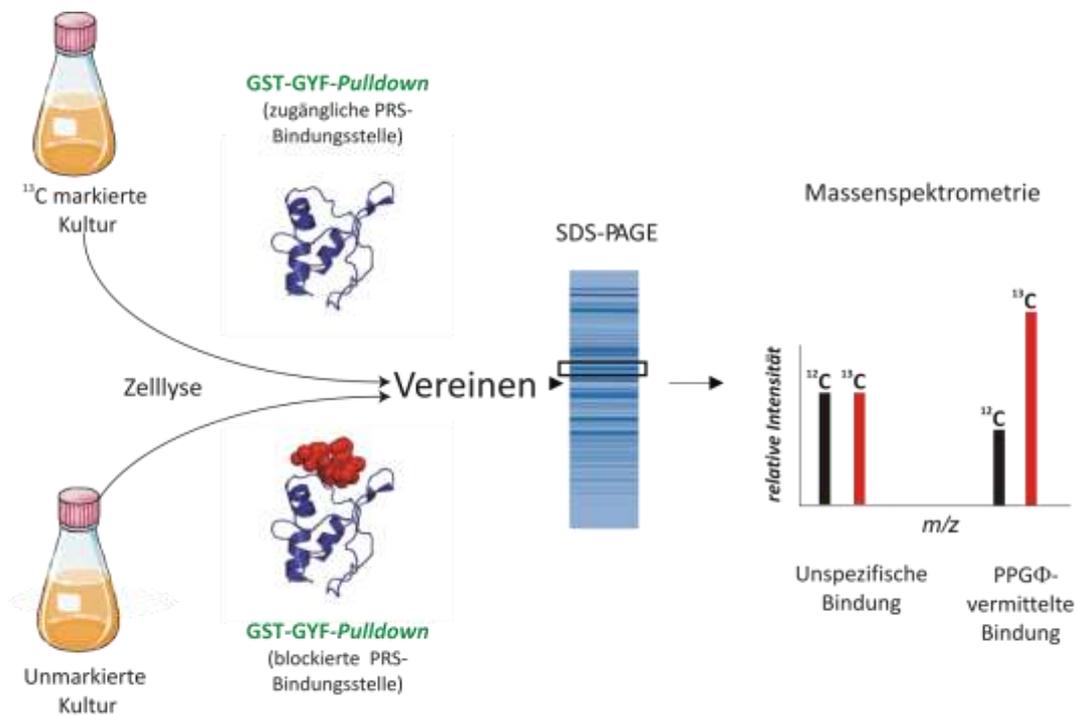


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines SILAC-Affinitäts-Experimentes. In separaten *Pulldown*-Experimenten wurden die WT-GYF-Domäne mit ^{13}C -markiertem Zell-Lysat und die GYF-Domäne mit inhibierter PRS-Bindungsstelle mit unmarkiertem Zell-Lysat inkubiert. Nach dem Vereinen der Ansätze wurden die gebundenen Proteine eluiert, über eine SDS-PAGE aufgetrennt und tryptisch verdaut. Aus der massenspektrometrischen Bestimmung der relativen Häufigkeiten der Peptide wurden spezifische Bindungspartner der PRS-Bindungsstelle bestimmt.

2.6.5 Quantifizierung und Datenauswertung

Die LC-gekoppelten MS-Messungen wurden von Dr. Michael Schümann (AG E. Krause, FMP) entweder an einem ESI-Quadrupole-TOF-MS (Q-Tof Ultima API (Micromass)), in Kombination mit einer CapLC-Anlage (Waters) oder an einem LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher) in Kombination mit einer Eksigent NanoLC-Ultra Anlage (Axel Semrau GmbH, Dreieich) durchgeführt. Der Unterschied beider Geräte besteht in ihrem Auflösungsvermögen und dem Zeitaufwand für eine Messung. Messungen am Orbitrap ergaben für komplexe Peptidgemische umfangreichere Datensätze und mit einer deutlich größeren Anzahl identifizierter Proteine.

Die Proteinidentifizierung erfolgte durch Datenbanksuche gegen die Swissprot-Datenbank mit dem Mascot Daemon Programm. Die Quantifizierung der Peakintensitäten der zu vergleichenden Peptide der SILAC-Experimente erfolgte mit der MS Quant- oder der MaxQuant-Software. Für ein identifiziertes Protein mussten mindestens zwei Peptide quantifiziert werden, um den Anreicherungsfaktor zu bestimmen. Peptide der ¹⁸O-Versuche wurden mit dem Mascot Distiller quantifiziert.

Für Proteine, die mit MsQuant-Software oder dem Mascot Distiller quantifiziert wurden, mussten manuell die Quantifizierungsergebnisse ausgewählt werden, die auf den meisten Peptiden basierten. Die manuelle Auswahl war durch die Quantifizierungssoftware bedingt, da die Quantifizierungsergebnisse der einzelnen Gelbanden nicht zusammengefasst wurden und ein Protein oftmals in mehreren Gelbanden zu finden war. Darüber hinaus wurden auch Proteine, deren Quantifizierungsergebnis lediglich auf einem einzigen Peptid beruhte, manuell überprüft. Peptide mit Fehlpaltstelle und/oder einer Oxidation wurden nicht berücksichtigt. Somit konnten noch einzelne Proteine für die Versuchsauswertung herangezogen werden.

Die Experimente für die untersuchte GYF-Domäne wurden mindestens zweimal durchgeführt. Für die Auswertung wurden die Proteine herangezogen, die in beiden Experimenten bei einem Mischverhältnis von 1:1 mit einem minimalen Anreicherungsfaktor von 2 (für die WT-GYF-Domäne) bestimmt wurden. Der minimale Anreicherungsfaktor von 2 wurde dabei gewählt, da durch die späte Zusammenführung der Proben die Wahrscheinlichkeit für eingefügte Verschiebungen des Mischverhältnisses zu erwarten war. Für die identifizierten Proteine wurden PPGΦ-Motivsuchen mit der ScanProsite-Software (<http://prosite.expasy.org/scanprosite>)^[102, 103] durchgeführt und die zelluläre Lokalisation nach den Einträgen in der Uniprot-Datenbank (<http://www.uniprot.org/>)^[107] zugeordnet. Mithilfe der STRING-Datenbank (<http://string-db.org/>)^[104] wurden unter den identifizierten Proteinen

bereits beschriebene Interaktionen ermittelt. Aus all diesen Bewertungskriterien wurde schließlich das potentielle Interaktom der Domänen definiert.

2.6.6 NMR-Spektroskopie

Untersuchungen an Proteinen auf atomarer Ebene können mittels NMR-Spektroskopie durchgeführt werden. Verschiedene Aufnahmetechniken liefern Informationen über die Faltung des Proteins (1D) oder werden für Interaktionsstudien und zur Bestimmung von Bindungskonstanten (2D), sowie der Strukturaufklärung (3D) der untersuchten Proteine genutzt.

Die Voraussetzung für die NMR ist, dass die zu untersuchenden Atomkerne eine Kernspinquantenzahl besitzen, die ungleich Null ist. Die einfachste Messung ist die Aufnahme eines NMR-Spektrums auf der Basis des natürlich vorkommenden ^1H , dessen Kernspin $\frac{1}{2}$ beträgt. Für NMR-spektroskopische Proteinuntersuchungen werden neben ^1H -Atomen auch N- und C-Atome genutzt. Im Gegensatz zu ^1H besitzt das natürlich vorkommende ^{12}C einen Kernspin von Null und eignet sich somit nicht für die NMR-Spektroskopie. ^{14}N dessen Kernspinquantenzahl 1 ist, ist ebenfalls ungeeignet für die NMR-Untersuchung von Proteinen. Neben dem magnetischen Dipolmoment besitzt der Spin auch ein elektrisches Quadrupolmoment was dessen Auswertung erschwert. Um diese Kerne dennoch detektieren zu können, erfolgt eine metabolische Markierung der zu untersuchenden Proteine durch die Expression in definierten Minimalmedien, dabei sind entweder $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ als Stickstoffquelle oder ^{13}C -Glucose als Kohlenstoffquelle enthalten.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten NMR Messungen wurden ^{15}N -markierte Proteine in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Sofern nicht anders angegeben, basierten die Proteinlösungen auf PBS. Das Probenvolumen betrug jeweils 550 μl , wobei immer 10% D_2O in der zu messenden Probe enthalten war. Für Titrationsexperimente wurde der pH-Wert in jeder Probe kontrolliert. Die Messungen wurden an den NMR Geräten AV600 (Bruker) und AV750 (MagneX) bei 300K aufgenommen, es wurden dabei Pulsprogramme für zweidimensionale ^1H - ^{15}N -HSQC Spektren verwendet.

2.6.7 Bestimmung von Bindungskonstanten

Für die NMR-spektroskopische Bestimmung von Bindungskonstanten wurden HSQC-Spektren mit steigender Ligandenkonzentration aufgenommen. Der unmarkierte Ligand lieferte keine Signale, wodurch nur die Resonanzen des markierten Proteinrückgrats im Spektrum zu sehen waren. Eine Bindung des Liganden lässt sich an Resonanzänderungen der

an der Bindung beteiligten Aminosäuren beobachten. Für niedrigaffine Bindungen zwischen Protein und Peptid (im μM Bereich) sollten sich die Resonanzen im HSQC verschieben. Es erscheint nur ein Signal für den gebundenen Zustand, da die Austauschraten zwischen gebundenem und ungebundenem Zustand so hoch sind (*fast exchange*). Es werden daher nur Zwischenzustände von freiem Protein und Protein-Ligand Komplex detektiert.

Die chemischen Verschiebungen der ^{15}N - und ^1H -Atome nach Peptidzugabe wurden für die Berechnung der Bindungskonstante herangezogen. Es wurde der Index der Peakverschiebung nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Peakverschiebung} = \sqrt{(10 \times \Delta^1\text{H})^2 + (2 \times \Delta^{15}\text{N})^2}$$

Die Gewichtungsfaktoren der Änderung der chemischen Verschiebungen betragen 10 für ^1H und 2 für ^{15}N . Für die hyperbolische Kurvenanpassung und die Bestimmung der Bindungskonstante wurde die Microcal OriginQ Software benutzt. Die Änderungen der chemischen Verschiebungen wurden gegen die Peptidkonzentration aufgetragen, und eine 1:1 Bindung wurde angenommen.

2.6.8 NMR-Bindungsstudien mit den *small molecules*

Gekaufte Verbindungen der ChemBioNet-Bibliothek wurden in 100% DMSO aufgenommen. Die Konzentrationen dieser Stammlösungen betragen entweder 50 oder 100 mM. Zur Untersuchung der Bindung der Moleküle wurden NMR-Proben der ^{15}N -markierten GYF-Domäne von CD2BP2 in PBS mit 10% D_2O und der untersuchten Verbindung hergestellt und mittels ^{15}N -HSQC-NMR-Spektroskopie untersucht. Die maximale DMSO-Konzentration in den NMR-Proben sollte dabei 5% nicht überschreiten, da eine Verschiebung der NH-Resonanzen der GYF-Domäne bereits durch DMSO hervorgerufen wird. Die Konzentration der untersuchten Verbindungen betrug in den Proben zwischen 0,2 mM und 1,98 mM. Die zu vergleichenden NMR-Proben ohne Verbindung, enthielten gleiche Protein- und DMSO-Konzentrationen (s. 6.8, Anhang).

2.6.9 Fluoreszenztitration zur Bestimmung von Bindungskonstanten

Die Dissoziationskonstanten von Peptidliganden für die GYF-Domäne von CD2BP2 wurden auch über Fluoreszenztitration ermittelt. Für die Fluoreszenztitration konnte die intrinsische

Fluoreszenz der GYF-Domäne genutzt werden die auf den aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin basiert.

Die Titrationsexperimente erfolgten mit 3 μM Proteinlösungen der GST-fusionierten GYF-Domäne (WT oder W8R Y33A Mutante) in PBS bei 25 °C durch Zugabe steigender Konzentration des Peptids. Die Anregung der intrinsischen Fluoreszenz der GYF-Domäne erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm an einem Perkin LS-50B Fluorimeter (Perkin Elmer, Wellesley, Massachusetts, USA).

Die Zentroidverschiebungen der Emissionsspektren im Bereich von 300 – 400 nm wurden mit der SpecWin Software (zur Verfügung gestellt von Sebastian Modersohn) bestimmt. Aus der Auftragung der Zentroidverschiebung gegen die steigende Ligandenkonzentration wurden die Dissoziationskonstante wie bei der Auswertung der NMR-Titrationsdaten (s. 2.6.7) ermittelt. Hintergrundspektren der Peptidliganden wurden ebenfalls aufgenommen und von den Titrationsspektren subtrahiert. Die Fitkurve wurde aus einer Einfachbestimmung unter Annahme einer äquimolaren Bindung erstellt. Der angegebene Fehlerwert resultiert daher aus der Fitkurve.

2.6.10 Swiss-Model

Da es keine Struktur der GYF-Domäne vom GIGYF2 gibt wurde diese unter Verwendung der Swiss-Model Software (SwissModel Automatic Modelling Mode)^[105, 106] erstellt. Aus der Sequenz der GYF-Domäne (AS 531-596) und unter Angabe der zu verwendenden Kette A der Smy2-Struktur (PDB: 3FMA) wurde das Modell erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Interaktom der GYF-Domänen vom Smy2-Typ

Im Mittelpunkt der Analyse des Hefeproteins Smy2 und des humanen Proteins GIGYF2 stand die Identifizierung der durch die GYF-Domänen vermittelten Protein-Interaktionen. Mittels Affinitätsaufreinigung und massenspektrometrischer Identifizierung der an die GYF-Domänen gebundenen Proteine sollten potentielle *in vivo* Bindungspartner beider Proteine ermittelt werden. Smy2 und GIGYF2 sind zytoplasmatische Proteine^[42, 45], deren GYF-Domänen vom Smy2-Typ eine gewisse Sequenzähnlichkeit aufweisen (s. Abbildung 1.4). Ob darüber hinaus weitere Gemeinsamkeiten, beispielweise in Bezug auf das Interaktom existieren, sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

3.1.1 Peptid-vermittelte Inhibition der PRS-Bindungsstelle.

Eine Voraussetzung für die durchgeführten Affinitätsexperimente war die spezifische Inhibition der PRS-Bindungsstelle der GYF-Domänen. Die Inhibition erfolgte entweder durch Mutation der Bindungsfurche oder durch Zugabe eines Peptids mit einem Bindungsmotiv im Überschuss. Für Affinitätsexperimente der GYF-Domänen vom Smy2-Typ wurde die Peptid-vermittelte Inhibition der PRS-Bindungsstelle genutzt.

Das verwendete Peptid für die Inhibition der Smy2-GYF-Domäne enthielt eine Teilsequenz des Hefeproteins Msl5. Der inhibitorische Effekt dieses als Msl5-L1 (SIAPPPGLSGPPGFSN) bezeichneten Peptids wurde bereits gezeigt. Außerdem war die Bindungskonstante, welche im Bereich von 8 - 25 μ M liegt, bereits aus NMR- und Fluoreszenztitrationsexperimenten bekannt^[37]. Für die GYF-Domäne von GIGYF2 hingegen wurden die aus einem Phagen-Display-Experiment (durchgeführt von Dr. Michael Kofler) stammenden Peptide PD2 (HVGPPPGLVQ) und PD3 (EFFGPPGLDRP) auf Ihre Eignung zur Inhibition der PRS-Bindungsstelle untersucht.

Die Bindung der Peptide PD2 und PD3 an die GYF-Domäne von GIGYF2 wurde anhand von Fluoreszenztitrationen dokumentiert. Dazu wurden Emissionsspektren der GST-fusionierten

GIGYF2-GYF-Domäne mit steigender Peptidkonzentration im Bereich von 300 - 400 nm aufgenommen. Die Anregung der intrinsischen Fluoreszenz der GYF-Domäne erfolgte mit einer Wellenlänge von 280 nm. Die Komplexbildung zwischen der GYF-Domäne und einem Peptid führte zu einer Abschirmung der an der Bindung beteiligten Aminosäureseitenketten vom Lösungsmittel. Der mit der Komplexbildung verbundene Effekt der Verschiebung des Emissionsspektrums konnte mit Hilfe der Fluoreszenz-Emissions-Spektroskopie verfolgt werden. Über die Zentroidverschiebung in den Emissionsspektren wurde die Bildung eines 1:1 Komplexes zwischen der GYF-Domäne und den Peptiden nachgewiesen. Die Bestimmung der Bindungskonstante erfolgte durch Auftragung der resultierenden Zentroidverschiebungen gegen die steigende Peptidkonzentration (Abbildung 3.1). Unter der Annahme einer äquimolaren Bindung ergaben sich aus den Titrationskurven die Dissoziationskonstanten von $50 \mu\text{M} \pm 6 \mu\text{M}$ für PD2 und $117 \mu\text{M} \pm 15 \mu\text{M}$ für PD3.

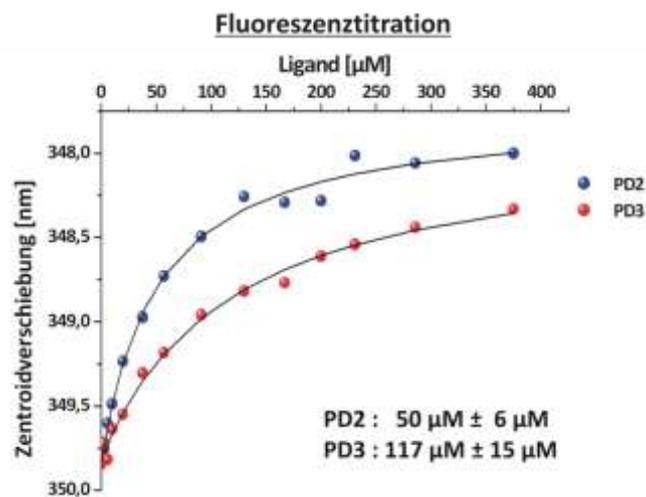


Abbildung 3.1: Fluoreszenztitrations der GIGYF2-GYF-Domäne mit den Peptiden PD2 und PD3. Zu einer $3 \mu\text{M}$ Proteinlösung der GST-fusionierten GYF-Domäne von GIGYF2 wurden über den Titrationsbereich 0-375 μM die Peptide PD2 und PD3 zugegeben. Aufgetragen sind die aus der Protein-Peptidkomplex-Bildung resultierenden Zentroidverschiebungen der Emissionsspektren gegen die steigende Peptidkonzentration. Die Bindungskurven wurden mit der Origin Software gefittet und unter der Annahme einer äquimolaren Bindung die Dissoziationskonstanten ermittelt. Die angegebenen Fehlerwerte resultierten aus den Kurvenanpassungen (Fit-Fehler).

Die Peptide PD2 und PD3, sowie das Phagen-Display-Peptid PD1 (EFGPPPGWLGR) für die CD2BP2-GYF-Domäne^[36], wurden zudem auf ihre inhibitorische Wirkung in einem *Pulldown*-Experiment mit HeLa-Lysat untersucht. Die Fähigkeit der GIGYF2-GYF-Domäne prolinreiche Sequenzen zu binden sollte anhand des Proteins SmB/B \prime analysiert werden. Eine erfolgreiche Inhibition der Domäne durch die Zugabe der Peptide sollte in fehlender

Immunodetektion von SmB/B^ε resultieren. SmB/B^ε ist kein bestätigter *in vivo* Bindungspartner für die GIGYF2-GYF-Domäne. Für das Experiment konnte es aufgrund seiner fünf PPGM-Bindungsmotive für die GYF-Domäne dennoch genutzt werden. Der Western Blot in Abbildung 3.2 demonstriert, dass SmB/B^ε und die Domäne miteinander interagierten (Spur 5) und eine Zugabe jedes der drei Peptide (Spuren 1-3) in einer Konzentration von 2 mM im Zell-Lysat die Interaktion verhinderte. Eine unspezifische Bindung von SmB/B^ε an die Glutathion-Sepharose (Spur 4), sowie eine unspezifische Reaktion des Antikörpers mit der immobilisierten GST-fusionierten Domäne (Spur 6) war nicht zu beobachten. Auch das Peptid PD1 (EFGPPPGWLGR), welches als Ligand für die GYF-Domäne von CD2BP2 ermittelt wurde, zeigte trotz des PPGW-Motivs eine ausreichende Inhibition.

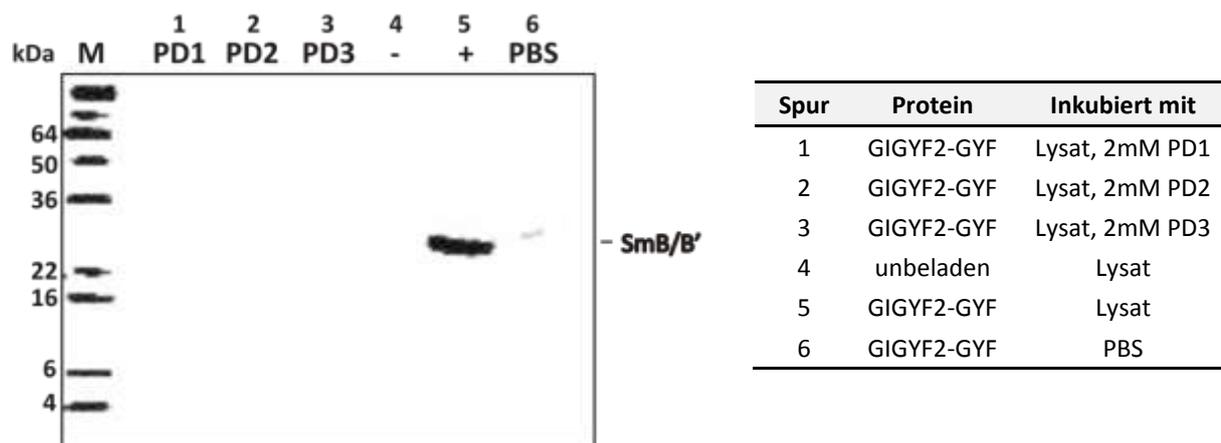


Abbildung 3.2: Inhibition der PRS-Bindungsstelle der GIGYF2-GYF-Domäne durch die Phagen-Display-Peptide PD1, PD2 und PD3. Die Western Blot Analyse mit dem gegen SmB/B^ε-gerichteten Antikörper zeigte eine Bindung von SmB/B^ε an die GIGYF2-GYF-Domäne (Spur 5). Die Interaktion wurde durch Zugabe von 2 mM Peptid inhibiert (Spuren 1-3). Eine unspezifische Bindung von SmB/B^ε an die Matrix (Spur 4) oder eine unspezifische Detektion des GST-GIGYF2-GYF durch den Antikörper (Spur 6) erfolgte nicht. Rechts: Legende der *Pulldown*-Bedingungen.

Für die folgenden Experimente wurde das stärker bindende Peptid PD2 in einer Konzentration von 2 mM eingesetzt.

3.1.2 Strategie zur Identifizierung von Bindungspartnern

Zur Bestimmung der Bindungspartner der PRS-Bindungsstelle der GYF-Domänen wurden *GST-Pulldown*-Experimente in Kombination mit der SILAC-Methode (s. 2.6.3) durchgeführt (Abbildung 3.3). Diese Strategie wurde angewandt, um die spezifisch über die PRS-

Bindungsstelle der GYF-Domänen gebundenen Proteine mittels quantitativer Massenspektrometrie zu ermitteln.

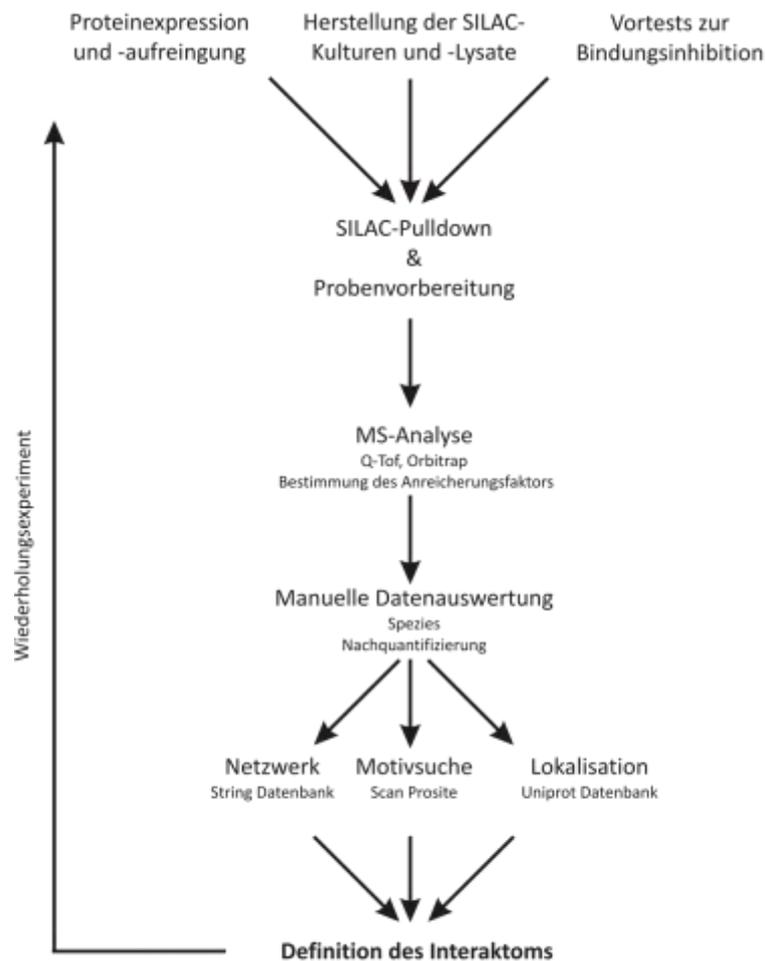


Abbildung 3.3: Allgemeiner Ablauf eines SILAC-Pulldown-Experimentes von der Proteinexpression bis zur Datenauswertung.

Zu Beginn der Versuche wurden die GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt, sowie die SILAC-Zellkulturen angelegt und aus ihnen Lysate hergestellt. Zwei parallele GST-Pulldown-Experimente wurden durchgeführt, bei denen die PRS-Bindungsstelle entweder zugänglich oder inhibiert war. Nach Durchführung der parallelen Pulldown-Experimente wurden die gebundenen Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proben für die MS-Analyse wurden anschließend durch tryptischen in-Gel-Verdau von ca. 30 Einzelbanden pro Gelspur vorbereitet. Die Messungen der Proben, durchgeführt von Dr. Michael Schümann (AG E. Krause, FMP), erfolgten am Q-Tof- und am Orbitrap-Massenspektrometer. Für die Auswertung der Q-Tof-Messungen wurde die MSQuant-

Software (Version v2.0)^[101] genutzt. Nach 2010 erfolgten die Messungen am Orbitrap und die Quantifizierung mit der MaxQuant-Software (Version 1.0.13.13)^[100].

Zur Bestimmung des Interaktoms der GYF-Domänen wurden die Proteine weiter betrachtet, die in mindestens zwei Experimenten mit 2 Peptiden identifiziert wurden und einen minimalen Anreicherungsfaktor von 2 (H/L oder L/H) besaßen. Für die Proteine wurden anschließend beschriebene Interaktionspartner (STRING-Datenbank), ihre zelluläre Lokalisation (Uniprot-Datenbank) und in ihrer Proteinsequenz enthaltene Bindungsmotive der GYF-Domänen ermittelt (ScanProsite-Software) (s. 2.6.5).

3.1.3 Das Interaktom der Smy2-GYF-Domäne

Die Untersuchung der über die PRS-Bindungsstelle vermittelten Proteininteraktion der Smy2-GYF-Domäne erfolgte in zwei SILAC-*Pulldown*-Experimenten. Dabei wurde die WT-Domäne mit zugänglicher PRS-Bindungsstelle mit der durch 2 mM Msl5-L1-Peptid (SIAPPPGLSGPPGFSN) inhibierten PRS-Bindungsstelle verglichen.

Die MS-Analyse der interagierenden Proteine der beiden SILAC-*Pulldown*-Experimente resultierte in der Identifizierung von insgesamt 124 Proteinen, die mit mindestens 2 Peptiden quantifiziert wurden (Abbildung 3.4). Die der Quantifizierungsergebnisse der 124 Proteine sind dem Anhang zu entnehmen (s. 6.3).

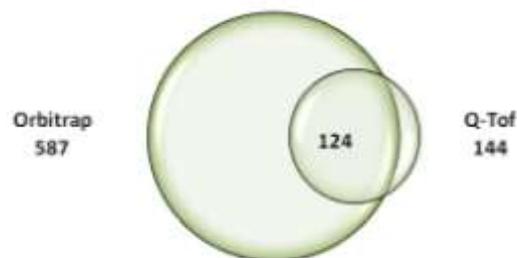


Abbildung 3.4: Venn-Diagramm der Smy2-GYF-*Pulldown*-Experimente. Die massenspektrometrische Analyse gebundener Proteine lieferte insgesamt 144 Proteine mit der Q-Tof-Messung und 587 Proteine mit der Orbitrap-Messung. Die Schnittmenge der Proteine, die in beiden Messungen mit mindestens 2 Peptiden identifiziert wurden, umfasst 124 Proteine.

Von den 124 Proteinen besaßen 13 Proteine mindestens ein PPG[ACEFGILMVWY]-Bindungsmotiv^[37] für die Smy2-GYF-Domäne. Nach Ausschluss der Proteine, die in beiden Experimenten einen Anreicherungsfaktor kleiner als Zwei besaßen, reduzierte sich die Anzahl potentieller Bindungspartner auf 44 Proteine. Zehn Proteine in der verkürzten Proteinliste besaßen ein Bindungsmotiv.

Abbildung 3.5 zeigt die Auftragung der Anreicherungsfaktoren gegen die Anzahl der quantifizierten MS-Spektren eines Proteins. Aus der Analyse der Proteinfractionen am Q-ToF (Experiment 1) und am Orbitrap (Experiment 2) resultierten deutliche Unterschiede in der Komplexität der Quantifizierungsergebnisse.

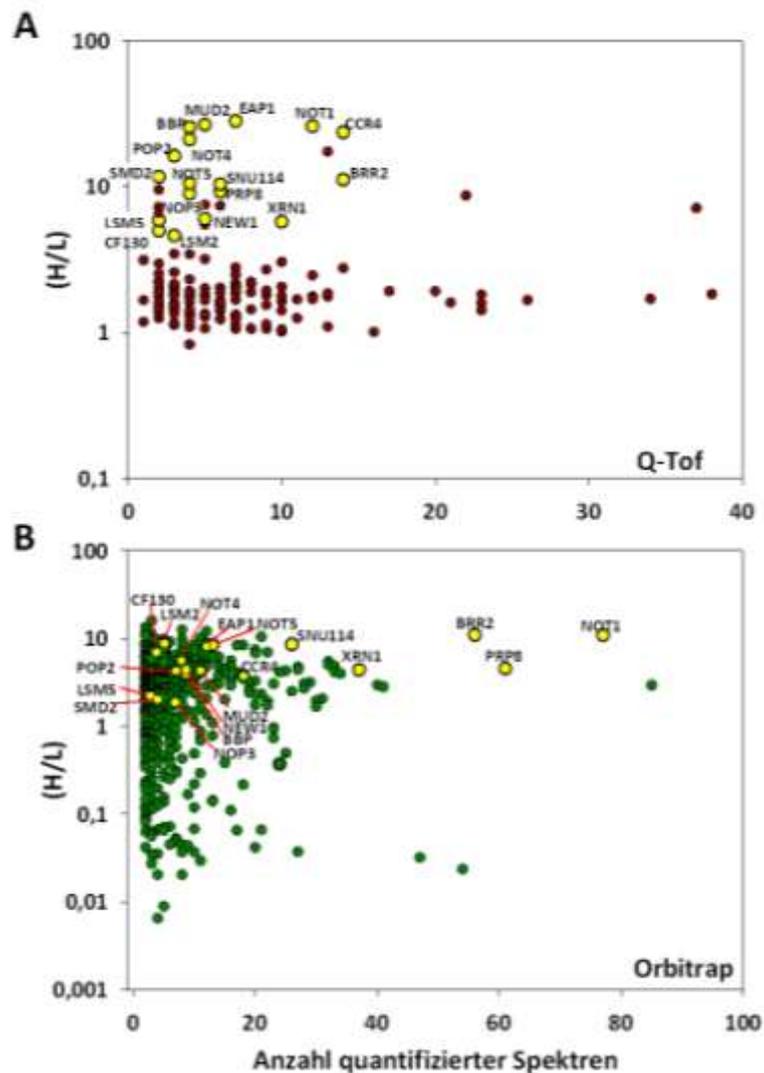


Abbildung 3.5: Streudiagramme der Smy2-GYF-Pulldown-Experimente. Aufgetragen sind die Anreicherungsfaktoren (H/L) der identifizierten Proteine gegen die Anzahl quantifizierter MS-Spektren. Die massenspektrometrische Identifizierung der Proteine erfolgte entweder am Q-ToF (A) oder am Orbitrap (B). Bindungspartner, die in beiden Experimenten übereinstimmend angereichert wurden, sind gelb hervorgehoben.

Die Anreicherungsfaktoren des ersten Experimentes (Abbildung 3.5, A) verteilten sich um den Faktor 2 was vermutlich auf einem verschobenen Mischverhältnis beruhte. Im zweiten Experiment (Abbildung 3.5, B) gab es dagegen zwei Populationen von identifizierten Bindungspartnern. Proteine, die für die WT-Domäne angereichert waren, besaßen einen Anreicherungsfaktor größer als Eins. Die zweite Population, von denen 90% der Proteine

ausschließlich im zweiten Experiment identifiziert wurden, zeichnete sich durch einen Anreicherungsfaktor kleiner als Eins aus. Es handelte sich bei den Proteinen ($H/L < 1$) somit um unspezifisch gebundene Proteine. In beiden Experimenten konnten Proteine ermittelt werden, die spezifisch über die WT-Domäne angereichert wurden (Abbildung 3.5, in Gelb hervorgehoben).

In der Proteinliste der 44 potentiellen Interaktionspartner gab es eine Reihe von Proteinen, die entweder zu einem Komplex gehörten oder in einem funktionalen Kontext zu einander standen. In Abbildung 3.6 sind die 18 Proteine aufgeführt, die nach den Ausschlusskriterien des Anreicherungsfaktors, der zellulären Lokalisation und der Verteilung der PPG Φ -Motive, die wahrscheinlichsten Interaktionspartner der Smy2-GYF-Domäne waren. Für Proteine ohne PPG Φ -Motiv, die hier als sekundäre Bindungspartner deklariert wurden, gibt es beschriebene Interaktionen mit den direkten Bindern (BioGrid-Datenbank).

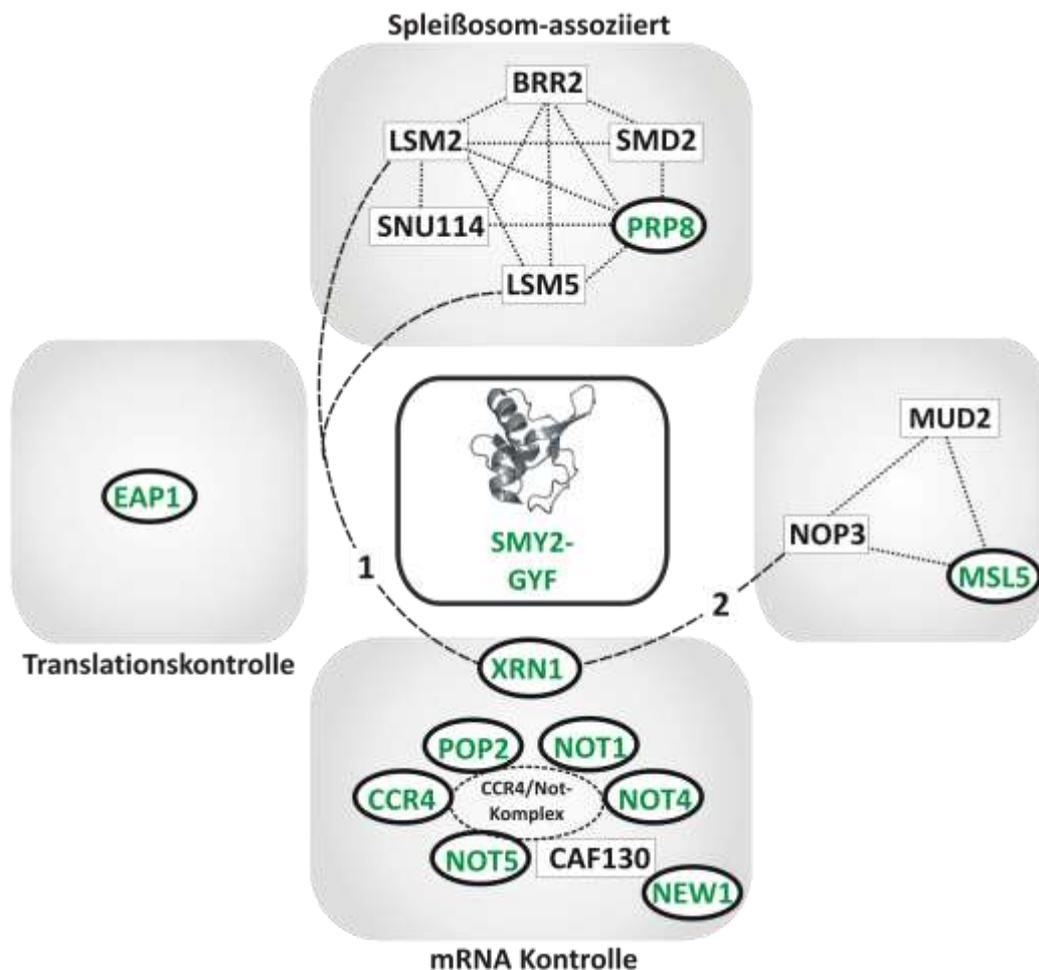


Abbildung 3.6: Interaktom der Smy2-GYF-Domäne. Dargestellt sind die 18 Proteine, die als wahrscheinlichste Interaktionspartner der Smy2-GYF-Domäne anzusehen sind. Proteine, die ein Bindungsmotiv für die Domäne besitzen sind grün markiert. Angereicherte Proteine ohne Bindungsmotiv sind beschriebene Interaktionspartner (BioGrid-Datenbank) von Proteinen, die ein Motiv besitzen. (1) ^[75,116-118] (2) ^[119-121]

Die 18 Proteine, die an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt sind umfassen Komponenten des CCR4-Not-Komplexes (Caf130, Ccr4, Pop2, Not1, Not4 und Not5), das Protein New1, die Exonuklease Xrn1, den Translationsinhibitor Eap1 sowie Proteine die an spleißosomalen Prozessen beteiligt sind (Lsm2, Lsm5, Brr2, Mud2, Msl5, Prp8, Nop3, Smd2 und Snu114).

Die hier als spezifische Interaktionspartner deklarierten Proteine der PRS-Bindungsstelle der Smy2-GYF-Domäne sind an mRNA-Prozessierungsprozessen wie dem Spleißen, der Degradation und der Translationskontrolle von mRNA beteiligt.

3.1.4 Das Interaktom der GIGYF2-GYF-Domäne

Für die Ermittlung von Interaktionspartnern der GYF-Domäne des humanen GIGYF2 wurden drei Experimente durchgeführt. In den Experimenten wurde jeweils die WT-Domäne gegen die mit 2 mM PD2-Peptid (HVGPPPGLEVQ) inhibierte GYF-Domäne verglichen. Der erste Versuch (Experiment 1) wurde mit Gesamtzell-Lysat aus HeLa-Zellen durchgeführt. Aufgrund der zytoplasmatischen Lokalisation von GIGYF2 und der vielen identifizierten Kernproteine (etwa 50% aller identifizierten Proteine) wurde der SILAC-*Pulldown* mit der zytoplasmatischen Fraktion von HeLa-Zellen wiederholt (Experiment 2). Das Mischungsverhältnis in Experiment 2 betrug 1:2 an spezifischen zu unspezifischen Bindungspartnern, um spezifisch gebundene Proteine eindeutiger zu identifizieren

Die Identifizierung der Bindungspartner erfolgte für beide Versuche am Q-Tof-Massenspektrometer. Im dritten Experiment wurde ebenfalls die zytoplasmatische Fraktion von HeLa-Zellen eingesetzt (Mischungsverhältnis von 1:1) und die Messung der Proben wurde am Orbitrap-Massenspektrometer durchgeführt.

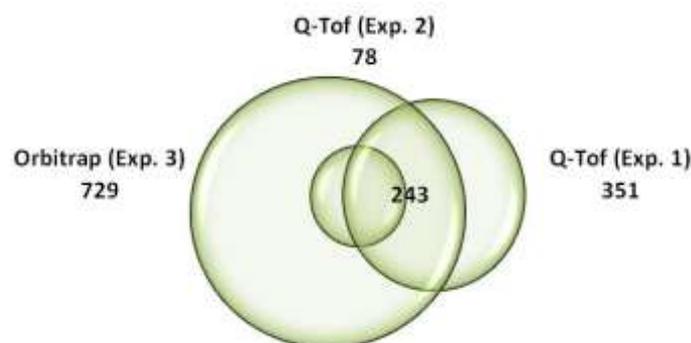


Abbildung 3.7: Venn-Diagramm der GIGYF2-GYF-Pulldown-Experimente. Die massenspektrometrische Analyse am Q-Tof-Spektrometer lieferte für das Experiment 1 (Gesamtzell-Lysat) 351 identifizierte Proteine und für das Experiment 2 (zytoplasmatische Fraktion) 78 identifizierte Proteine. Die Messung des Experimentes 3 mit der zytoplasmatischen Fraktion am Orbitrap-Spektrometer resultierte in der Identifizierung von 729 Proteinen. Insgesamt wurden 243 Proteine identifiziert, die in mindestens zwei Experimenten gefunden wurden.

Aufgrund der unterschiedlichen experimentellen Parameter resultierten die drei Experimente in einer sehr unterschiedlichen Anzahl an identifizierten Proteinen (Abbildung 3.7). Das Experiment 1 mit dem Gesamtzell-Lysat lieferte 351 Proteine und das Experiment 2 mit der zytoplasmatischen Fraktion 78 Proteine. Die Messung des dritten Experimentes, durchgeführt am sensitiveren Orbitrap-Massenspektrometer, lieferte 729 identifizierte Proteine. Insgesamt wurden 243 Proteine in mindestens zwei Versuchen gefunden, von denen alle im Experiment 3 identifiziert wurden. In den Abbildungen 3.8.1/2 sind die Streudiagramme der einzelnen Experimente gezeigt.

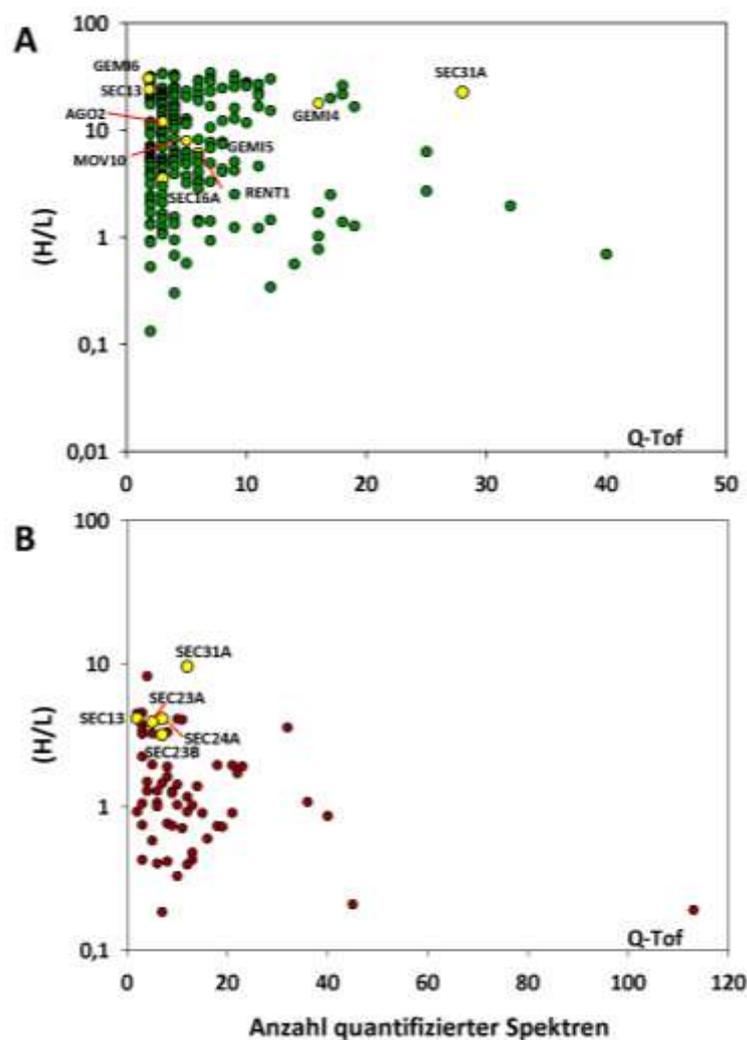


Abbildung 3.8.1: Streudiagramme der GIGYF2-GYF-Pulldown-Experimente I und II. Aufgetragen sind die Anreicherungsfaktoren (H/L) der identifizierten Proteine gegen die Anzahl quantifizierter Spektren. Die massenspektrometrische Protein-Identifizierung erfolgte am Q-Tof-Spektrometer. (A) Experimente 1 wurde mit Gesamtzell-Lysat durchgeführt. (B) Experiment 2 erfolgte mit der zytoplasmatischen Fraktion von HeLa-Zellen. Bindungspartner, die in mindestens zwei Experimenten übereinstimmend angereichert wurden, sind gelb hervorgehoben.

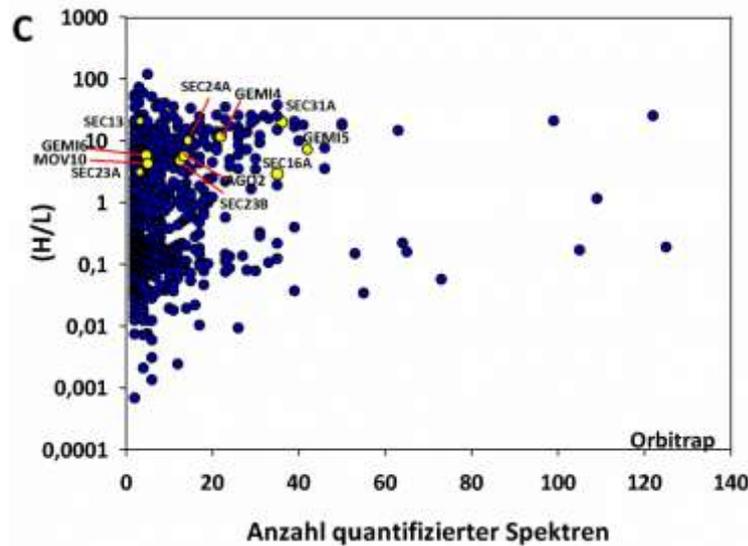


Abbildung 3.8.2: Streudiagramm des GIGYF2-GYF-Pulldown-Experimentes III. Aufgetragen sind die Anreicherungs faktoren (H/L) der identifizierten Proteine gegen die Anzahl quantifizierter Spektren. Die massenspektrometrische Protein-Identifizierung erfolgte am Orbitrap-Spektrometer. (C) Experiment 3 wurde mit der zytoplasmatischen Fraktion von HeLa-Zellen durchgeführt. Bindungspartner, die in mindestens zwei Experimenten übereinstimmend angereichert wurden, sind gelb hervorgehoben.

Für die Q-ToF-Messung des ersten Experimentes streuten die Anreicherungs faktoren im Mittel um den Wert 3. Im Experiment 2 mit der zytoplasmatischen Fraktion waren die Anreicherungs faktoren um Eins gestreut. In Experiment 3 erhielt man zwei Populationen, die um die Werte 0,1 und 10 verteilt waren. Die Proteine der zweiten Population (Anreicherungs faktoren um 10), stellten potentielle, PRS-vermittelte Binder der WT-Domäne dar. Von den Proteinen, die um den Wert 0,1 streuten, wurden ca. 85% ausschließlich im dritten Experiment identifiziert. Es handelte sich somit um unspezifisch gebundene Proteine.

Für die weitere Auswertung wurden nur die Proteine betrachtet, die in mindestens 2 Experimenten mit mindestens 2 Peptiden quantifiziert wurden. Die Anzahl potentieller Bindungspartner reduzierte sich dadurch auf 243 Proteine. Die Suche nach einem Bindungsmotiv ergab, dass 79 Proteine mindestens ein PPG[AEFHILMSTWY]-Motiv^[37] besaßen. In Abbildung 3.9 sind exemplarisch Peptidspektren eines unspezifisch und eines spezifisch an die GIGYF2-GYF-Domäne gebundenen Proteins aus Experiment 3 gezeigt: (A) Das Peptid des Proteins Tubulin (MAVTFIGNSTAIQELFK, H/L: 1,4) als Beispiel eines unspezifischen Bindungspartners und in (B) ein Peptid des spezifischen Bindungspartners Sec 31A (LPVIQMWDLR, H/L: 19,2).

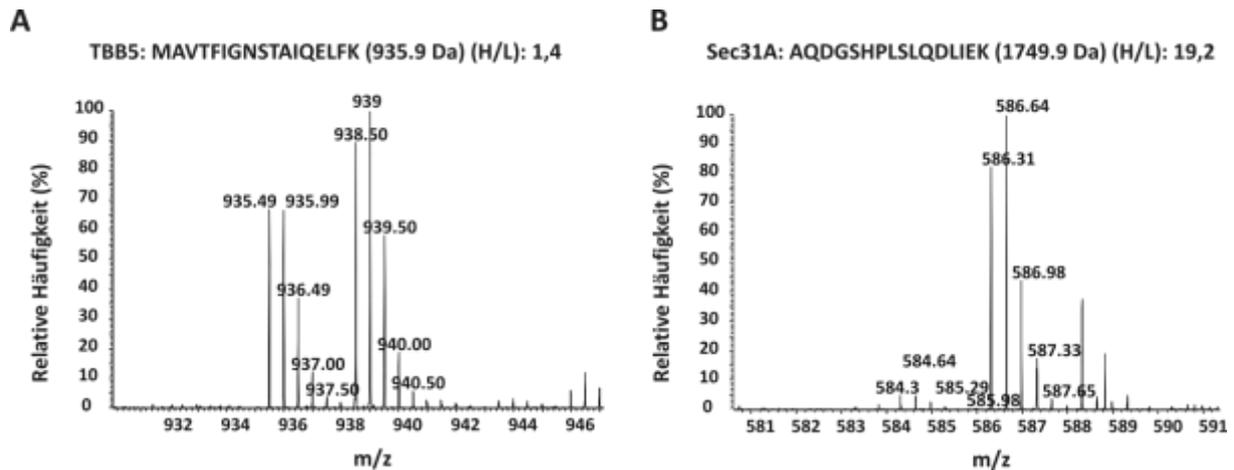


Abbildung 3.9: Peptidspektren für einen unspezifischen und einen spezifischen Bindungspartner der GIGYF2-GYF-Domäne. Links: Peptidspektrum des unspezifisch gebundenen Proteins TBB5. Rechts: Peptidspektrum des spezifisch gebundenen Proteins Sec31A.

Aus den Experimenten gingen viele Proteine hervor, die an der mRNA-Prozessierung im Zellkern beteiligt sind. Da etwa 50% der Proteine, die ein oder mehrere Bindungsmotive für die GIGYF2-Domäne aufwiesen, zu Proteinen der mRNA-Prozessierung gehörten wurden im Weiteren nur noch zytoplasmatische Proteine betrachtet. Nach Ausschluss der Proteine, die nach den Einträgen der Uniprot-Datenbank ausschließlich im Kern lokalisiert waren, reduzierte sich die Anzahl potentieller Bindungspartner auf 89 Proteine. Von diesen Proteinen besaßen 36 Proteine ein Bindungsmotiv für die GYF-Domäne von GIGYF2. Innerhalb der verkürzten Proteinliste konnten 4 funktionale Proteingruppen definiert werden: (1) COPII-Proteine (*coat protein complex II*, COPII), (2) Proteine des SMN-Komplexes (*survival of motor neurons*, SMN), (3) Proteine der zytoplasmatischen mRNPs (*P Bodies* und *Stress Granules*) und (4) ribosomale Proteine.

Das Experiment mit der zytoplasmatischen Fraktion (Experiment 2) lieferte vor allem angereicherte Proteine, die an der Ausbildung der zytoplasmatischen COPII-Vesikel (Sec13, 16A, 23A, 23B, 24A und 31A) beteiligt sind. Dabei weisen Sec16A, Sec24A und Sec31A Sequenzmotive auf, die von der GIGYF2-GYF-Domäne gebunden werden können. Die Sec-Proteine wurden ebenfalls im Experiment 3 angereichert. In Experiment 1, in dem Gesamtzell-Lysat eingesetzt wurde, scheinen dagegen die zytoplasmatischen Bindungspartner aufgrund der Vielzahl an zusätzlichen nukleären Proteinen unterrepräsentiert zu sein. In Abbildung 3.10 sind die angereicherten Proteine der funktionalen Proteingruppen dargestellt. Die Gruppe der ribosomalen Proteine wird nicht berücksichtigt, da sie als unspezifische Kontaminationen betrachtet werden, die an die Sepharose-Matrix binden^[122, 123].

Da für Smy2 eine Kollokalisierung mit *P Bodies* beschrieben war^[40], wurde die Proteinliste der GIGYF2-Experimente nach Proteinen dieser zytoplasmatischen mRNPs durchsucht. Im ersten Experiment wurde eine Reihe von Proteinen identifiziert, die in sogenannten *Stress Granules* zu finden sind. *Stress Granules* sind ebenso wie *P Bodies* zytoplasmatische mRNPs, die sich jedoch nach einer Stress-Situation bilden. Es handelt sich bei ihnen um dynamische Aggregate, die sich in ihrer Proteinzusammensetzung abhängig vom Stressimpuls verändern. Diese hohe Dynamik könnte ein Grund dafür sein, dass in den anderen Experimenten nicht die gleichen Proteine gefunden werden konnten. Dagegen konnten in den Experimenten 1 und 3 Proteine identifiziert werden, die in *P Bodies* zu finden sind. Zu diesen *P Body*-Proteinen gehören unter anderem Ago2, Mov10, Rent1 und TNRC6B, die mit Ausnahme von Ago2 ein Motiv besitzen. Die Proteine Ago2 und TNRC6B sind ebenfalls Proteinkomponenten der *Stress Granules*.

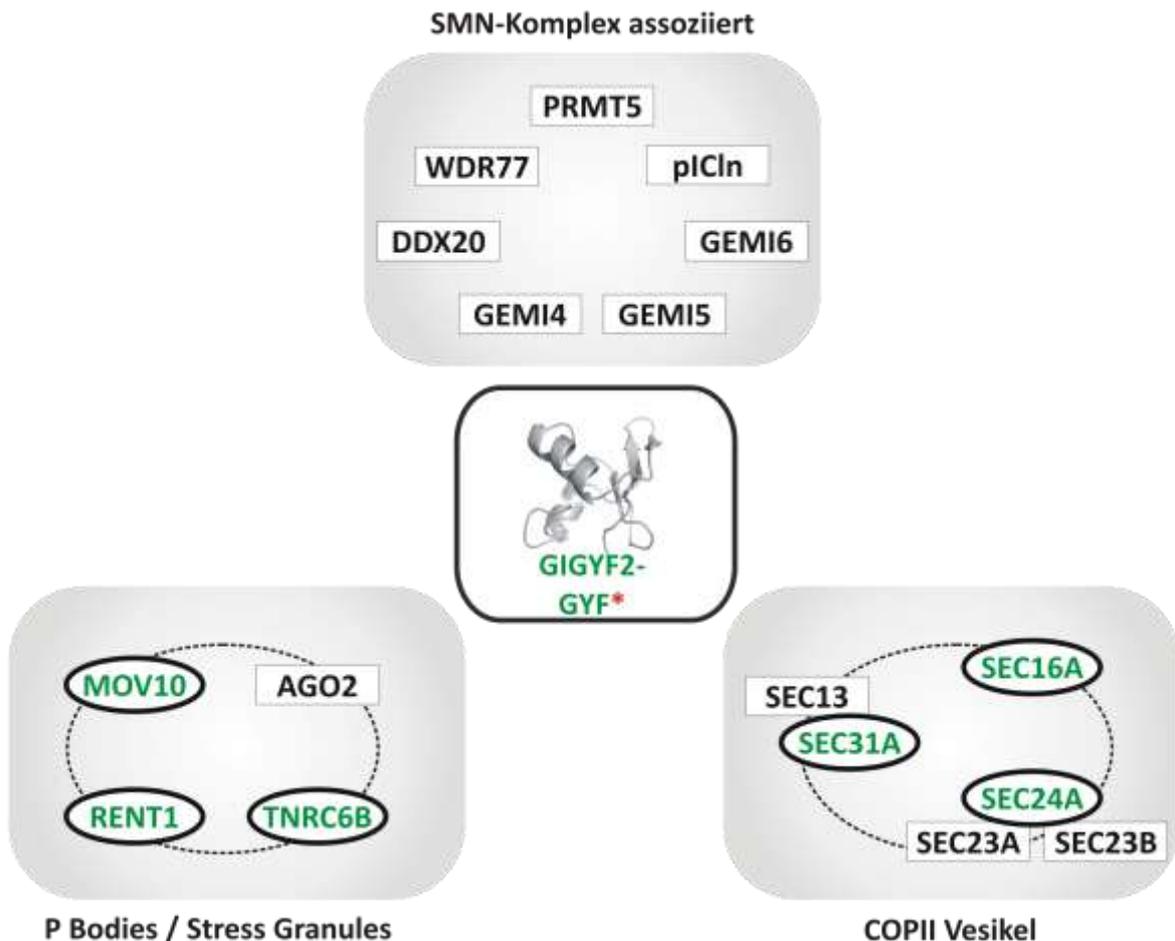


Abbildung 3.10: Interaktion der GIGYF2-GYF-Domäne. Die identifizierten Bindungspartner der GYF-Domäne von GIGYF2 gehören in die funktionalen Kontexte des vesikulären Transports (*coat protein complex II*, COPII) des SMN-Komplexes (*survival of motor neurons*, SMN) und der zytoplasmatischen Aggregate den *P Bodies* und *Stress Granules*. Proteine, die ein Bindungsmotiv für die GYF-Domäne besitzen sind in Grün dargestellt.*Die Struktur der Domäne wurde mit Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org>)^[105, 106] erstellt.

Aus den *Pulldown*-Experimenten gingen Interaktionspartner der GYF-Domäne von GIGYF2 hervor, die an vesikulären Prozessen und mRNA-assoziierten Funktionen beteiligt sind (nähere Betrachtung siehe 4.4 Diskussion).

Die Quantifizierungsergebnisse der 243 identifizierten Proteine ist dem Anhang zu entnehmen (s. 6.4). Proteine, die lediglich in einem Experiment gefunden wurden, sind nicht aufgeführt.

3.2 Validierung der SILAC-Ergebnisse für die GYF-Domänen vom Smy2-Typ

Die *Pulldown*-Experimente lieferten mithilfe der MS-Analyse eine Vielzahl an Proteinen, die für die untersuchten GYF-Domänen von Smy2 und GIGYF2 als Bindungspartner der PRS-Bindungsstelle in Frage kommen. In Folgeexperimenten sollten die Interaktionen ebenso für die Volle-Länge-Proteine bestätigt werden.

3.2.1 Interaktionspartner der GYF-Domäne von Smy2

Das deklarierte Interaktom der Smy2-GYF-Domäne beinhaltete u.a. Proteine des CCR4-Not-Komplexes, sowie die Proteine Lsm2 und Lsm5. Zwei Proteine wurden ausgewählt um ihre Bindung an das Volle-Länge-Protein Smy2 zu untersuchen: CCR4 und Lsm5. CCR4 enthält ein Bindungsmotiv für die Smy2-GYF-Domäne und könnte somit ein direkter Bindungspartner sein. Lsm5 besitzt selbst keine Bindungsmotive für die GYF-Domäne von Smy2, es war jedoch in beiden Experimenten angereichert und könnte ein indirekter Bindungspartner der Smy2-GYF-Domäne sein. Darüber hinaus wurde für Lsm5 eine nukleäre und eine zytoplasmatische Lokalisation beschrieben^[124].

Um die Interaktion mit dem Volle-Länge-Protein zu untersuchen wurden CCR4 und Lsm5 in einem TAP-Smy2-Hefestamm chromosomal mit einer C-terminalen 3xHA-Sequenz markiert (s. 2.3.14). Der verwendete Hefestamm exprimiert bereits das Protein Smy2 mit einer C-terminalen Tandemaffinitätsaufreinigungs-(TAP)-Markierung, die aus einem Calmodulin-Bindungspeptid und zwei IgG-Bindungsdomänen von Protein A aus *S. aureus* besteht. Über die TAP-Markierung sollte das Volle-Länge-Smy2 aus Hefezell-Lysat isoliert werden und kopräzipitierte HA-getaggte Proteine in einer Western Blot-Analyse über den HA-Tag detektiert werden.

Für die chromosomale Markierung wurden PCR-Fragmente hergestellt, die die Sequenz für die HA-Markierung beinhalteten. Flankiert wurde die HA-Sequenz von homologen Bereichen der Exonsequenz und der darauffolgenden Intronsequenz des Zielgens. Durch Transformation der PCR-Fragmente in den TAP-Smy2-Hefestamm sollte durch homologe Rekombination das PCR-Fragment ins Genom integriert werden. Da das PCR-Fragment zudem das Resistenzgen

für Geneticin (G418) beinhalten, konnten transformierte Hefezellen über die Resistenz gegen G418 selektiert werden. Für die Überprüfung des HA-Tags der Proteine CCR4 und Lsm5 wurden Einzelklone von einer G418 Platte gepickt und in einer großen Kultur herangezogen. Von diesen Kulturen wurden Lysate hergestellt, die nach Affinitätsexperimenten im Western Blot auf die HA-Markierung untersucht wurden (Abbildung 3.11, B).

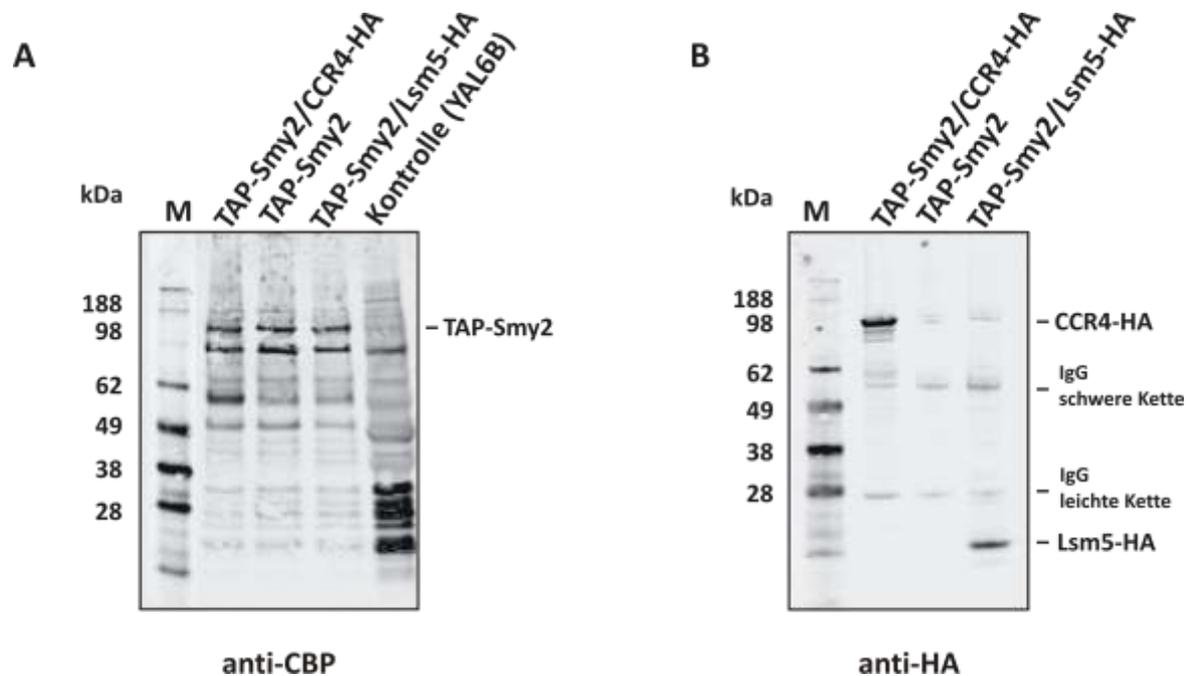


Abbildung 3.11: Überprüfen des chromosomalen HA-Tags. (A) Affinitätsaufreinigung von TAP-Smy2 über Calmodulin-Agarose. Für den TAP-Smy2-Hefestamm und die transformierten Hefestämme konnte eine Proteinbande für TAP-Smy2 (102,6 kDa) mit dem CBP-Antikörper nachgewiesen werden. Ein untransformierter Kontrollstamm (YAL6B) zeigte keine Bande. (B) Immunopräzipitation der HA-getaggten Proteine durch anti-HA-Beads. Präzipitierte Proteine wurden als Banden auf der Höhe des CCR4-HA (99,5 kDa) und des Lsm5-HA (15,2 kDa) mittels anti-HA-Antikörper detektiert.

Die Expression des TAP-Smy2 wurde ebenfalls überprüft. Die Inkubation der Hefelysate mit Calmodulin-Agarose und der anschließende Western Blot-Analyse zeigte, dass TAP-Smy2 aus den Lysaten des TAP-Smy2-Hefestamms und den transformierten TAP-Smy2-Hefestämmen isolierbar war. Die Detektion des TAP-Tags mit anti-CBP-Antikörpern lieferte in allen TAP-Smy2-Hefestämmen eine Proteinbande bei dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 100 kDa. Für einen Kontrollstamm (YAL6B), der nicht das TAP-Smy2-Protein exprimiert, wurde dagegen keine Bande detektiert (Abbildung 3.11, A).

Der Western Blot nach Inkubation der Lysate mit einer Matrix auf der ein anti-HA-Antikörper immobilisiert war demonstriert, dass der TAP-SMY2/CCR4-HA-Stamm eine Proteinbande mit dem Molekulargewicht von etwa 100 kDa zeigte, die dem CCR4-HA zuzuordnen war. Für den TAP-SMY2/Lsm5-HA-Stamm konnte präzipitiertes Lsm5-HA mit dem erwarteten

Molekulargewicht von 15,2 kDa detektiert werden (Abbildung 3.11, B). Die erfolgreiche chromosomale Markierung der Proteine mit dem HA-Tag konnte somit nachgewiesen werden.

Die Zell-Lysate wurden außerdem in Koimmunopräzipitations-Experimenten (*Co-IP*) für die Untersuchung der Interaktion mit Smy2 eingesetzt. Um TAP-Smy2 aus den Lysaten zu isolieren, wurden zwei verschiedene Matrices getestet. Es wurde sowohl IgG-Agarose, die mit einem humanen Antikörper gekoppelt war, als auch eine Calmodulin-Agarose-Matrix verwendet, um TAP-Smy2 zu isolieren. Ein *Pulldown* über die HA-getaggten Proteine mittels anti-HA-Matrix konnte nicht durchgeführt werden, da der TAP-Tag zwei IgG-Domänen von Protein A besaß. Dadurch wäre es immer zu einer Isolation beider Proteine über die Interaktion mit dem an der Matrix immobilisierten Antikörper gekommen, ohne dass dies zwangsläufig auf eine Interaktion beider Proteine zurückzuführen ist.

TAP-Smy2 konnte sowohl über die IgG- als auch die Calmodulin-Agarose erfolgreich aus den Lysaten isoliert werden. Eine Bindung der HA-getaggten Interaktionspartner an TAP-Smy2 konnte mittels Western Blot nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Der Versuch konnte aufgrund fehlender Mutanten-Hefestämme und fehlender Konstrukte für die TAP-Markierung des Smy2-Proteins nicht in anderen Hefestämmen durchgeführt werden.

Stattdessen wurden die Lysate diesmal nur mit der GST-fusionierten Smy2-GYF-Domäne inkubiert (Abbildung 3.12). Anhand des Western Blot in Abbildung 3.12 wird deutlich, dass CCR4-HA mit der Smy2-GYF-Domäne interagiert, eine Bindung von Lsm5-HA konnte dagegen nicht nachgewiesen werden.

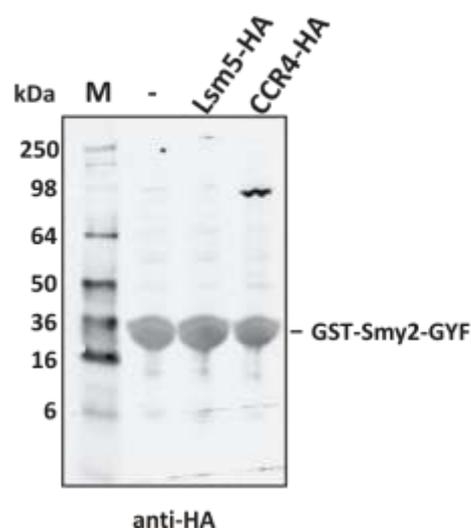


Abbildung 3.12: Untersuchung der Interaktion von Smy2-GYF mit Lsm5 und CCR4. Gezeigt ist der Western Blot der GST-Pulldown-Analyse. Die immobilisierte Smy2-GYF-Domäne zeigte nach Inkubation mit den verschiedenen TAP-Smy2-Hefelysaten eine Interaktion mit CCR4-HA. Eine Kopräzipitation des sekundären Bindungspartners Lsm5-HA konnte nicht gezeigt werden.

3.2.2 Interaktionspartner der GYF-Domäne von GIGYF2

Die mittels MS gefundenen Interaktionspartner der GYF-Domäne von GIGYF2 wurden ebenfalls auf ihre Interaktion mit dem Volle-Länge-GIGYF2 untersucht. Da *Co-IP*-Versuche zum Nachweis einer Interaktion nicht funktioniert hatten, erfolgte die Validierung der Interaktionspartner durch Kolokalisationsexperimente in HeLa-Zellen (durchgeführt von Gesa Ines Albert).

Proteine der COPII-Vesikel konnten als eine Gruppe von Interaktionspartnern der GIGYF2-GYF-Domäne mittels Affinitäts-MS-Experimenten identifiziert werden. Von den COPII-Proteinen wurde das Protein Sec31 gewählt, da es in allen drei *Pulldown*-Experimenten stark angereichert wurde und Bindungsmotive für die Domäne besitzt. Die Kolokalisation der endogenen Proteine GIGYF2 und Sec31 wurde durch Immunfärbung fixierter und permeabilisierter HeLa-Zellen demonstriert (Abbildung 3.13). Wie in Abbildung 3.13 zu erkennen ist, konnten distinkte Färbungen beobachtet werden. Die Überlagerung der Signale zeigte, dass GIGYF2 und Sec31 kolokalisierten.

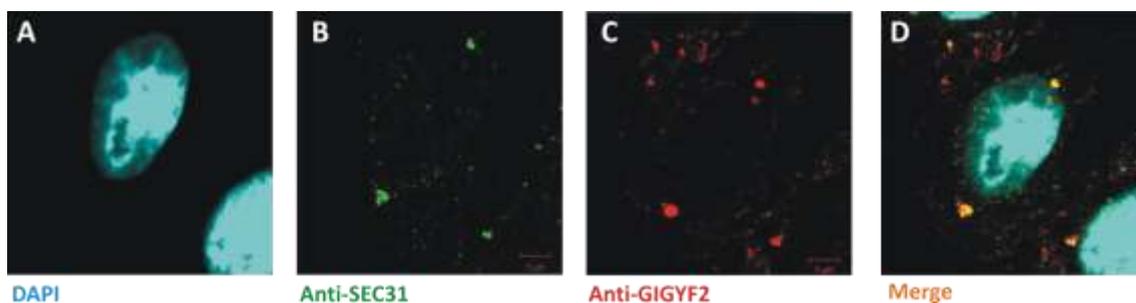


Abbildung 3.13: GIGYF2 und Sec31 kolokalisieren in HeLa-Zellen. Über indirekte Immunfluoreszenz wurde die Kolokalisation von GIGYF2 und Sec31 überprüft. Die Anfärbung der endogenen Proteine erfolgte in fixierten und permeabilisierten HeLa-Zellen mit anti-Sec31- (grün) und anti-GIGYF2-Antikörper (rot). Die Überlagerung der Signale (gelb) weist auf eine Kolokalisation beider Proteine hin.

Die deutlich angereicherten Sec-Proteine lieferten einen Hinweis auf eine Membran-assoziierte Funktion oder Lokalisation von GIGYF2 an Kompartimentmembranen. Da COPII-Vesikel am anterograden Proteintransport vom ER zum Golgi beteiligt sind, wurde auch die Kolokalisation von GIGYF2 mit einem ER- und einem Golgi-Marker untersucht. Aus der Überlagerung der Signale zeigte sich, dass GIGYF2 sowohl mit dem ER als auch mit dem Golgi-Apparat kolokalisiert (Abbildung 3.14).

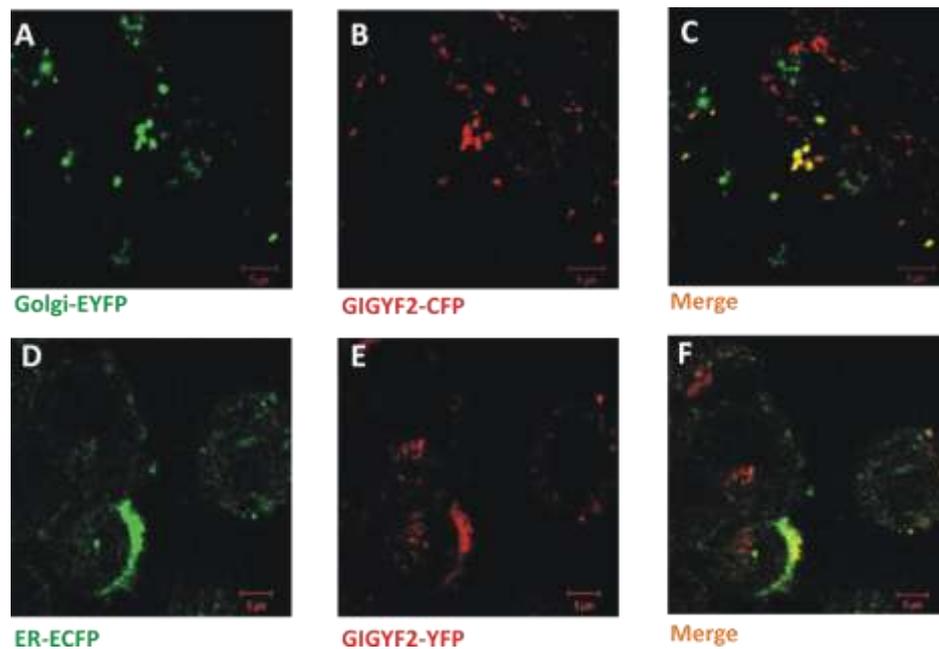


Abbildung 3.14: GIGYF2 ist am ER und am Golgi-Apparat lokalisiert. Lebendzell-Mikroskopie kotransfizierter HeLa-Zellen mit einem GIGYF2-CFP (B) oder -YFP (E) Konstrukt und einem Golgi-Marker (Golgi-EYFP, A) oder einem ER-Marker (ER-ECFP, D). Die Überlagerung der Signale (gelb) weist auf eine Kolokalisation von GIGYF2 mit dem Golgi Apparat (C) und dem ER (F) hin.

In den *SILAC-Pulldowns* mit der GYF-Domäne von GIGYF2 wurden auch Proteine aus *Stress Granules* und *P Bodies* als angereicherte Bindungspartner identifiziert. Dabei handelt es sich um zytoplasmatische Granulae, die aus RNA und Proteinen bestehen. *P Bodies* und *Stress Granules* unterscheiden sich in ihrer Proteinzusammensetzung, jedoch sind einige Proteine in beiden Granulae-Arten enthalten^[89, 125].

Es wurde daher untersucht, ob es zu einer Änderung der zellulären Lokalisation von GIGYF2 unter Stressbedingungen kommt. Die Lokalisationsstudien nach zellulärem Stress durch Behandlung der Zellen mit Arsen zeigten für GIGYF2 eine Kolokalisation mit dem Stress Granule Marker Tia-1^[126].

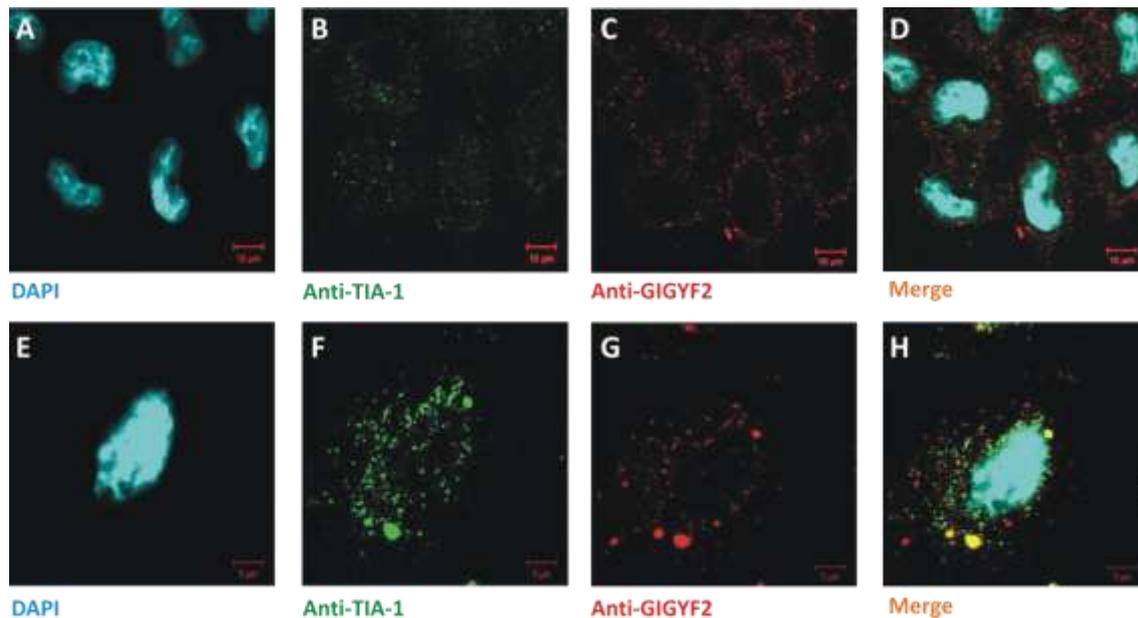


Abbildung 3.15: Stress-induzierte Lokalisation von GIGYF2 in zytoplasmatischen Granulae. Fixierte HeLa-Zellen wurden gegen GIGYF2 (rot, C) und TIA-1 (grün, B) gefärbt. In ruhenden Zellen wurde keine Kolokalisation beider Proteine beobachtet (D). Die Behandlung der HeLa-Zellen mit Arsen führte zur Bildung zytoplasmatischer Granulae (F,G) und einer Kolokalisation des *Stress Granule*-Markerproteins TIA-1 und GIGYF2 in diesen Granulae (H).

3.2.3 Verteilung von PPG Φ -Motiven in Proteinen aus Mensch und Hefe

Aus den durchgeführten SILAC-*Pulldown*-Experimenten ging hervor, dass die GIGYF2-GYF-Domäne Proteine der COPII-Vesikel bindet, wohingegen für die Smy2-GYF-Domäne Proteine des CCR4-Not-Komplexes als Bindungspartner identifiziert wurden. Smy2 wurde bereits in den Zusammenhang mit vesikulärem Transport bzw. COPII-Vesikeln gebracht^[52, 54]. Für Smy2 wurde eine Interaktion mit dem COPII-Protein Sec24 beschrieben, die nicht über die GYF-Domäne vermittelt wird^[54]. Daher war es überraschend die COPII-Proteine als Interaktionspartner der GIGYF2-GYF-Domäne zu finden. Im *Pulldown*-Experiment mit der Smy2-GYF-Domäne wurden die COPII-Proteine dagegen nicht identifiziert. Aufgrund dieser unterschiedlichen Beobachtungen wurde die Verteilung von PPG Φ -Motiven im Proteom von Mensch und Hefe betrachtet (Tabelle 3.1). Es zeigte sich, dass die COPII-Proteine von Hefe keine PPG Φ -Motive aufweisen. Daher wurden sie nicht als Bindungspartner der Smy2-GYF-Domäne identifiziert. Die humanen COPII-Proteine weisen dagegen PPG Φ -Motive auf und konnten im GIGYF2-GYF-Experiment über die PRS-Bindungsstelle angereichert werden.

Tabelle 3.1: Vergleich der PPG Φ -Motivverteilung in Proteinen des CCR4-Not-Komplexes und der COPII-Vesikel im Proteom von Mensch und Hefe. * Alternative Proteinnamen sind in Klammern angegeben.

CCR4-Not-Komplex:

Hefe	Motive	Human	Motive
NOT1 (CDC39,ROS1)*	PPGV	CNOT1 (CDC39,KIAA1007,NOT1)	PPGI
NOT2 (CDC36,DNA19)	—	CNOT2 (CDC36,NOT2)	—
NOT3	—	CNOT3 (KIAA0691,LENG2,NOT3)	—
MOT2 (CCL1,NOT4,SIG1,SSF1)	PPGI	CNOT4 (NOT4)	PPGI
NOT5	PPGM		
CCR4	PPGI	CNOT6 (CCR4,KIAA1194)	—
POP2 (CAF1)	PPGI	CNOT7 (CAF1)	PPGT
		CNOT8 (CALIF,POP2)	—
CAF40	—	RQCD1 (CNOT9,RCD1)	—
CAF130	—	CNOT10	—
KEM1 (DST2,RAR5,SEP1,SKI1,XRN1)	PPGF	XRN1 (SEP1)	2x PPGT

COPII-Vesikel:

Hefe	Motive	Human	Motive
SEC13 (ANU3)	—	SEC13 (D3S1231E,SEC13L1,SEC13R)	—
SEC16	—	SEC16A (KIAA0310,SEC16,SEC16L)	PPGA/S/W
SEC24 (ANU1)	—	SC24A	PPGA/Y
		SC24B	—
SEC31 (WEB1)	—	SEC31A (KIAA090,SEC31L1)	PPGF/T
SEC23	—	SC23A	—
		SC23B	—

Konsensusmotive:

Smy2: PPG[ACFGILMVWY]

GIGYF2: PPG[AEFHILMSTWY]

Proteine des CCR4-Not-Komplexes besitzen sowohl in Hefe als auch im Menschen Bindungsmotive für die GYF-Domänen vom Smy2-Typ. Dennoch wurden die humanen Proteine des CCR4-Not-Komplexes, bis auf CNOT4, nicht im GIGYF2-Pulldown-Experiment gefunden. Die GYF-Domänen von Smy2 und GIGYF2 besitzen zwar Struktur- und Sequenzähnlichkeiten, aber sie unterscheiden sich in den verschiedenen Organismen bezüglich ihrer potentiellen Bindungspartner.

3.2.4 Vergleich der beschriebenen Interaktionen mit den Ergebnissen der SILAC-Experimente

Die in der BioGrid (www.thebiogrid.org) und der IntAct-Datenbank (www.ebi.ac.uk/intact/) bereits beschriebenen Interaktionspartner für Smy2 und GIGYF2 wurden auf ihr Auftreten in

den *Pulldown*-Experimenten durchsucht (Tabelle 3.2). Die von Ash *et al.* 2010, beschriebenen Interaktionen wurden dabei nicht berücksichtigt, da sie Teil der vorliegenden Arbeit sind. Die angegebenen Methoden zur Bestimmung der Interaktionen umfassen dabei Affinitätsaufreinigungen, Rekonstitutionsassays und genetische Interaktionsanalysen. Tabelle 3.2 gibt die Anzahl der Proteine der Datenbanken an, die mithilfe der entsprechenden Methoden identifiziert wurden. Zum Vergleich ist die Anzahl der bereits beschriebenen Interaktionspartner die auch in den SILAC-Experimenten identifiziert wurden der entsprechenden Methode zugeordnet. Daraus ist erkennbar, dass beim SILAC-Experiment nicht alle beschriebenen Interaktionen identifiziert wurden (nähere Betrachtung siehe 4.1.1, Diskussion). Die vollständigen Angaben der beschriebenen Interaktionen ist dem Anhang zu entnehmen (s. 6.6).

Tabelle 3.2: Vergleich beschriebener Interaktionspartner für Smy2 und GIGYF2. Bereits beschriebene Interaktionspartner für Smy2 und GIGYF2 wurden auf ihr Auftreten in den *Pulldown*-Experimenten überprüft. Die Datenbankeinträge sind entsprechend der angewandten Methode zur Identifizierung der Interaktion aufgelistet. Die in den Spalten für das SILAC-Experiment angegebenen Zahlen verdeutlichen, wieviele der beschriebenen Interaktionspartner auch im *Pulldown*-Experiment gefunden wurden.

Versuch	Smy2		GIGYF2	
	Datenbank-einträge	SILAC-Experiment	Datenbank-einträge	SILAC-Experiment
Affinitätsaufreinigung	24	8	4	1
Rekonstruktionsassay	3	2	7	3
Genetische Interaktion	26	1	0	0
Gesamt	53	11	11	4

3.3 Analyse der Funktion der C-terminalen Domäne von Smy2

Im Hefeprotein Smy2, sowie im homologen Syh1, gibt es neben der GYF-Domäne noch eine weitere C-terminale Domäne mit bislang unbekannter Funktion. Diese Domäne sollte auf ihre etwaige Bindung an Proteine, Peptide oder Lipide/Membranen untersucht werden. Um eine Funktion als Proteininteraktionsdomäne zu untersuchen wurden als Untersuchungsmethoden das Phagen-Display und der SILAC-*Pulldown* herangezogen. Für eine erste Untersuchung auf eine Lipidinteraktion wurde zudem eine PIP-Strip-Analyse durchgeführt. Für die Versuche wurden GST-Fusionsproteine exprimiert, die die Aminosäuren 631-740 von Smy2 umfassen. Im Folgenden wird dieses Teilkonstrukt als GST-Smy2-C631 bezeichnet.

3.3.1 Phagen-Display

Die C-terminale Domäne von Smy2 wurde mit der Phagen-Display-Methode auf ihre Fähigkeit zur Bindung von Peptidsequenzen einer Länge von 9 Aminosäuren untersucht. Eine spezifische Bindung an die Domäne sollte sich in einer Zunahme gebundener Phagen mit jeder Selektionsrunde äußern. Um eine spezifische Anreicherung zu erfassen, wurde in einem Kontrollexperiment die unspezifische Bindung an GST untersucht. Aus der Titerbestimmung gebundener Phagen beider Ansätze konnte somit eine Information über die Spezifität gewonnen werden.

Tabelle 3.2: Phagentiter-Bestimmung. Die eluierten Phagen wurden nach der Selektionsrunde zur Infektion von Bakterien eingesetzt. Die Bakterien wurden auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausplattiert und der Phagentiter durch Auszählen der Kolonien, angegeben als koloniebildende Einheiten (*colony forming unit*, cfu), bestimmt.

Runde	eingesetzte Phagen	Titer GST	Titer GST-Smy2-C631	Anreicherung (C631/GST)
1	$0,7 \times 10^{13}$ cfu/ml	$3,75 \times 10^6$ cfu/ml	$4,2 \times 10^6$ cfu/ml	1,12
2	2×10^{12} cfu/ml	$0,74 \times 10^6$ cfu/ml	$1,1 \times 10^6$ cfu/ml	1,49
3	2×10^{12} cfu/ml	n.b.	n.b.	n.b.

n.b.: nicht bestimmt

In Tabelle 3.2 sind die Anreicherungsfaktoren der beiden ersten Panning-Runden aufgeführt. Bereits nach zwei Panning-Runden wurde ersichtlich, dass es zu keiner spezifischen Phagenanreicherung über GST-Smy2-C631 kam. Das Verhältnis von unspezifischer Bindung an GST und der Bindung an GST-Smy2-C631 betrug nahezu 1. Die dritte durchgeführte Panning-Runde wurde ebenfalls titriert. Da bereits optisch kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an Kolonien für GST-Smy2-C631 im Vergleich zur GST-Kontrolle festgestellt werden konnte, wurde darauf verzichtet, diese Panning-Runde auszuzählen.

Der Phagen-Display-Versuch mit einer Peptidbibliothek lieferte somit keine spezifische Anreicherung für die C-terminale Domäne von Smy2. Diese Beobachtung spricht somit gegen ihre mögliche Funktion als Peptidbindungsdomäne. Ein experimenteller Fehler kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da keine Positiv-Kontrolle wie zum Beispiel die GYF-Domäne von CD2BP2 eingesetzt wurde (nähere Betrachtung siehe 4.3.2, Diskussion).

3.3.2 SILAC-Pulldown mit GST-Smy2-C631

Das durchgeführte Phagen-Display-Experiment lieferte keinen Hinweis auf eine Bindung der Domäne einer spezifischen Nonapeptidsequenz. Dennoch wäre es möglich, dass eine Protein-Protein-Interaktion zwischen der Domäne und anderen Proteinen über eine

Oberflächeninteraktion erfolgt. Die Funktion der C-terminalen Smy2-Domäne als Proteininteraktionsdomäne wurde daher auch mittels *SILAC-Pulldown* untersucht. Insgesamt wurden vier Experimente durchgeführt (Abbildung 3.16).

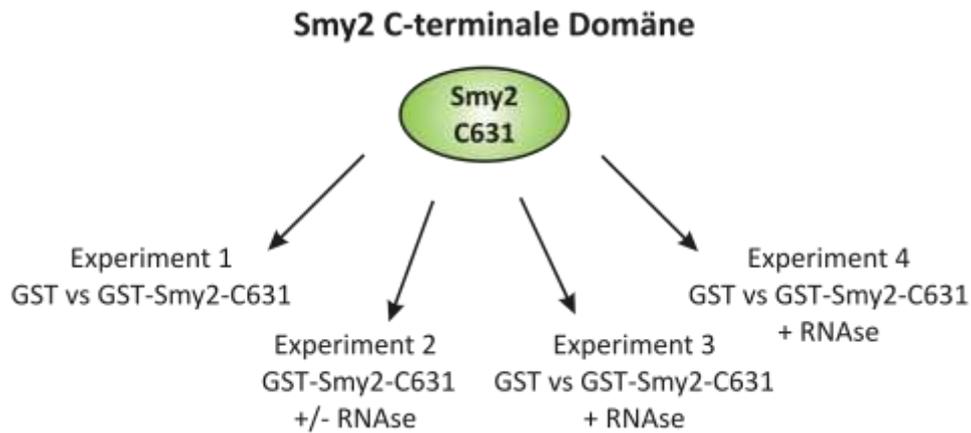


Abbildung 3.16: SILAC-Pulldown-Experimente mit der C-terminalen Domäne von Smy2. Zur Untersuchung einer Funktion der C-terminalen Smy2-Domäne als Protein-Protein-Interaktionsdomäne wurden insgesamt vier SILAC-Experimente durchgeführt.

Im ersten Experiment wurden die Bindungspartner des GST-Smy2-C631 im Vergleich zu unspezifischen Bindungspartnern der GST-Markierung untersucht. Es zeigte sich, dass Proteine des PAF1-Komplexes (PAF1, RTF1, CTR9) stark angereichert wurden. Bei dem PAF1-Komplex handelt es sich um einen RNA Polymerase II-assoziierten Komplex, der an der Transkriptionsinitiation und -elongation beteiligt ist^[127]. Da der PAF1-Komplex in direkter Verbindung mit RNA steht und die C-terminale Domäne von Smy2 relativ viele positiv geladene Reste aufweist, wäre eine Kopräzipitation des PAF1-Komplexes durch Bindung negativ geladener RNA möglich. Um eine RNA-vermittelte Kopräzipitation des PAF1-Komplexes zu untersuchen erfolgte ein zweites *SILAC-Pulldown*-Experiment mit GST-Smy2-C631. Das ¹³C-markierte Lysat wurde dafür mit RNase vorbehandelt, das ¹²C-Lysat dagegen nicht. Die Proteine des PAF1-Komplexes konnten auch in diesem Experiment identifiziert werden, jedoch waren sie für keine der beiden Bedingungen spezifisch angereichert. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass die Proteine dieses Komplexes in beiden Ansätzen in gleichem Maße an die C-terminale Domäne gebunden hatten. Da die Versuchsansätze zu unterschiedlich waren, um aus diesen Ergebnissen eine Information auf spezifisch gebundene Proteine zu liefern, wurden zwei weitere Experimente durchgeführt. In den folgenden Versuchen wurden alle eingesetzten Lysate mit RNase behandelt, und es wurde auf die spezifische Bindung an die C-terminale Domäne im Vergleich zur

unspezifischen Bindung an GST und die Matrix untersucht. Dafür wurden neue Hefelysate hergestellt. In diesen Experimenten (3 und 4) wurden die Proteine des PAF1-Komplexes nicht gefunden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es um ein lysatspezifisches Artefakt handelt. Unter den weiter identifizierten Proteinen konnten lediglich ribosomale Proteine nachgewiesen werden, die in mindestens zwei der vier Experimente angereichert waren (nicht gezeigt). Die durchgeführten Experimente lieferten somit keine Hinweise auf eine Funktion als Proteininteraktionsdomäne der C-terminalen Domäne von Smy2.

3.3.3 Analyse von Lipid-Protein-Interaktionen

Aufgrund der relativ vielen positiv geladenen Aminosäuren innerhalb des C-terminalen Sequenzabschnittes, wäre auch eine Interaktion der C-terminalen Domäne mit Membranen oder RNA möglich. Als schnell durchführbares Lipidinteraktions-Experiment wurde eine sogenannte *PIP-Strip-Analyse* durchgeführt. *PIP-Strips* dienen der Untersuchung der Lipidbindungseigenschaften von Proteindomänen, die Phosphoinositide erkennen. Bei den *PIP-Strips* (Echelon) handelt es sich um Nitrozellulosemembranen, auf der jeweils 100 pmol von 15 verschiedenen Phospholipiden immobilisiert sind. Die Membran wurde mit GST-Smy2-C631 inkubiert. Eine Interaktion zwischen GST-Smy2-C631 und den Phospholipiden wurde über Immundetektion des GST-Tags nachgewiesen. Um eine GST-vermittelte Bindung auszuschließen wurde parallel eine Membran mit GST inkubiert.

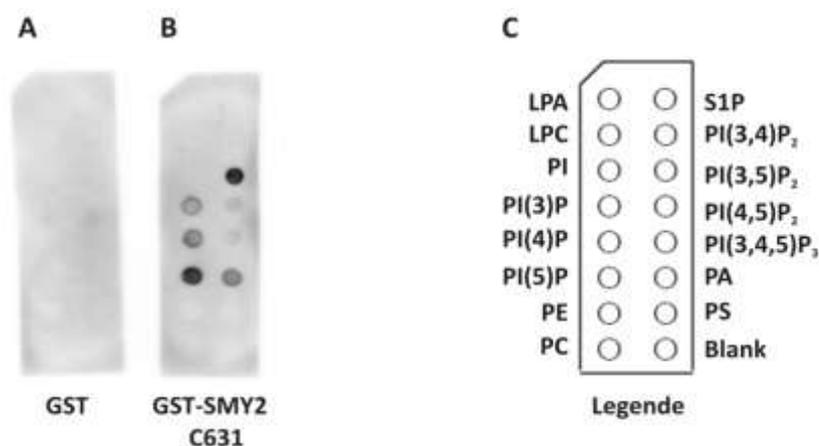


Abbildung 3.17: PIP-Strip-Analyse der Lipidbindungseigenschaften von GST-Smy2-C631. In paralleler Durchführung wurde die Membranen mit GST (A) oder GST-Smy2-C631 (B) inkubiert. Gebundenes Protein wurde über eine Inkubation mit einem anti-GST Antikörper (aus Kaninchen) und anschließender Detektion dieses Antikörpers mit einem HRP-konjugierten Antikörper detektiert, der gegen das Kaninchen-IgG gerichtet war. Mittels Chemilumineszenz wurde gebundenes Protein detektiert.

(C) Legende der Lipide: LPA: Lysophosphatidat, LPC: Lysophosphatidylcholin, PI: Phosphatidylinositol, PI(X)P: Phosphatidyl-(X)phosphat, PE: Phosphatidylethanolamin, PC: Phosphatidylcholin, S1P: Sphingosin(1)phosphat, PI(X,Y)P₂: Phosphatidylinositol(X,Y)bisphosphat, PI(3,4,5)P₃: Phosphatidylinositol-(3,4,5)trisphosphat, PA: Phosphatidat, PS: Phosphatidylserin.

Abbildung 3.17 zeigt, dass GST selbst nicht mit den aufgetragenen Lipiden interagiert. Im Vergleich dazu konnte eine Bindung von GST-Smy2-C631 an alle Phosphatidylphosphate außer PI(3,4)P2 beobachtet werden. Die stärksten Signale waren dabei bei der Interaktion mit PI(5)P und PI(3,5)P2 zu erkennen. Weiterhin war eine Interaktion mit Phosphatidat (PA) nachweisbar. Es war eine mittelstarke Bindungsintensität für PI(3)P und PI(4)P zu beobachten, wohingegen die Intensitäten für PI(4,5)P2 und PI(3,4,5)P3 niedrig waren. Keine Bindung erfolgte an die Lysophospholipide Lysophosphatidylcholin und Lysophosphatidat, an die Glycerophospholipide Phosphatidylinositol, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin, sowie an Sphingosin(1)phosphat.

3.3.4 NMR-Titration mit IP3

Das Lipidinteraktions-Experiment mittels PIP-Strip-Analyse lieferte den Hinweis, dass die C-terminale Domäne von Smy2 mit Lipid-Membranen interagieren könnte. Diese Interaktionsmöglichkeit der Domäne wurde aufgrund ihrer Aminosäurekomposition aus überwiegend positiv geladenen Aminosäuren bereits vermutet. Zudem wurde eine Funktion der Domäne als Proteininteraktionsdomäne anhand der SILAC-Pull-down-Experimente und dem des Phagen-Display nicht vermutet.

Die PIP-Strip-Analyse wies auf eine schwache Bindung von GST-Smy2-C631 an das Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat hin. Da die Kopfgruppe dieses Lipids (Abbildung 3.18) in ausreichenden Mengen käuflich erworben werden kann, wurde die Bindung der Kopfgruppe von Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat an die C-terminale Domäne von Smy2 mittels NMR-Titration getestet. Das Kopfgruppenanalog von Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat war das D-myo-Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Trinatrium Salz (Sigma Aldrich, # I7966).

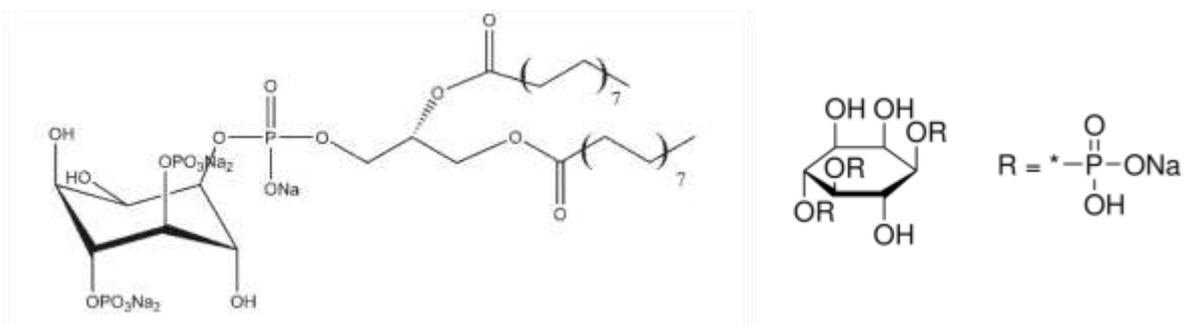


Abbildung 3.18: Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat und dessen Kopfgruppenanalog. Die linke Struktur zeigt Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat, für das eine schwache Interaktion mit der Smy2-C631-Domäne beobachtet wurde. In der rechten Struktur wird das D-myo-Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Trinatrium Salz (Sigma-Aldrich, Cat-No. I7966) gezeigt welches als Kopfgruppenanalog des PI(4,5)P2 für die NMR-Untersuchungen verwendete wurde.

Aus der NMR-Titration (Abbildung 3.19) konnte keine Bindung der IP3-Kopfgruppe an die C-terminale Domäne gefolgert werden. Die Überprüfung des pH-Wertes der einzelnen Proben ergab, dass es zwischen den Proben der isolierten Domäne und der Probe mit einer maximalen Ligandenkonzentration von 1,3 mM eine pH-Wertverschiebung um 1,2 Einheiten gab. Daher wurde in einer weiteren Messung der Einfluss auf die Resonanzverschiebung unter Änderung des pH-Wertes untersucht. Dazu wurden zwei NMR-Spektren aufgenommen, die die in den Proben die entsprechenden pH-Werte (pH-Bereich von 7,5 zu 6,3) besaßen. Aus dieser Untersuchung wurde deutlich, dass die beobachteten Resonanzverschiebungen nicht aus einer Bindung der Kopfgruppe sondern aufgrund der pH-Wertänderung erfolgten.

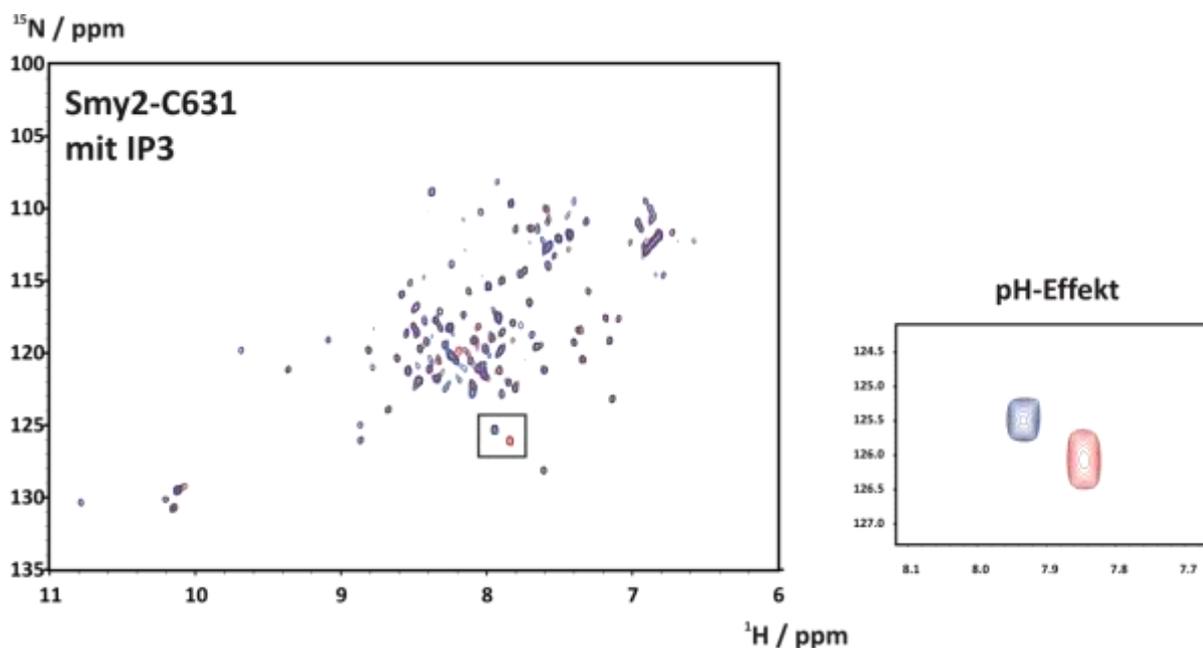


Abbildung 3.19: NMR-Titration der C-terminalen Domäne von Smy2 mit IP3. Zur isolierten ^{15}N -markierten C-terminalen Domäne von Smy2 (rot) wurde das Kopfgruppenanalogon des Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (IP3) titriert (blaues Spektrum). Es konnten keine signifikanten Resonanzverschiebungen beobachtet werden. Die einzige beobachtbare Verschiebung einer Resonanz ist Resultat einer pH-Wertänderung von 7,5 (rot) zu pH 6,3 (blau).

Eine Bindung von Smy2-C631 an die IP3-Kopfgruppe scheint daher unwahrscheinlich. Es ist jedoch möglich, dass sterische Einflüsse, die durch die zwei direkt benachbarten Phosphatgruppen hervorgerufen werden, die Bindung verhindern. Es empfiehlt sich daher, die Bindung an die Kopfgruppen eines Phosphatidylinositol-Phosphats (PI(5)P oder PI(3,5)P2) zu untersuchen, welches bereits im PIP-Strip-Experiment auf eine stärkere Interaktion mit der Domäne hinwies, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Interaktion nicht auf den Lipidkopfgruppen beruhte.

3.4 Interaktombestimmung der GYF-Domäne von CD2BP2

Das humane CD2BP2 wurde als Bindungspartner der zytoplasmatischen Sequenz des CD2-Rezeptors und als Komponente des spleißosomalen U5 snRNP identifiziert^[18, 32, 43]. Daher wird für CD2BP2 neben einer Rolle an der Signalweiterleitung in T-Zellen zusätzlich eine Funktion beim Spleißen von mRNA vermutet.

Um weitere Hinweise über die Funktion von CD2BP2 zu erhalten wurden *Pulldown*-Experimente unter Verwendung eines Lysates muriner Milz, in der CD2BP2 exprimiert wird, durchgeführt. Dies sollte in der etwaigen Identifizierung Zelltyp-spezifischer Interaktionspartner der CD2BP2-GYF-Domäne resultieren.

3.4.1 Die W8R Y33A-Mutante der GYF-Domäne von CD2BP2 bindet keine prolinreichen Sequenzen

Wie für alle durchgeführten MS-basierten Untersuchungen zur Bestimmung des PRD-Interaktoms wurde eine inhibierte Bindungsdomäne vorausgesetzt. Die Inhibition der PRS-Bindungsstelle der CD2BP2-GYF-Domäne erfolgte hierbei durch eingefügte Mutationen an den Aminosäurepositionen 8 und 33. Die Faltung der Domäne und die inhibierte Bindungsfähigkeit wurden durch HSQC-NMR-Spektroskopie und Fluoreszenztitration überprüft.

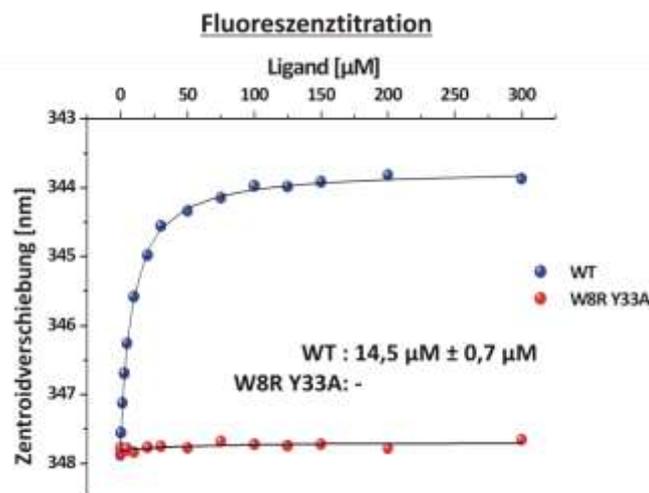


Abbildung 3.20: Bestimmung der Bindungskonstanten der CD2BP2-GYF-Varianten mittels Fluoreszenztitration. Aus den Titrations der GST-fusionierten GYF-Domänen des WT und der W8R Y33A-Doppelmutante mit der steigenden SmB-2-Peptidkonzentration ergab sich für die WT-Domäne eine Bindungskonstante von $14,5 \mu\text{M} \pm 0,7 \mu\text{M}$ (blau). Eine Bindung des Peptids an die Doppelmutante der Domäne wurde dagegen nicht beobachtet (rot). Die angegebenen Fehlerwerte resultierten aus den Kurvenanpassungen (Fit-Fehler).

Die Dissoziationskonstanten der Peptid-Protein-Komplexe der Doppelmutante (W8R Y33A) und der WT-Domäne mit einem prolinreichen Peptidliganden wurden mittels Fluoreszenztitration bestimmt (Abbildung 3.20). Das gewählte Peptid (bezeichnet als SmB-2), umfasst die Aminosäuren 210-231 des spleißosomalen Proteins SmB/B'. In der Peptidsequenz von SmB-2 sind zwei PPGM-Motive (GTPMGMPPPGMRPPPPGMRGLL) enthalten und die Bindung von SmB-2 durch die CD2BP2-GYF-Domäne wurde bereits gezeigt^[41]. Für die Fluoreszenztitration wurde die intrinsische Fluoreszenz der GYF-Domäne, basierend auf den Tryptophanen in der PRS-Bindungsstelle, genutzt. Aus der Titration ergab für die WT-Domäne und das SmB-2-Peptid eine Bindungskonstante von $14,5 \mu\text{M} \pm 0,7 \mu\text{M}$, wohingegen eine Bindung an die Doppelmutante nicht beobachtet wurde.

Da die intrinsische Fluoreszenz größtenteils auf den Tryptophanen basiert, und in der Doppelmutanten ein Tryptophanrest durch Mutation gegen ein Arginin ersetzt war (W8R), wurde die Bindungsfähigkeit der mutierten Domäne zusätzlich mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Außerdem konnte überprüft werden, ob die beobachtete Nichtbindung nicht auf einer Entfaltung der Domäne beruht (Abbildung 3.21).

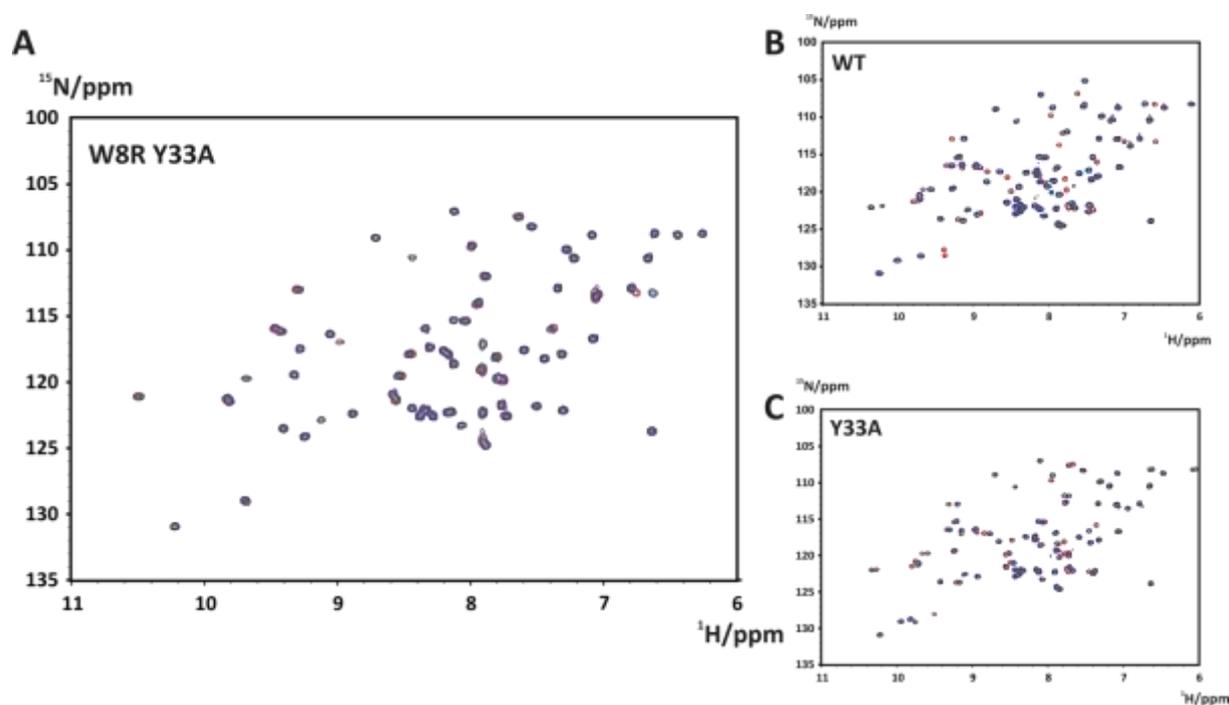


Abbildung 3.21: Inhibierte PRS-Bindung von CD2BP2-GYF W8R Y33A. Die W8R Y33A-Doppelmutante der CD2BP2-GYF Domäne bindet keine prolinreichen Peptidliganden. (A) Überlagerung der ^{15}N -HSQC-Spektren der W8R Y33A-Doppelmutante der CD2BP2-GYF-Domäne in Abwesenheit des SmB-2 Peptids (rot) und nach Zugabe von 2 mM SmB-2 Peptid (blau). Es erfolgte keine Bindung des Peptids durch die mutierte GYF-Domäne. Die Peptidzugabe zur WT-Domäne (B) und einer Einfachmutante (Y33A, gezeigt in C) führte dagegen zu denen aus einer Bindung resultierenden Resonanzverschiebungen (blau).

Aus der NMR-Untersuchung wurde deutlich, dass die Doppelmutante noch immer eine gefaltete Domäne war, da es zu keinem Verlust der aufgelösten Resonanzen kam. Wie aus den überlagerten ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren ersichtlich wird führte die Zugabe von 2 mM SmB-2 Peptid zu keiner Verschiebung der Resonanzen für die Doppelmutante. Im Vergleich zur WT-Domäne sowie der Y33A-Einfachmutante konnte dagegen eine Bindung des Peptids anhand von Resonanzverschiebungen beobachtet werden. Eine Bindung von prolinreichen Sequenzen wurde damit für die W8R Y33A-Mutante ausgeschlossen.

3.4.2 Organspezifische Expression von CD2BP2 in der Maus

Die Interaktombestimmung der humanen GYF-Domäne von CD2BP2 sollte mit Lysaten aus primären Mauszellen erfolgen. Um für die Versuche Zellen zu nutzen, in denen CD2BP2 exprimiert vorliegt, wurde die organspezifische Proteinexpression in der Maus analysiert (durchgeführt von Gesa Ines Albert). Dazu wurden die in der Abbildung 3.22 aufgeführten Organe aus Mäusen entnommen, diese lysiert und jeweils 20 μg der Lysate über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Analyse der CD2BP2-Expression erfolgte durch anschließenden Western Blot. Als Ladekontrolle diente die Detektion der ubiquitär exprimierten Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

Die Proteinexpressionsanalyse der Mausorgane zeigte, dass CD2BP2 insbesondere in lymphatischen Organen wie dem Thymus, den Lymphknoten und der Milz exprimiert wird.

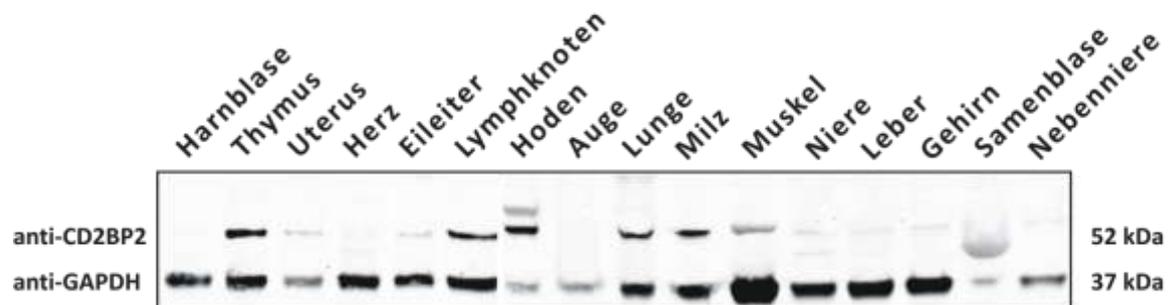


Abbildung 3.22: Organspezifische Proteinexpressionsanalyse für CD2BP2 in der Maus. Aus der Western Blot-Analyse der Organlysate zeigte sich, dass CD2BP2 im Thymus, den Lymphknoten, den Hoden, der Lunge und der Milz exprimiert wird. Als Ladekontrolle wurde der Blot zudem mit anti-GAPDH inkubiert. (Durchgeführt von Gesa Ines Albert)

Der Thymus, die Lymphknoten und die Milz gehören zu den hämatopoetischen Organen, in denen die Reifung der Immunzellen und die Immunantwort erfolgen. Aufgrund der beschriebenen Interaktion von CD2BP2 mit dem zytoplasmatischen C-Terminus des CD2-

Rezeptors in T-Zellen wurde die Milz für die folgenden Versuche ausgewählt. (Entscheidend war dabei die Größe des Organs, da für die *Pulldown*-Experimente eine möglichst hohe Lysatkonzentration eingesetzt werden sollte.)

3.4.3 Bestimmung des CB2BP2-GYF Interaktoms mittels ^{18}O -Markierung

Zur Bestimmung der Bindungspartner der GYF-Domäne von CD2BP2 wurden die *Pulldown*-Experimente mit Lysaten der Milz durchgeführt. Der schematische Ablauf des Experimentes ist in Abbildung 3.23 gezeigt.

Für die Versuche wurde drei Mäusen die Milz entnommen, um eine ausreichende Menge an Lysat herzustellen. Die *Pulldown*-Experimente erfolgten mit der GST-fusionierten WT-Domäne und der W8R Y33A-Doppelmutante der Domäne (mit inaktiver PRS-Bindungsstelle). Für die folgende massenspektrometrischen Analyse der gebundenen Proteine wurde die ^{18}O -Methode zur Markierung der tryptischen Peptide angewandt. Die ^{18}O -Methode bietet sich zur Quantifizierung der Bindungspartner an, da das Ausgangslysat (Milz) nicht für die Markierung in Zellkultur (SILAC) zugänglich war.

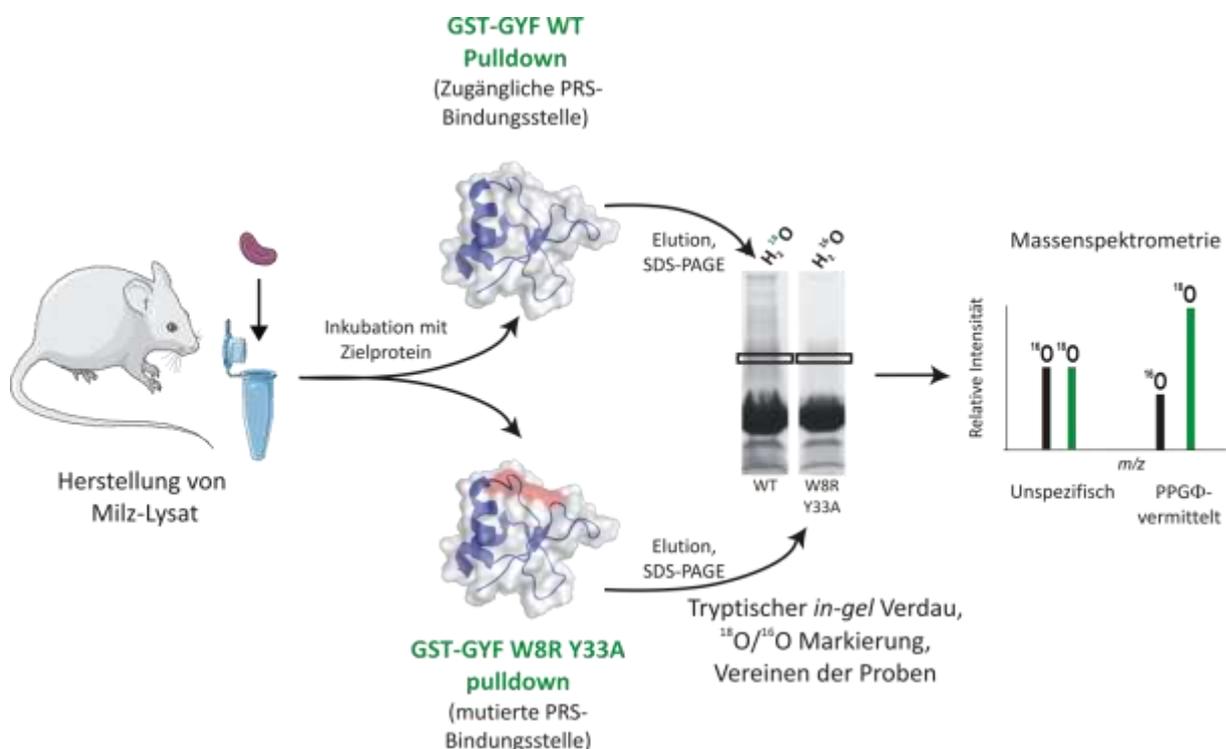


Abbildung 3.23: Schema des *Pulldown*-Experimentes der GYF-Domäne von CD2BP2 mit murinem Milzlysat. Nach Inkubation der beiden Varianten der GYF-Domäne des humanen CD2BP2 (WT und W8R Y33A-Mutante) mit murinem Milzlysat wurden die gebundenen Proteine eluiert und über eine SDS-PAGE in separaten Gelspuren aufgetrennt. Die an der WT-Domäne gebundenen Proteine wurden durch tryptischen Verdau in schwerem Wasser mit dem ^{18}O -Isotop markiert. Die Proben wurden vereint und massenspektrometrisch vermessen. Aus den relativen Intensitäten der identischen Peptide wurde der Anreicherungsfaktor bestimmt.

Die in den zu vergleichenden *Pulldown*-Experimenten gebundenen Proteine wurden über eine SDS-PAGE in separaten Gelbahnen aufgetrennt und die Proteinbanden, die auf gleicher Höhe liefen, aus dem Gel herausgeschnitten. Der tryptische Verdau der Proteine erfolgte dann entweder in normalem Wasser oder in schwerem ^{18}O -Wasser, wodurch die carboxyterminale ^{18}O -Markierung der tryptischen Peptide erfolgte.

Im ersten Experiment wurden die an die WT-Domäne und somit spezifisch über die PRS-Bindungsstelle der Domäne gebundenen Proteine in Anwesenheit von ^{18}O -Wasser verdaut. Im Wiederholungsexperiment wurde die Markierung umgekehrt und der Verdau der an die WT-Domäne gebundene Proteine erfolgte in Anwesenheit von ^{16}O -Wasser (reverses Experiment). Die Messung beider Experimente erfolgte am Orbitrap-Massenspektrometer und lieferte eine ähnliche Anzahl an Proteinen, die mit mindestens zwei Peptiden identifiziert wurden. Etwa die Hälfte aller identifizierten Proteine stimmte in beiden Experimenten überein (Abbildung 3.24).

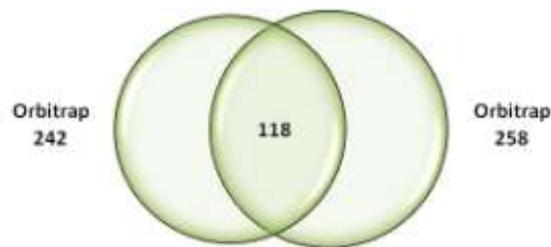


Abbildung 3.24: Venn-Diagramm der CD2BP2-GYF-Experimente. In beiden Experimenten wurde eine vergleichbare Anzahl an Proteinen identifiziert, von denen die Hälfte der Proteine in beiden Experimenten übereinstimmt.

Die Bestimmung der Anreicherungsfaktoren erfolgte mit dem Mascot Distiller (Version 2.3.2.0). Der erste Versuch, bei dem die gebundenen Proteine der WT-Domäne ^{18}O -markiert waren, wies ein extrem hohes $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -(H/L)-Verhältnis auf. Das $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -(H/L)-Verhältnis zeigte, dass nahezu keine ^{16}O -markierten Peptide für die unspezifischen Binder der W8R Y33A-Mutante identifiziert wurden. Bereits bei der Auftrennung der Proteine über die SDS-PAGE wurde deutlich, dass die Proteinbanden für die Doppelmutante im Vergleich zum WT-*Pulldown* schwächer waren (Abbildung 3.25).

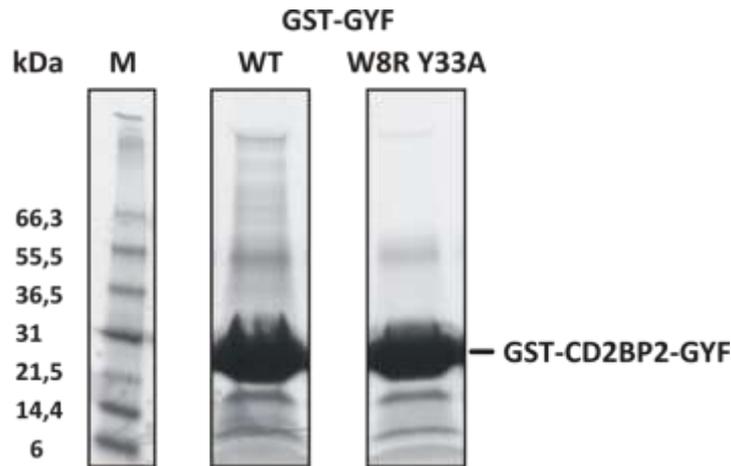


Abbildung 3.25: Gelbahnen der separat aufgetrennten *Pull-down*-Experimente mit Milzlysat.

Das starke Auftreten der ^{18}O -markierten Peptide war nicht auf eine unterschiedliche Beladung der Matrix zurückzuführen. Wie bereits in den Gelspuren der beiden *Pull-down*-Experimente zu erkennen ist, waren vergleichbare Mengen an GST-Fusionsprotein (WT und Mutante) in den in den Proben enthalten. Da durch die späte Zusammenführung der Proben eine Verschiebung des Mischverhältnisses nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde ebenfalls das $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Verhältnis von Peptiden der GST-Markierung betrachtet. Das $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Verhältnis GST-spezifischer Peptide betrug 2,3. Aus diesem Verhältnis ist erkennbar, dass die WT-Domäne und die daran gebundenen Proteine, im Vergleich zu Proteinen der mutierten Domäne, etwa doppelt so häufig vertreten waren. Die hohen Anreicherungsfaktoren der Proteine für die WT-Domäne lassen sich dadurch aber nicht erklären. Eine mögliche Erklärung ist, dass ausschließlich Proteine identifiziert wurden, die spezifisch über die zugängliche PRS-Bindungsstelle der WT-GYF-Domäne gebunden haben.

Auch in dem Wiederholungsexperiment zeigte sich, dass die Proteine für die WT-Domäne (^{16}O -markiert) wesentlich stärker angereichert waren als für die mutierte Domäne. In Abbildung 3.26 sind auszugsweise drei Peptidspektren des Wiederholungsexperimentes gezeigt, bei dem die Markierung umgekehrt wurde. Die Peptidspektren repräsentieren dabei ein Peptid des unspezifisch gebundenen Proteins Hbb1 (DFTPAAQAAFQK, L/H: 1,58), ein Peptid des GST-Tags (MSPILGYWK, L/H: 0,8) und eines des spezifisch über die PRS-Bindungsstelle gebundenen SF04 (AGSTGSFPAPANSLR, L/H: 53,8). Die Peptidspektren lassen deutlich den Unterschied in den Signalintensitäten für ein unspezifisches Protein im Vergleich zu einem spezifisch gebundenen Protein erkennen. Ein unspezifisch gebundenes Protein weist ein deutliches ^{18}O -Signal auf, wohingegen bei einem spezifisch gebundenen Protein das ^{18}O -Signal sehr klein war.

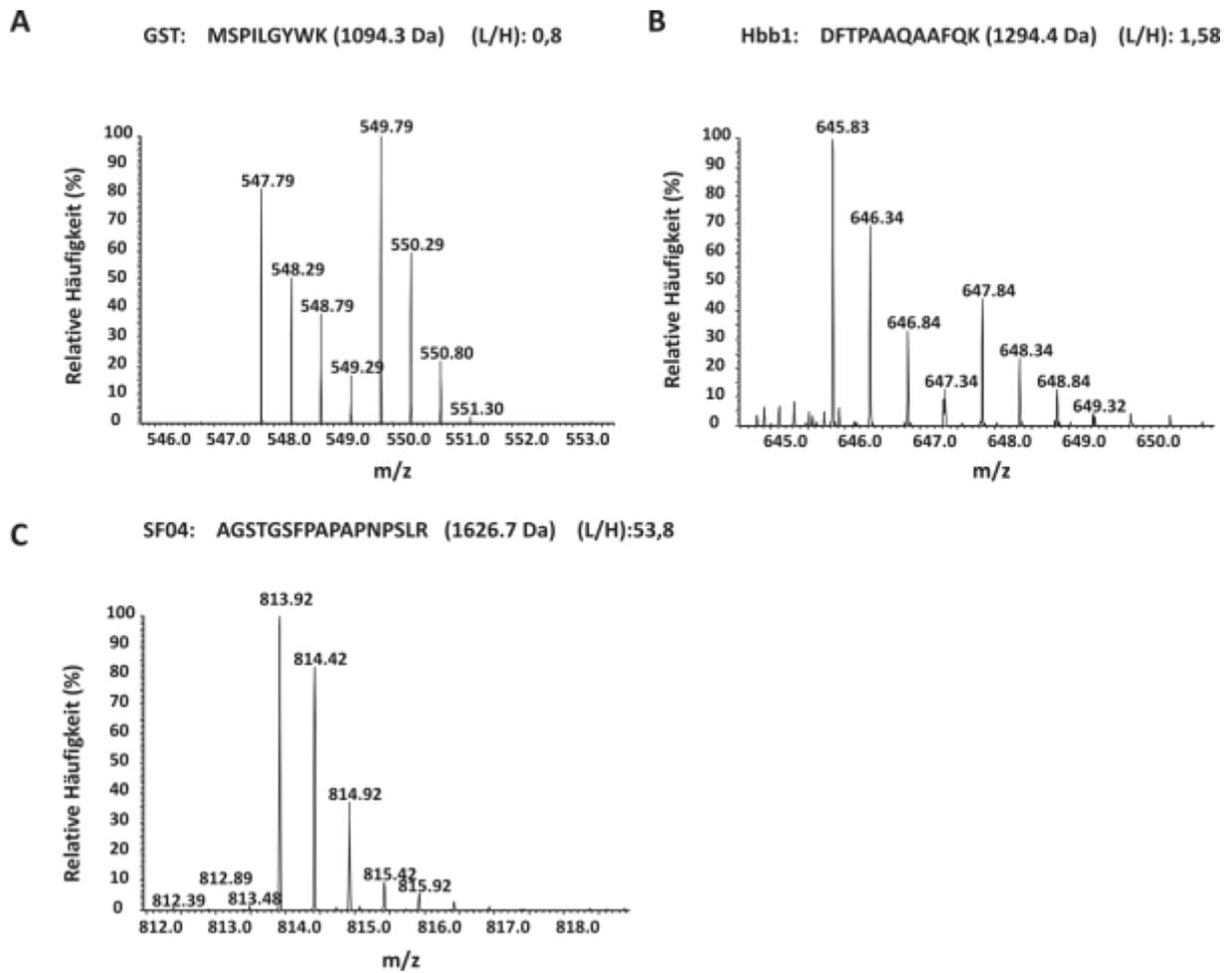


Abbildung 3.26: Peptidspektren des zweiten CD2BP2-GYF-Pulldown mit murinem Milzlysat. Spezifisch über die PRS-Bindungsstelle der CD2BP2-GYF-Domäne gebundene Proteine waren ^{16}O -markiert. (A) Spektrum eines GST-Peptids. (B) Spektrum eines Peptids des unspezifisch gebundenen Proteins Hbb1. (C) Peptidspektrum des spezifisch an die WT-GYF-Domäne gebundenen Proteins SF04.

Aus der Auftragung der Anreicherungsfaktoren für die in beiden Versuchen gefundenen Proteine wird deutlich, dass nahezu alle Proteine (107 von 118) in beiden Experimenten angereichert waren (Abbildung 3.27, rechts) und kaum unspezifisch gebundene Proteine auftauchten. Da nicht alle Proteine ein Bindungsmotiv für die Domäne aufwiesen, ist davon ausgehen, dass es sich um kopräzipitierte Proteinkomplexe handelte.

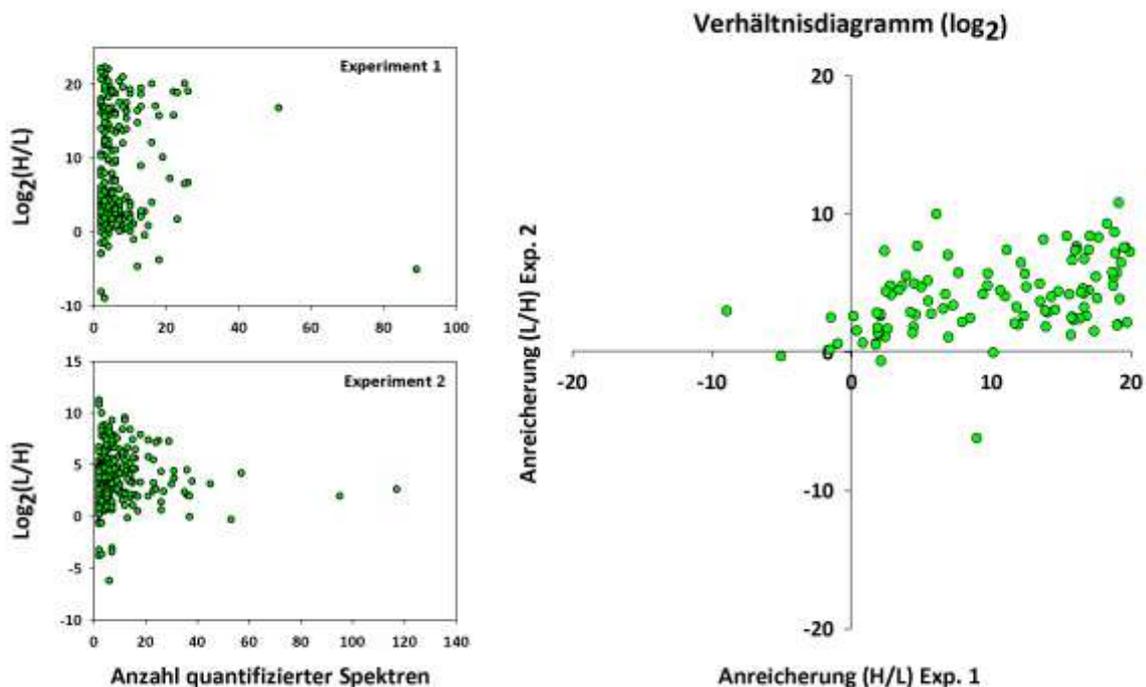


Abbildung 3.27: Streudiagramme und Verhältnisdiagramm beider CD2BP2-GYF-Experimente. Die Streudiagramme (links) zeigen die Auftragung der Anreicherungsfaktoren gegen die Anzahl quantifizierter Spektren. Für die einzelnen Experimente zeigten sich deutlich angereicherte Proteine. Das Verhältnisdiagramm (rechts) verdeutlicht, dass es sich nur um angereicherte Proteine handelt, die in beiden Experimenten gefunden werden.

Etwa die Hälfte aller angereicherten Proteine waren spleißosomale oder dem Spleißprozess-assoziierte Proteine. Neben den spleißosomalen Proteinen wurden Proteine identifiziert, die an 3' Endprozessierungsreaktionen von mRNA (Spaltung und Polyadenylierung) beteiligt sind. Auch Proteine des SWI/SNF-Komplexes, einem an der Chromatin-Remodelierung beteiligten Komplex, und weitere Transkriptionsaktivatoren wurden kopräzipitiert. Als gewebe-spezifische Proteine wurden das an der Adhäsion von T-Zellen beteiligte Protein CYFIP2 (*Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2*)^[128], die vor allem in hämatopoetischen Organen exprimierte MEK Kinase Kinase 1 (*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1, M4K1*)^[129, 130] und die während der Hämatopoese benötigte Kinase Cdk13 (*Cyclin-dependent kinase 13*)^[131, 132] gefunden (Abbildung 3.28).

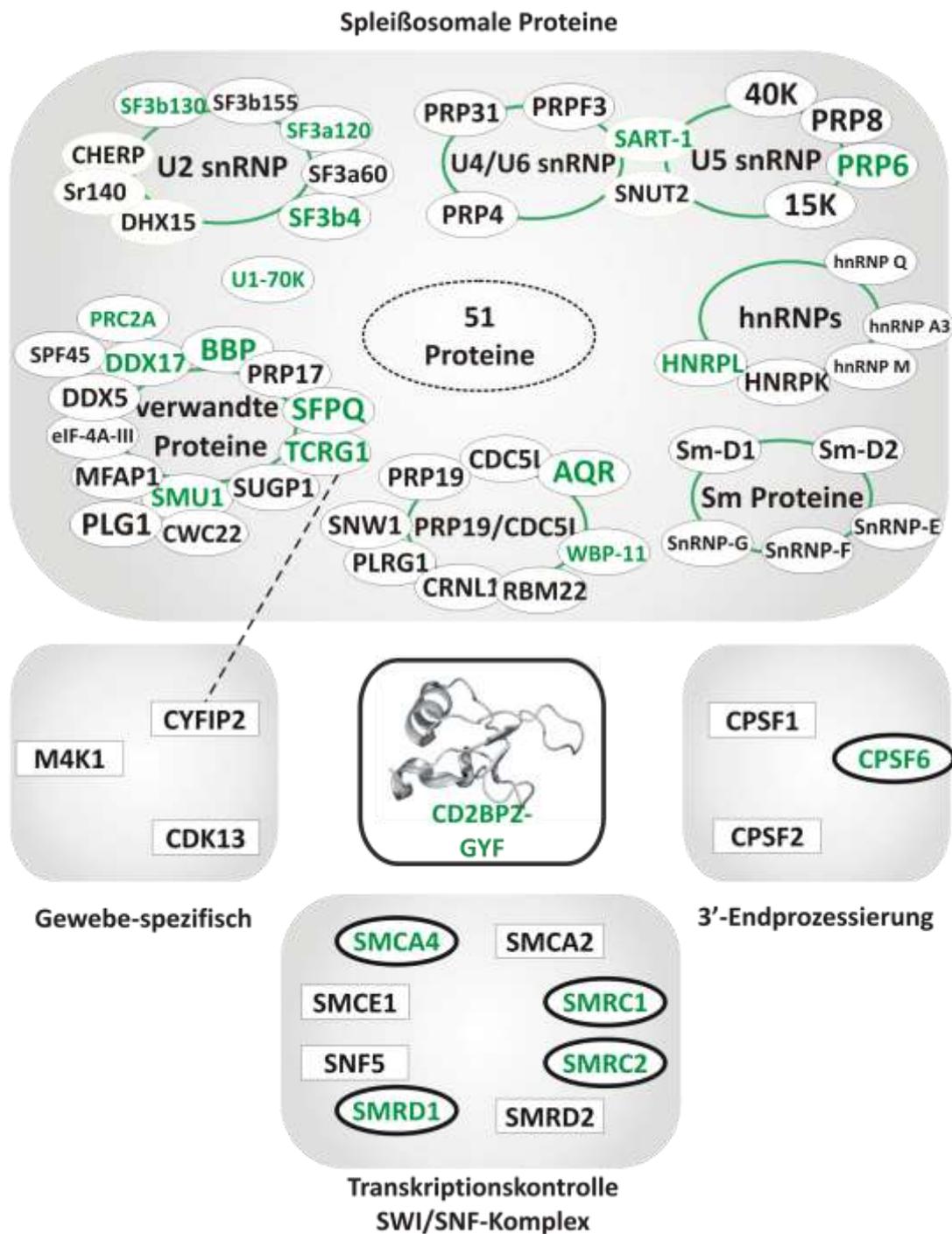


Abbildung 3.28: Interaktom der GYF-Domäne von CD2BP2 (Hs). Die identifizierten Bindungspartner der humanen GYF-Domäne von CD2BP2 lassen sich in vier Gruppen einteilen: spleißosomale Proteine, Faktoren der mRNA-3'-Prozessierung, Proteine der Transkriptionskontrolle und Proteine, die spezifisch für die Milz sind. Die meisten Proteine gehören zur Gruppe der spleißosomalen Proteine. Proteine, die ein Bindungsmotiv für die CD2BP2-GYF-Domäne besitzen, sind in Grün hervorgehoben.

3.5 Inhibition der PRS-Bindungsstelle der GYF Domänen von CD2BP2 und GIGYF2

Protein-Protein-Interaktionen spielen eine entscheidende Rolle in vielen zellulären Signalwegen. Zur Aufklärung essentieller Protein-Protein-Interaktionen, der Charakterisierung von Proteinfunktionen sowie für therapeutische Zwecke ist es von großem Interesse, diese Interaktionen *in vivo* inhibieren zu können. Eine gängige Methode der Inhibition ist die Verwendung von Peptidmimetika, die einen der beteiligten Interaktionspartner strukturell nachahmen und die Interaktion somit inhibieren. Auch synthetische niedermolekulare Moleküle („*small molecules*“), die ebenfalls in der Lage sind diese Interaktionen zu verhindern, werden eingesetzt.

3.5.1 Inhibition der PRS-Bindungsstelle durch ein Peptidmimetikum

In Zusammenarbeit mit der AG Kühne (FMP, Berlin) sollte die Eignung eines strukturell modifizierten Peptidliganden (Abbildung 3.29) für die Inhibition der CD2BP2-GYF-Domäne vermittelten Proteininteraktion untersucht werden.

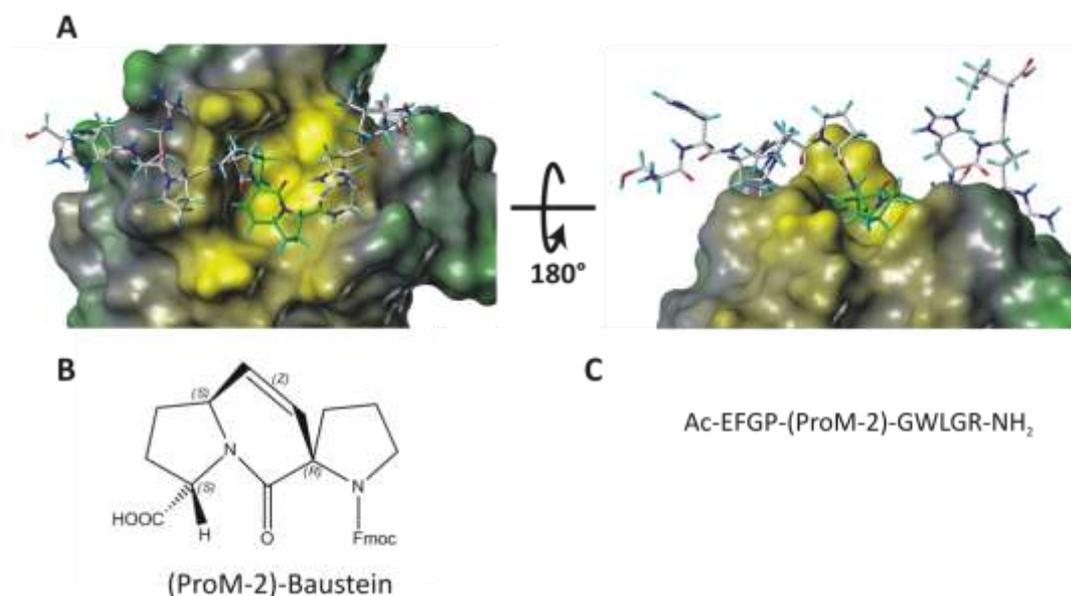


Abbildung 3.29: Modellierung eines Peptidmimetikums für die GYF-Domäne von CD2BP2. (A) Modell des Komplexes der CD2BP2-GYF-Domäne mit dem Liganden SHRPP-(ProM-2)-GHRV, erstellt von Herrn Dr. Kühne. Der für das Diprolin einzubauende und als (ProM-2) bezeichnete Baustein ist in (B) abgebildet. Die gedrehte Bindung des Spirozenters ist durch das R gekennzeichnet. (C) Sequenz des optimierten Phagen-Display-Liganden mit integriertem (ProM-2)-Baustein.

Da alle Liganden der GYF-Domänen das Kernmotiv PPG besitzen, wurde das Diprolinmotiv als Ausgangspunkt für die Identifizierung und Optimierung eines affinen Peptidliganden

gewählt. Das Motiv wurde durch ein synthetisches Peptid mit PPII-Helixkonformation und flankierenden Aminosäureresten ersetzt. Das resultierende Peptidmimetikum sollte sterisch in die hydrophobe Furche passen und die optimale Ausrichtung der flankierenden Aminosäurereste gewährleisten.

Unter Verwendung einer existierenden NMR-Struktur der CD2BP2-GYF-Domäne (PDB: 112Z) wurde von Herrn Dr. R. Kühne durch computergestützte Modellierung ProM-2 als geeigneter Baustein vorgeschlagen, um das Diprolinmotiv zu ersetzen. Die Synthese des (ProM-2)-Bausteins wurde von Cédric Reuter (AG Schmalz, Universität zu Köln) unter Verknüpfung der beiden Ringsysteme durch ein Spiro-Zentrum realisiert. Die Vorlage für das Peptidmimetikum lieferte die aus einem Phagen-Display-Experiment stammende Peptidsequenz EFGPPPGWLGR. Für dieses als PD1 bezeichnete Peptid wurde mittels NMR-Titration ein K_d -Wert von $13 \mu\text{M}$ für die GYF-Domäne ermittelt, der im Vergleich zum CD2-Liganden (SHRPPPPGHRV, $K_d \sim 159 \mu\text{M}$) eine zehnfach höhere Affinität für die GYF-Domäne aufweist^[36]. Das EFGP-(ProM-2)-GWLGR-Peptid wurde in der AG Beyermann (FMP, Berlin) synthetisiert. Die Bestätigung der Bindung des Liganden an die GYF-Domäne erfolgte durch NMR-Titration (Abbildung 3.30) in Form von Ligandenkonzentrationsabhängigen Resonanzverschiebungen.

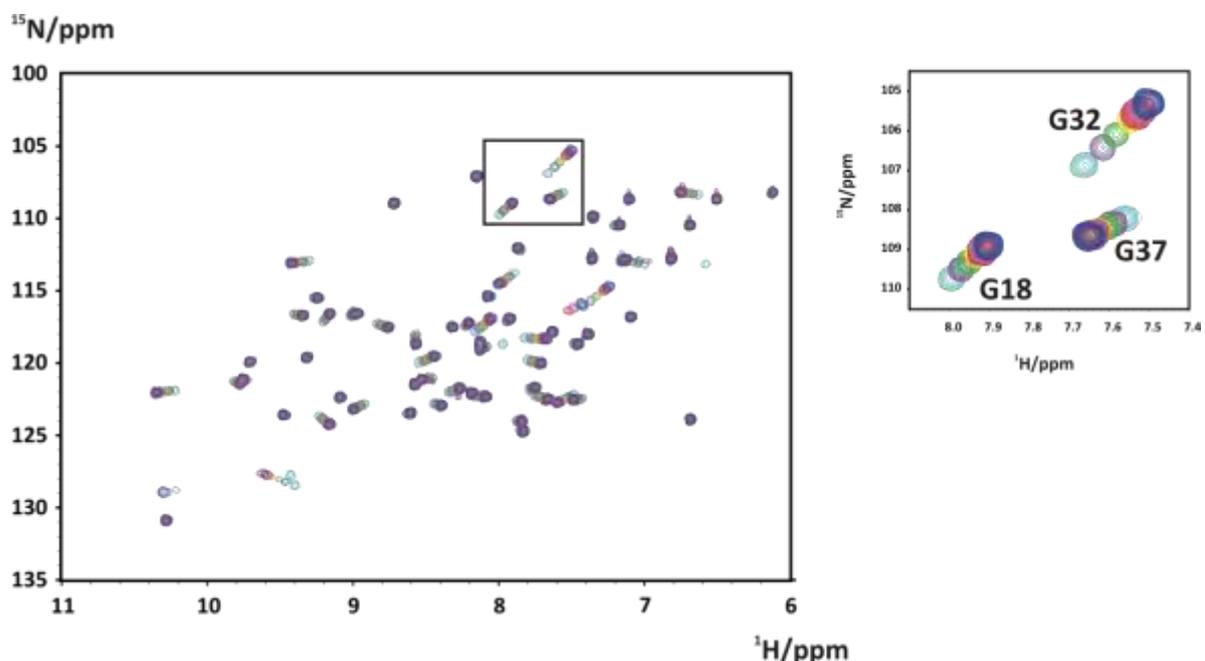


Abbildung 3.30: NMR-Titration der GYF-Domäne von CD2BP2 mit dem EFGP-(ProM-2)-GWLGR-Peptid. (A) Überlagerung der HSQC-Spektren der einzelnen Titrationsschritte. Mit zunehmender Ligandenkonzentration kommt es zu einer deutlichen Änderung der chemischen Verschiebung der N-H-Resonanzen von an der Bindung beteiligten Aminosäuren. Die Peptidkonzentration in den einzelnen Spektren beträgt dabei $0 \mu\text{M}$ (cyan), $50 \mu\text{M}$ (violett), $100 \mu\text{M}$ (grün), $200 \mu\text{M}$ (gelb), $300 \mu\text{M}$ (rot), $400 \mu\text{M}$ (pink) und $880 \mu\text{M}$ (blau). (B) Vergrößerter Ausschnitt des NMR-Spektrums, der die Ligandenbindung zeigt (mit angegebener Zuordnung der Aminosäuren).

Die Kurvenanpassung von 12 Resonanzverschiebungen an ein äquimolares Bindungs-Modell (Abbildung 3.31) lieferte eine Dissoziations-Gleichgewichtskonstante (K_d) von $129 \pm 12 \mu\text{M}$. Im Vergleich dazu erweist sich das Wildtyp-Peptid mit einem K_d -Wert von ca. $13 \mu\text{M}$ somit als zehnfach affiner zur GYF-Domäne.

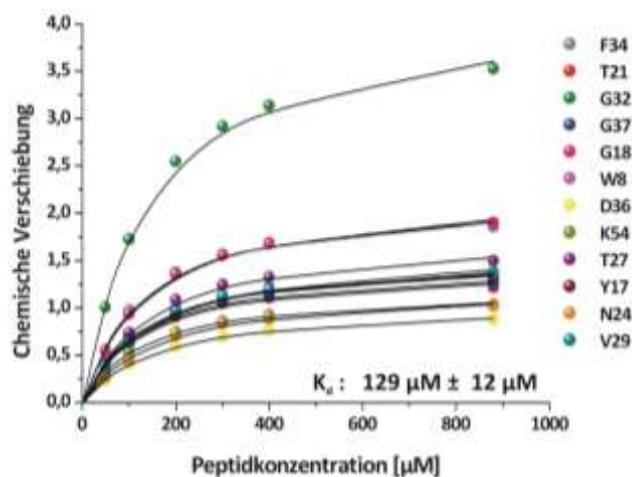


Abbildung 3.31: K_d -Bestimmung des CD2BP-GYF/FGP(ProM-2)GWLGR-Komplexes. Die Bestimmung der Dissoziationskonstante erfolgte durch die Auftragung 12 sich signifikant ändernder Resonanzverschiebungen gegen die steigende Ligandenkonzentration. Unter der Annahme einer äquimolaren Bindung ergab sich eine Bindungskonstante von $129 \mu\text{M} \pm 12 \mu\text{M}$. Der angegebene Fehlerwert entspricht der Standardabweichung der einzelnen Fit-Fehler.

Das Resultat macht deutlich, dass der synthetische Baustein gegenüber einem Diprolin-Motiv die Bindung des Peptids nicht verbessert.

3.5.2 Bestimmung der Dissoziationskonstanten Fluorescein-gekoppelter Peptide

Niedermolekulare, nicht-peptidische synthetische Verbindungen („*small molecules*“) werden häufig für die Inhibition von Protein-Protein-Interaktionen herangezogen. Für die Suche nach einem geeigneten Molekül, das sich als Inhibitor der PRS-Bindungsstelle von GYF-Domänen eignet, sollte eine Bibliothek kleiner organischer Moleküle auf ihre Bindung an die GYF-Domäne untersucht werden. In einem Fluoreszenzpolarisations-(FP)-Experiment im Hochdurchsatzverfahren, sollte die ChemBioNet-Bibliothek (www.chembionet.info), die 16896 solcher Verbindungen umfasst, durchsucht werden.

Für die FP-Experimente synthetisierte Dr. Viviane Uryga-Polowy (ehemals AG Rademann, FMP, Berlin) Peptide, die N-Terminal mit dem Fluorophor Fluorescein (Abbildung 3.32) gekoppelt waren^[133].

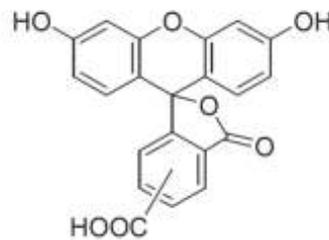


Abbildung 3.32: 5(6)-Carboxyfluorescein. Die N-terminale Markierung der Peptide für FP-Experimente erfolgte mit 5(6)-Carboxyfluorescein.

Für die Synthese von Fluorescein-gekoppelten CD2BP2- und GIGYF2-GYF-Domänen wurden die Ausgangs-peptidsequenzen aus bereits durchgeführten Phagen-Display-Experimenten übernommen^[37]. Für die GYF-Domäne von GIGYF2 wurde noch eine zweite Peptidsequenz, die ein PPGL-Motiv und eine gute Bindung an die Domäne zeigt (M. Kofler, unpublizierte Ergebnisse), auf ihre Eignung für FP-Experimente untersucht. Um ein geeignetes Peptid für den FP-Assay zu identifizieren, wurde außerdem der Einfluss der Peptidlänge auf die Bindung untersucht. Fünf ausgewählte Peptide wurden aufgrund ihrer hohen Affinität für die Domänen (Vorexperimente von Dr. Uryga-Polowy) mittels NMR-Spektroskopie auf ihre Bindungseigenschaften untersucht und ihre Dissoziationskonstanten bestimmt (Abbildung 3.3). Obwohl die NMR-Spektroskopie aufgrund ihrer Insensitivität mit einem wesentlich größeren Materialverbrauch als die FP-Experimente einhergeht, bietet sie dennoch den Vorteil, Peptidbindungen auf atomarer Ebene beobachten zu können. Somit erlaubt die NMR-Spektroskopie festzustellen, ob das Peptid an der PRS-Bindungsstelle der Domäne bindet. Beide Methoden, NMR- und FP-Spektroskopie, wurden komplementär zur Identifizierung der Peptide mit den höchsten Affinitäten angewandt, die für nachfolgende FP-basierte Konkurrenzexperimente mit den *small molecules* eingesetzt werden sollten.

Da die kleinen organischen Moleküle der Bibliothek standardmäßig in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst vorlagen, wurde für alle NMR-Messungen eine 5% (v/v)-ige DMSO-Endkonzentration der NMR-Proben und Peptidlösungen eingestellt. Höhere Konzentrationen an DMSO wurden vermieden, da DMSO zu einer zusätzlichen Verschiebung der NMR-Signale führt (Abbildung 3.36, B).

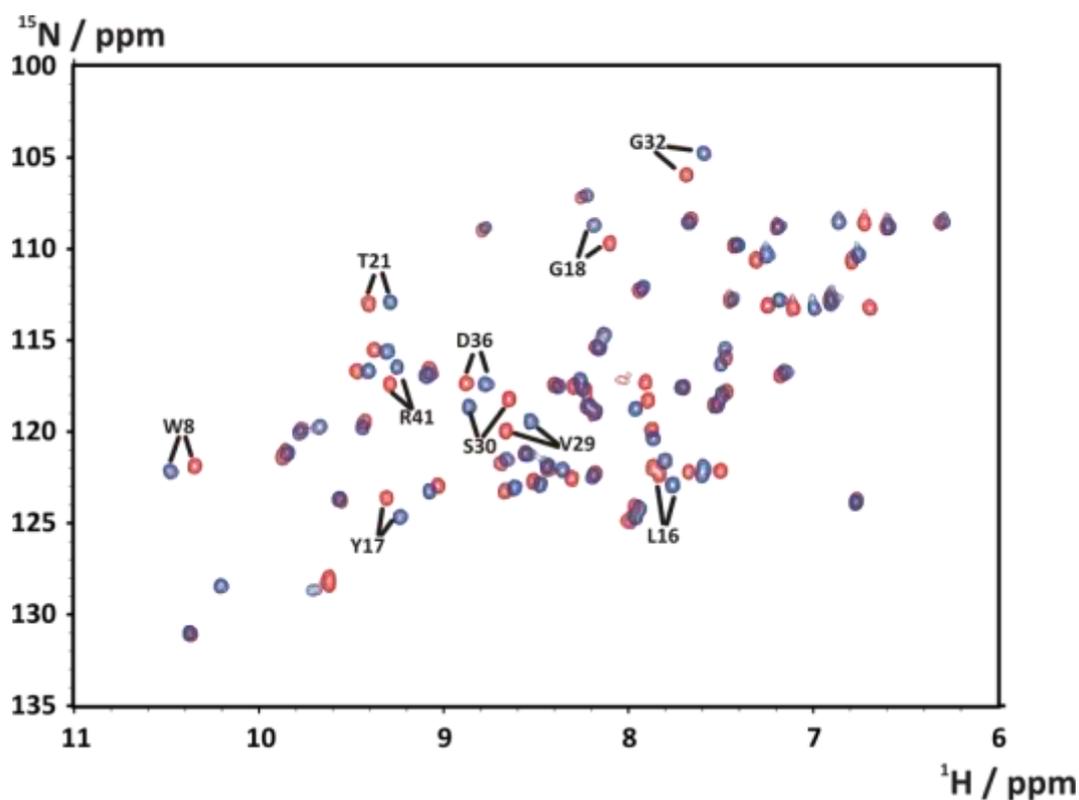


Abbildung 3.33: NMR-Untersuchung der CD2BP2-GYF/VUP496-Interaktion. Gezeigt ist die Überlagerung der HSQC-Spektren vor und nach der Interaktion der CD2BP2-GYF-Domäne mit dem Peptid VUP496 (Fluorophor-gekoppelt, Fluo-EFGPPPGWLGR-NH₂). Zehn Resonanzen mit den größten Veränderungen in ihren chemischen Verschiebungen nach Titration von 2 mM des Peptids VUP496 (blaues Spektrum) sind anhand ihres Aminosäurerestes und ihrer Position gekennzeichnet. Der ungebundene Zustand der CD2BP2-GYF-Domäne ist im roten Spektrum zu erkennen.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante wurden einzelne NMR-Proben der ¹⁵N-markierten Domäne gegen steigende Konzentration der Fluorophor-gekoppelten Peptide titriert. Die Proteinkonzentration betrug jeweils 100 μM in PBS mit 10% (v/v) D₂O und 5% (v/v) DMSO. Aus den HSQC-Spektren der einzelnen Titrationsschritte wurden die Verschiebungsindizes von 10 Resonanzen ermittelt. Durch Auftragung der chemischen Verschiebungen gegen steigende Peptidkonzentrationen unter Annahme einer äquimolaren Bindung wurde der K_d-Wert als Mittelwert der einzelnen Bindungskonstanten bestimmt (Abbildung 3.34).

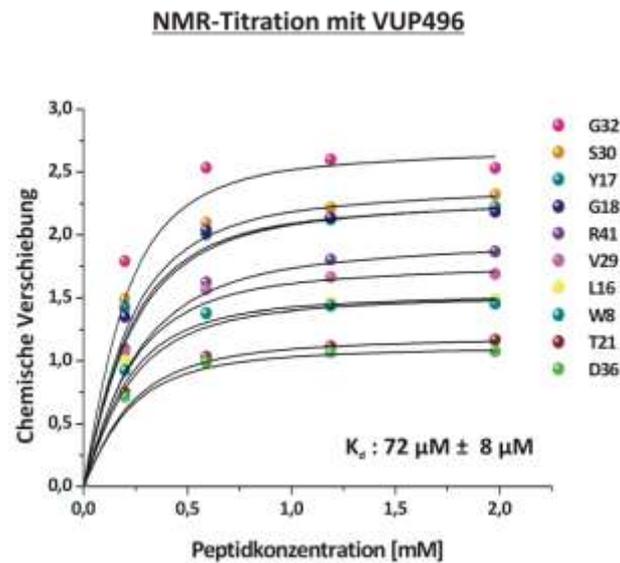


Abbildung 3.34: Bestimmung der Dissoziationskonstante des CD2BP2-GYF/VUP496-Komplexes. Die K_d -Bestimmung erfolgte durch NMR-Titration von His-GYF62 mit dem Peptid VUP496. Die Änderungen der chemischen Verschiebungen von zehn Resonanzen, bezeichnet nach Aminosäurerest und Nummer, wurden gegen steigende Peptidkonzentrationen aufgetragen. Der K_d -Wert wurde als Mittelwert der einzelnen Bindungskurven bestimmt.

In Tabelle 3.3 sind die durch FP- und NMR-Messungen ermittelten Daten der fünf untersuchten Peptide zum Vergleich gegenübergestellt. Die durch NMR ermittelten K_d -Werte sind deutlich höher als die aus den FP-Experimenten resultierenden. Der Grund dafür liegt einerseits in der Insensitivität der NMR-Spektroskopie, andererseits wurden aufgrund des höheren experimentellen Aufwands auch weniger Titrationsschritte für die Bestimmung der Bindungskonstanten durchgeführt. Dennoch lieferten beide Methoden innerhalb einer Größenordnung übereinstimmende K_d -Werte.

Tabelle 3.3: K_d -Werte N-Terminal Fluorescein-markierter Peptide für die GYF-Domänen von CD2BP2 und GIGYF2.

Name	Peptidsequenz	Zielprotein	FP	NMR
			K_d (μM)	K_d (μM)
VUP496	Fluo E F G P P P G W L G R	CD2BP2	$12 \pm 1,9$	72 ± 8
VUP351	Fluo P P G W L G R	CD2BP2	295 ± 33	728 ± 118
VUP345	Fluo P P G L S R D	GIGYF2	177 ± 24	311 ± 52
VUP346	Fluo S P P G L S R D	GIGYF2	690 ± 218	487 ± 115
VUP357	Fluo W R P G P P P P P P G L V	GIGYF2	75 ± 16	119 ± 11

Als Tendenz deutet sich an, dass kürzere Peptide eine geringere Bindungsaffinität zeigen als längere Peptide. Diese Beobachtung beruht vermutlich auf der Distanz zwischen dem PPG-Motiv des Liganden und dem Fluorescein. Da in den kürzeren Peptiden das Fluorescein das PPG-Motiv direkt flankiert, ist eine sterische Hinderung hervorgerufen durch das Fluorescein, denkbar. Für die anschließend durchgeführte FP-Hochdurchsatz-Analyse mit der CD2BP2-GYF-Domäne wurde aufgrund seiner höchsten Bindungsaffinität das Peptid VUP496 ausgewählt.

3.5.3 Validierung der *small molecules*

Die FP-basierte Hochdurchsatz-Analyse der GST-fusionierten GYF-Domäne von CD2BP2 mit dem Peptid VUP496 unter Verwendung der ChemBioNet-Bibliothek (durchgeführt von Dr. Uryga-Polowy) lieferte insgesamt zehn Substanzen, durch welche die Verdrängung des gebundenen Peptids verursacht worden sein könnten. Sechs der Verbindungen, die in mg-Maßstab käuflich erworben werden konnten, wurden auf ihre Fähigkeit zur Bindung an die GYF-Domäne mittels NMR-Spektroskopie untersucht (Abbildung 3.35).

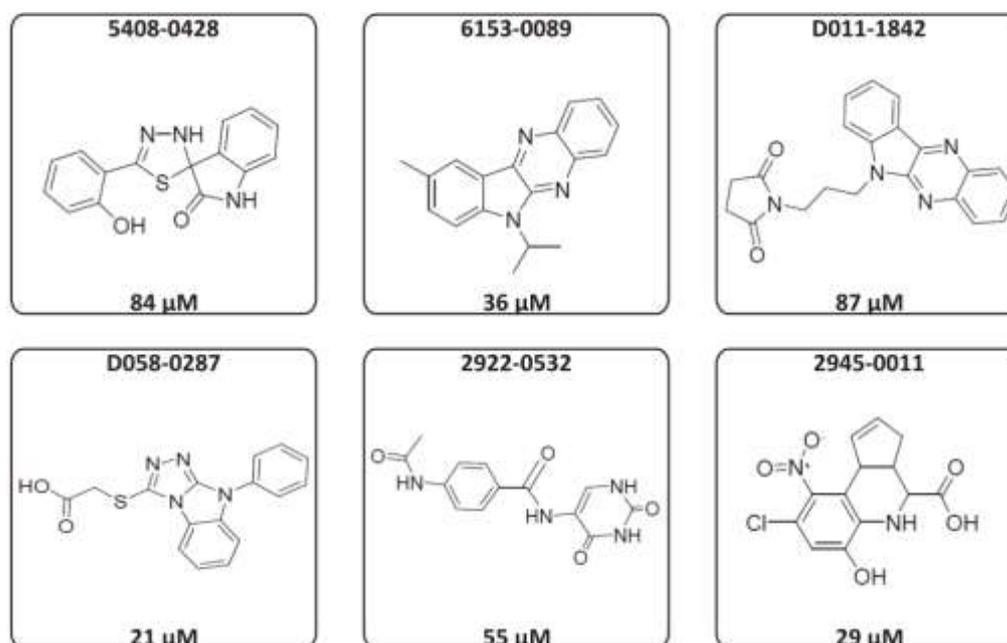


Abbildung 3.35: Identifizierte Kleinmoleküle der FP-Assays. Abgebildet sind die Strukturformeln und K_d -Werte von sechs potentiellen Kompetitor-Substanzen der VUP496-Bindung an die CD2BP2-GYF-Domäne, die mittels FP-Experiment identifiziert wurden. Die Bezeichnung der Moleküle wurde vom Produzenten (ChemDiv Inc., San Diego, USA) übernommen.

Die Verbindungen wurden in 100% DMSO aufgenommen. Die Konzentrationen der Stammlösungen betragen entweder 50 oder 100 mM.

Wie bereits erwähnt, sollte eine DMSO-Endkonzentration von 5% (v/v) bei NMR-Experimenten nicht überschritten werden, um DMSO-induzierte Veränderung der chemischen Verschiebungen zu minimieren. Für Verbindung 6153-0089 stellte sich heraus, dass die Substanz bereits bei einer Konzentration von 50 mM in 100 % (v/v) DMSO unlöslich war und wurde daher in den folgenden Experimenten nicht verwendet.

Die verbleibenden fünf Verbindungen wurden auf ihre Bindung an die GYF-Domäne mittels NMR untersucht. Zunächst wurden die Interaktionspartner separat vermessen. Die Proteinkonzentration betrug 150 μ M, die eingesetzte Ligandenkonzentration 200 μ M. Die Verbindungen 2945-0011 und D058-0287, deren K_d -Werte laut FP-Assay 21 μ M und 29 μ M betragen, zeigten unter diesen Bedingungen Resonanzverschiebungen. Die Verbindungen (2945-0011 und D058-0287) wurden noch einmal in den Konzentrationen 1,09 mM und 1,98 mM getestet. Die DMSO-Konzentration in den NMR-Proben betrug maximal 3,07% (v/v). Für die Verbindung 2945-0011 zeigten sich erst bei einer Konzentration von 1,98 mM Resonanzverschiebungen (Abbildung 3.36, A), die sich von den nur durch DMSO hervorgerufenen unterscheiden (Abbildung 3.36, B).

Auch die Verbindung D058-0287 zeigte in ersten Messungen Resonanzverschiebungen bei einer Ligandenkonzentration von 0,2 mM (Abbildung 3.37). Die zu beobachtenden Verschiebungen ähneln jedoch denen, die durch DMSO hervorgerufen werden. Das Resultat war unerwartet, da die DMSO-Konzentration in der Probe lediglich 0,2% (v/v) betrug. Interessanterweise wurden ähnliche Verschiebungen bei der Konzentrationserhöhung des Liganden auf 1,09 mM nicht mehr beobachtet (siehe 6.8, Abbildung 4, Anhang).

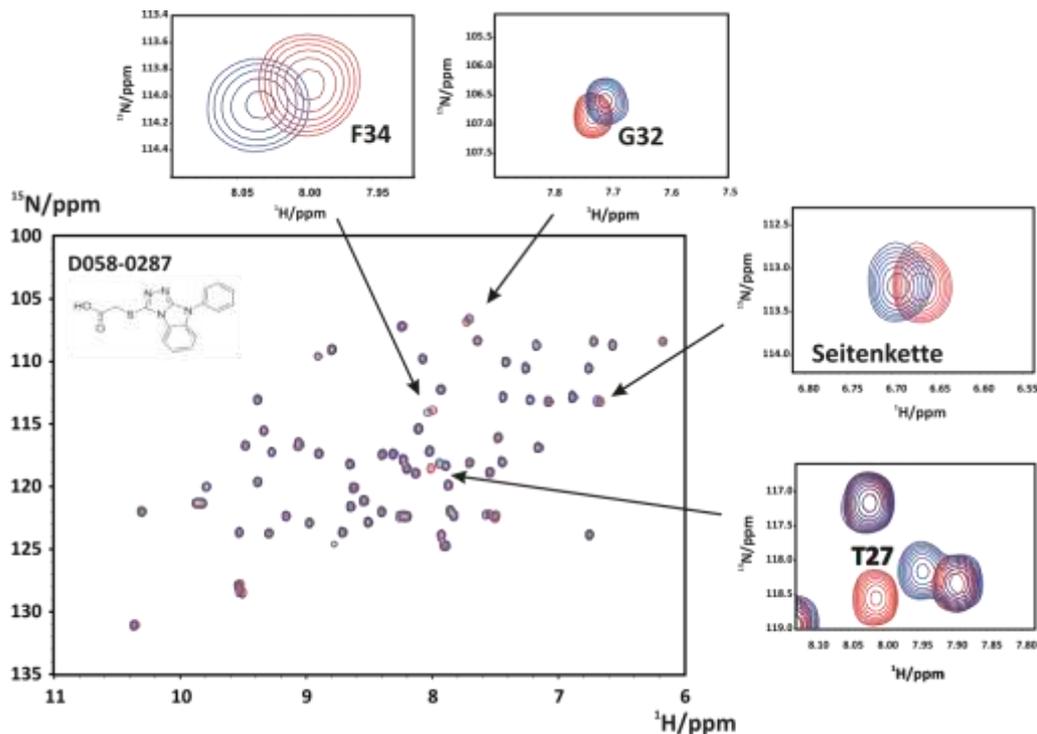


Abbildung 3.37: Untersuchung der Bindung von D058-0287 an die CD2BP2-GYF-Domäne. Die Verbindung D058-0287 führt bei einer Konzentration von 0,2 mM zu Resonanzverschiebungen der GYF-Domäne (blau) im Vergleich zur ungebundenen Domäne (rot). Die DMSO-Konzentration beider NMR-Proben betrug 0,2% (v/v).

Für die fünf untersuchten Verbindungen konnte mithilfe der NMR-Untersuchungen keine eindeutige Aussage über ihre Bindung an die GYF-Domäne getroffen werden.

3.5.4 Verdrängungsexperiment mit D058-0287

Da für keine der fünf Verbindungen eine eindeutige Bindung an die GYF-Domäne beobachtet werden konnte, wurde die Verbindung D058-0287, die im FP-Experiment die höchste Affinität zur GYF-Domäne aufwies, auf seine Fähigkeit zur Competition eines an die GYF-Domäne gebundenen Peptids untersucht. Dazu wurden insgesamt drei HSQC-Spektren der GYF-Domäne aufgenommen: 1) ungebundene GYF-Domäne, 2) GYF-Domäne mit gebundenem Peptid VUP496 und 3) Komplex aus GYF-Domäne und VUP496 zusammen mit Kompetitor D058-0287. Die Bindung des Peptids an die GYF-Domäne resultierte in den erwarteten Peakverschiebungen gegenüber der ungebundenen GYF-Domäne (Abbildung 3.26A). Für das dritte Experiment wurde der Ligand in einer Konzentration von 2,1 mM zur GYF/VUP496-Probe gegeben. Falls der Ligand die Fähigkeit besitzen sollte, das gebundene Peptid zu verdrängen, sollte dies in chemischen Verschiebungen der freien Domäne

resultieren. Um einen DMSO-Effekt auszuschließen, wurde die Verbindung lyophilisiert und in PBS rekonstituiert. Die Überlagerung der einzelnen Spektren belegt, dass die Zugabe des Kompetitors nicht dem Spektrum der ungebundenen Domäne entspricht (Abbildung 3.38 B).

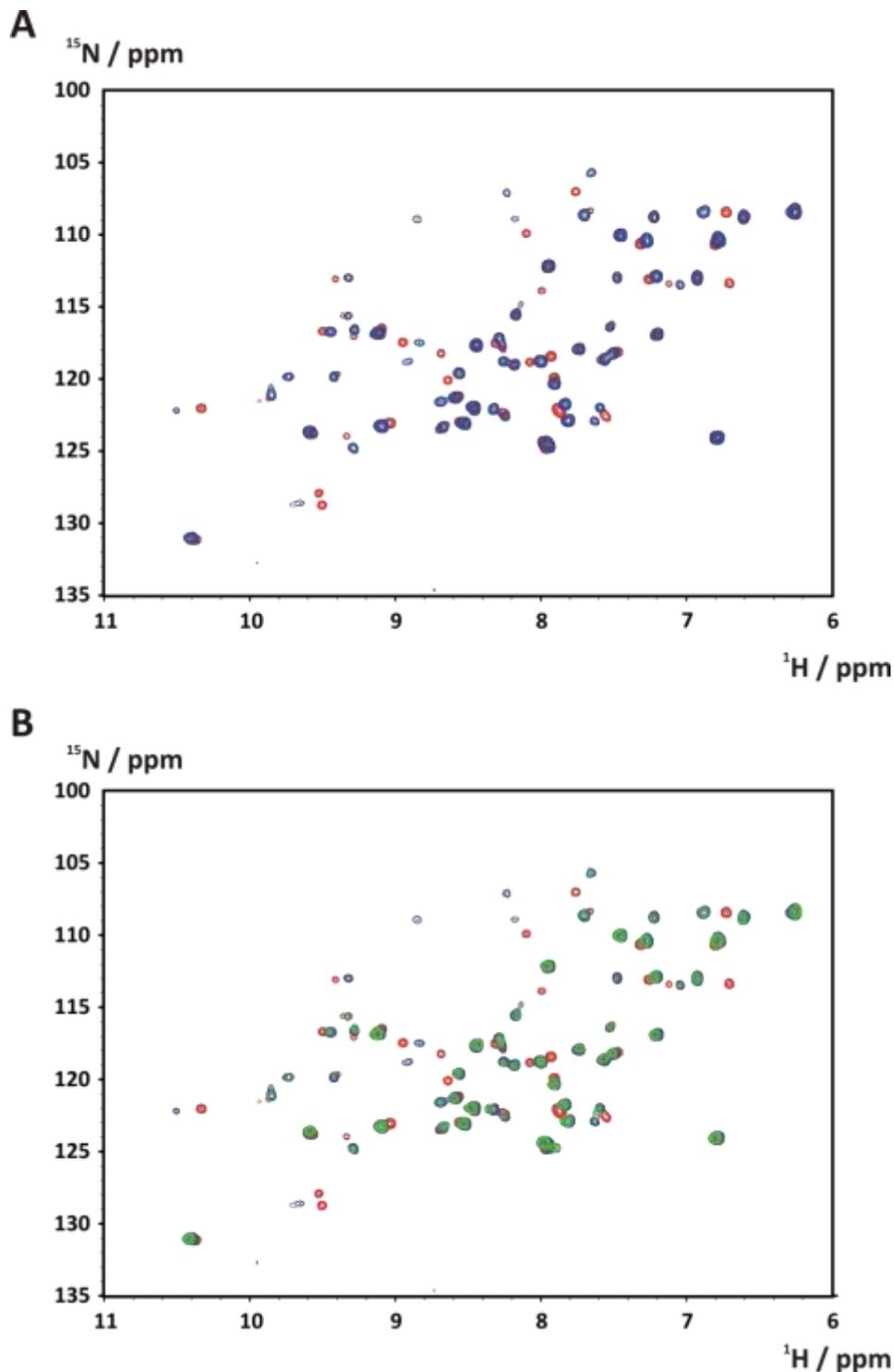


Abbildung 3.38: Verdrängungstest des Liganden VUP496 durch das *small molecule* D058-0287. (A) Überlagerungsspektrum der ungebundenen GYF-Domäne von CD2BP2 (rot) und nach Zugabe des Peptids VUP496 (0,3 mM, blaues Spektrum). (B) Das grüne Spektrum entspricht der Messung der Probe nach Zugabe der Verbindung D058-0287 in einer finalen Konzentration von 2,1 mM. Aus der Überlagerung der Spektren wird ersichtlich, dass die Zugabe des Moleküls nicht in der ungebundenen Form der Domäne resultiert (rot), sondern dem des gebundenen Peptids (blau) entspricht.

Die durchgeführten Experimente zur Bestimmung der Bindung der Kleinmoleküle an die GYF-Domänen konnten die Ergebnisse des FP-Assays nicht bestätigen. Es konnte weder eine eindeutige Bindung der Moleküle an die Domäne gezeigt werden, noch eine Verdrängung des gebundenen Peptids VUP496 durch das Molekül D058-0287 beobachtet werden. Auffällig war, dass alle Verbindungen stark gelb oder orange gefärbt waren und zudem nicht alle Verbindungen in wässriger Lösung löslich waren sondern präzipitierten.

Die Verbindungen wurden daraufhin in einem FP-Assay mit GST getestet. Es zeigte sich, dass es sich bei den Verbindungen um falsch positive Treffer handelt, da ein ähnlicher Effekt wie bei der GST-GYF Domäne zu beobachten war (Viviane Uryga-Polowy, persönliche Kommunikation).

4 Diskussion

Proteine sind an den meisten biologischen Prozessen in der Zelle beteiligt. Oftmals agieren sie dabei nicht als isoliertes Protein, sondern bilden über Interaktionen mit anderen Proteinen stabile oder auch transiente Komplexe aus. Daher hilft die Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) bei der Aufklärung der zellulären Funktion eines Proteins. Gering affine PPIs zwischen modularen Proteindomänen und kurzen Peptidsequenzen innerhalb ihrer Bindungspartner spielen eine entscheidende Rolle bei der intrazellulären Signalweiterleitung. Eine wichtige Klasse solcher PPIs ist die Erkennung prolinreicher Sequenzen (PRS) durch PRS-Bindungsdomänen, zu denen auch die GYF-Domäne gehört. Nachdem das Bindungsmotiv für die beiden GYF-Unterfamilien ermittelt wurde^[36, 37], liegt nun das Interesse in der Bestimmung des Interaktoms der GYF-Domänen verschiedener Proteine. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollten dazu beitragen, die Protein-Protein-Interaktionen der GYF-Domänen der humanen Proteine CD2BP2 und GIGYF2 sowie des Hefeproteins Smy2 mit Hilfe verschiedener Methoden der quantitativen Massenspektrometrie (MS) zu entschlüsseln. Zudem sollte die Eignung der hier gewählten Methoden für die Interaktombestimmung der GYF-Domänen im Vergleich zu anderen Methoden der PPI-Bestimmung bewertet werden.

4.1 Methoden der Proteomanalyse

Zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen haben sich diverse Methoden durchgesetzt, die unter anderem die *Yeast-2-Hybrid*-Methode (Y2H), Protein-*Microarray* basierte Methoden und das Phagen-Display umfassen^[134]. Neben der direkten Untersuchung physischer Proteininteraktion werden, insbesondere für Hefeproteine, auch genetische Interaktionsstudien durchgeführt. Die Analyse genetischer Interaktionen dient der Identifizierung von Genen, die in Kombination mit einem anderen Gen einen bestimmten Phänotyp beeinflussen oder hervorrufen.

Durch vielseitige Anwendbarkeit und hohe Sensitivität stellt die Massenspektrometrie heutzutage eine der wichtigsten Methoden für die Proteomanalyse dar. Vermehrt findet die MS Anwendung bei der Bestimmung von PPIs durch Identifizierung der Bindungspartner eines Affinitäts-aufgereinigten Proteins.

4.1.1 Strategie zur Identifizierung neuer Interaktionspartner der GYF-Proteine

Für die Proteine Smy2, GIGYF2 und CD2BP2 wurden in der BioGrid- (<http://thebiogrid.org/>)^[94, 95] und der IntAct-Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk/intact/>)^[98, 99] bereits Proteininteraktionspartner beschrieben. Die dafür vormals verwendeten Methoden umfassen die Y2H-Technologie, die Affinitätsaufreinigung sowie für Smy2 auch die Identifizierung genetischer Interaktionen.

Einige der in den Datenbanken aufgeführten Interaktionspartner von Smy2 und GIGYF2 wurden auch in den hier beschriebenen *Pulldown*-Experimenten bestätigt (Tabelle 3.2). Deutlich wird, dass die aus Affinitätsaufreinigungen stammenden Interaktionen nicht vollständig in den SILAC-*Pulldowns* identifiziert wurden. Dies ist insofern zu erklären, als dass die Angaben fast ausschließlich aus Affinitätsaufreinigungen ausgehend vom Interaktionspartner stammen, und nicht wie in den hier durchgeführten *Pulldown*-Experimenten über Smy2 und GIGYF2 selbst.

Lediglich in zwei Studien erfolgte die Affinitätsaufreinigung über Smy2 als TAP-fusioniertes Volle-Länge-Protein^[116, 135]. Aus diesen Studien gingen vor allem ribosomale Proteine und Hitzeschockproteine als Bindungspartner von Smy2 hervor. Die häufig vorhandenen ribosomalen Proteine und die an ungefaltete Polypeptide bindenden Hitzeschockproteine sind jedoch bekannte Verunreinigungen^[123]. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die fehlende Identifizierung bereits beschriebener Interaktionspartner, wie beispielsweise Eap1, auf falsch-negative Ergebnisse hinweist.

In dieser Arbeit wurde die Methode der Affinitätschromatographie mittels Glutathion-S-Sepharose zur Identifizierung neuer Interaktionen der GYF-Proteine verwendet. Diese Form der Affinitätschromatographie zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus, bei der durch Einsatz hoher Konzentrationen an immobilisiertem Protein, niedrigaffine Interaktionen nachweisbar sind. Für den effizienten Nachweis von Interaktionen muss die Proteinkonzentration im Bereich oder oberhalb des K_d -Wertes der Interaktion liegen. So können Bindungskonstanten im Bereich von 10^{-5} M mit dem hier vorgestellten Ansatz

durchaus nachgewiesen werden. Die schwächsten physiologisch relevanten Interaktionen liegen im K_d -Bereich von 10^{-2} M ^[134].

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Proteinen, die spezifisch über die PRS-Bindungsstelle der GYF-Domänen von Smy2, GIGYF2 und CD2BP2 gebunden werden. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden die Affinitätsaufreinigungen mit den isolierten GST-fusionierten GYF-Domänen als exogenes *Bait*-Protein durchgeführt. Die Verwendung eines exogenen *Bait*-Proteins hatte den Vorteil, dass hohe Konzentrationen an immobilisiertem Protein eingesetzt werden konnten. Dadurch war die Detektion niedrigaffiner und transientser Interaktionen möglich. Weiterhin erlaubte die Versuchsdurchführung die Verwendung eines murinen Milzlysates.

Der Einsatz der GYF-Domänen als exogenes *Bait* sowie des murinen Milzlysates für CD2BP2-GYF, macht den wesentlichen Unterschied zu den bereits beschriebenen Interaktionen aus.

Der Nachteil der Verwendung eines exogenen *Baits* ist aber, dass artifizielle Protein-Protein-Interaktionen begünstigt werden, die *in vivo* aufgrund der geringen Konzentration oder der unterschiedlichen Kompartimentierung der Interaktionspartner in der Zelle nicht stattfinden. Diese Einschränkung gilt ebenfalls für die Y2H-Methode. Die Untersuchung eines Proteins auf endogenem Niveau, beispielsweise durch Koimmunopräzipitation (*Co-IP*), ist bezüglich seiner eingesetzten Konzentration und der Interaktionspartner weniger artifiziell. Für die in dieser Arbeit beschriebene zielgerichtete Identifizierung der PRS-Bindungspartner war ein endogenes *Bait*-Protein nicht geeignet, da auch niedrig-affine und transiente Wechselwirkungen gefunden werden sollten und keine Untersuchungen der Volle-Länge-Proteine erfolgen sollten.

Die *Pulldown*-Experimente mit den isolierten GYF-Domänen der Proteine Smy2, GIGYF2 und CD2BP2 wiesen eine Vielzahl an Proteinen mit hohen Anreicherungsfaktoren auf. Diese Beobachtung war dabei unabhängig von der Inhibitionsstrategie der PRS-Bindungsstelle (Peptid oder Mutation) und der verwendeten Markierungsmethode der Peptide (SILAC oder ¹⁸O-Markierung, s. 3.1 und 3.4).

Neben Proteinen, die ein oder mehrere Bindungsmotive für die GYF-Domänen besitzen wurden auch Proteine über die PRS-Bindungsstellen angereichert die keine Motive enthalten. Für die meisten dieser Proteine ohne Bindungsmotiv konnte mithilfe der STRING-Datenbank ein Interaktionspartner ermittelt werden, der ein Bindungsmotiv für die untersuchte GYF-Domäne besaß. Anhand der Resultate zeigte sich, dass neben direkten Bindungspartnern

sowohl sekundäre Bindungspartner als auch Proteinkomplexe über die PRS-Bindungsstelle der GYF-Domäne kopräzipitiert wurden.

4.1.2 Bewertung der Versuchsdurchführung

Im Folgenden werden die gewählten Parameter für die Durchführung der Wiederholungsexperimente, die Art der Inhibition der PRS-Bindungsstelle, die Verwendung der GST-Fusionsproteine sowie die angewandten Markierungsmethoden der Proteine bzw. Peptide, diskutiert.

Der Einsatz von SILAC-markierten Zell-Lysaten sowie die Nutzung der quantitativen MS erlaubte die spezifische Identifizierung prolinreicher Bindungspartner der untersuchten GYF-Domänen. Da in den verwendeten Zell-Lysaten trotz gleicher Behandlung Expressionsunterschiede nicht ausgeschlossen werden können, bietet es sich bei Verwendung identischer SILAC-Lysate an, ein Wiederholungsexperiment durchzuführen. In diesem werden die SILAC-Lysate in den Ansätzen gegeneinander ausgetauscht (reverse Experiment), wodurch die Lysat-spezifischen Expressionsunterschiede ermittelt werden können.

Zu Beginn dieser Arbeit standen zur Versuchsdurchführung ein QToF-MS-Gerät und die MsQuant-Software^[101] zur Verfügung, was die Datenanalyse und -auswertung sehr aufwendig und zeitintensiv machte. Daher wurden die Wiederholungsexperimente nicht als reverse Experimente durchgeführt. Mit der Einführung des Orbitraps am Institut (FMP) und der Veröffentlichung der MaxQuant-Software^[100] wurde die Datenauswertung stark vereinfacht und ermöglichte höheren Durchsatz. Daher erfolgte die Vermessung der Wiederholungsexperimente für die GYF-Domänen von Smy2 und GIGYF2 am Orbitrap-Massenspektrometer. Für diese Experimente wurden sowohl die GST-Fusionsproteine als auch die verwendeten Zell-Lysate erneut hergestellt.

Auch Kontrollexperimente anderer SILAC-Anwendungen erfolgen nicht immer mit einem identischen Zell-Lysat, wie beispielsweise bei der QUICK-Methode (*quantitative immunoprecipitation combined with knockdown*)^[136], bei der die Bindungspartner eines endogenen Proteins nach Immunopräzipitation ermittelt werden. Die Bestimmung der unspezifischen Binder (an die Matrix und den Antikörper) erfolgt unter Verwendung eines Zell-Lysats, bei dem das untersuchte Protein durch RNAi-vermittelten *knockdown* aus dem Lysat entfernt wurde. Inwiefern dieser *knockdown* einen Einfluss auf das weitere Proteom hat, ist nicht abschließend geklärt. Es ist wahrscheinlich, dass dies ebenfalls in einer An- oder

Abreicherung einzelner Proteine resultiert, die im Experiment als falsch-positive oder falsch-negative Interaktionspartner identifiziert werden.

Die Bestimmung unspezifischer Binder erforderte eine inhibierte Bindungsstelle der GYF-Domäne, die durch ein inhibitorisches Peptid oder eine Bindungsstellen-Mutation im Protein erreicht wurde. Die Verwendung eines inhibitorischen Peptids hatte den Vorteil, dass keine Proteinmutanten hergestellt werden mussten. Eine eingefügte Mutation kann mit geringerer Löslichkeit oder dem Verlust der Struktur einhergehen. Ein Nachteil in der Verwendung eines inhibitorischen Peptids könnte dagegen sein, dass hohe Konzentrationen des Peptids auch Interaktionen im Lysat kompetiert, wodurch native Komplexe zerstört bzw. nicht gebildet werden. Dieses Problem tritt hingegen bei der Verwendung von Proteinmutanten nicht auf.

Nachteilig an der gewählten Versuchsdurchführung war, dass das GST-markierte Protein gemeinsam mit den Interaktionspartnern von der Matrix eluiert wurde. Dies resultierte im SDS-Gel in der Überlagerung von Proteinen im Molekulargewichtsbereich zwischen ~ 25 und 35 kDa und schränkte die Identifizierung von Bindungspartnern stark ein. Eine stärkere Bindung des Proteins könnte durch die Nutzung der Avidin-Biotin-Wechselwirkung als Immobilisierungs-verfahren erzielt werden. Stringente Elutionsmethoden führen jedoch ebenfalls zur Auflösung dieser Interaktion^[137]. Einen Ausweg könnte hier die kovalente Bindung des *Bait*-Proteins an die Matrix über Sortase A-vermittelte Proteinligation bieten, die die gleichmäßige Orientierung des Proteins erlaubt^[138].

Um artifizielle Protein-Protein-Interaktionen, die durch die Verwendung eines exogenen *Baits* begünstigt werden, zu minimieren, bietet sich eine Zellfraktionierung an. Dies empfiehlt sich besonders für Zellen vielzelliger Organismen, da ihr Proteom im Vergleich zu dem der Hefen wesentlich komplexer ist. Für die Fraktionierung von Hefezellen ist unglücklicherweise kein Protokoll etabliert, welches die Konsistenz und die Konzentration der Lysate nicht verändert.

Die in dieser Arbeit angewandten Methoden zur Isotopenmarkierung von Peptiden, die SILAC-Methode und ¹⁸O-Markierung, eigneten sich gut für die Identifizierung von Bindungspartnern der PRS-Bindungsstelle der untersuchten GYF-Domänen. Ein Nachteil der ¹⁸O-Markierung ist, dass sie die Peptidmarkierung auf die Massendifferenz von 4 Da beschränkt. Zudem erfolgt der tryptische Einbau von zwei ¹⁸O-Atomen nicht immer vollständig, wodurch einige Peptide nur einfach markiert sind. Dadurch kann es zu einer Überlagerung der Peptidspektren von ¹⁸O- und ¹⁶O- Fragmenten kommen, die das Ergebnis verfälschen. Bei der SILAC-Methode lässt sich hingegen die Massendifferenz durch die verwendeten Aminosäureisotope beeinflussen. Vorteilhaft an der ¹⁸O-Methode ist jedoch, dass sie die Markierung von Proteinen erlaubt, deren Markierung in Zellkultur (SILAC) nicht

möglich ist. So konnte, wie für den CD2BP2-Pulldown gezeigt, ein organspezifisches Zell-Lysat verwendet werden (s. 3.4.3).

4.2 Inhibition von PRS-Bindungsdomänen

Eine Reihe von Interaktionen zwischen prolinreichen Motiven und der entsprechenden Bindungsdomäne stehen bekanntermaßen im Zusammenhang mit humanen Erkrankungen^[29, 139]. Daher besteht großes pharmakologisches Interesse an der Entwicklung von Inhibitoren solcher PPIs. Dazu werden neben dem Design eines Inhibitors in Form synthetischer Peptide, unter Verwendung einer Struktur-basierten molekularen Modellierung dieser Peptidmimetika, auch Hochdurchsatz-Analyse-Strategien zur Identifizierung von kleinen inhibitorischen Molekülen („*small molecules*“) genutzt.

In Zusammenarbeit mit der AG Kühne (FMP, Berlin), der AG Schmalz (Universität zu Köln) und der AG Rademann (Universität Leipzig, ehemals FMP), wurden die Strategien der Peptidmimetika und der *small molecules* verfolgt, um die Protein-Interaktion der PRS-Bindungsstelle der GYF-Domäne zu inhibieren.

4.2.1 Inhibition der GYF-Domäne von CD2BP2 mit einem Peptidmimetikum

Der (Pro-M2)-Baustein (s. 3.5.1), der von der AG Kühne vorgeschlagen wurde, eignet sich als Diprolinmimetikum. Die Bindungsaffinität an die GYF-Domäne von CD2BP2 konnte für das Peptidmimetikum im Vergleich zum WT-Peptid jedoch nicht verbessert werden (s. 3.5.1). Unter Verwendung der NMR-Struktur des Komplexes der GYF-Domäne mit dem CD2-Peptid (PPPGHR, PDB: 1L2Z), wurde die Struktur des (Pro-M2)-Bausteins durch computergestützte Modellierung erstellt. Da das CD2-Peptid als einzelnes Motiv relativ schwach an die GYF-Domäne bindet ($K_d \sim 159 \mu\text{M}$), wurde eine andere Peptidsequenz für die Synthese des Peptidmimetikums verwendet. Die verwendete Peptidsequenz wurde über Phagen-Display gewonnen (Phagen-Display-Peptid PD1: EFGPPPGWLGR) und besitzt mit einer K_d von $13 \mu\text{M}$ eine höhere Affinität für die GYF-Domäne von CD2BP2^[36].

Die reduzierte Bindungsaffinität des Peptidmimetikum im Vergleich zum WT-Peptid lässt vermuten, dass der Einbau des (Pro-M2)-Baustein zu unerwarteten Torsionswinkeln der Peptidbindungen führte, die in einer veränderten Ausrichtung der Aminosäureseitenketten resultierte. Diese könnten der Grund dafür sein, dass der Ligand mit geringerer Affinität von der CD2BP2-GYF-Domäne gebunden wird, da relevante Wechselwirkungen (Wasserstoffbrücken, Stapelwechselwirkungen) mit der Domänen-Oberfläche im Vergleich zum WT-Peptid nicht stattfinden.

Wenn die GYF-Domäne die Fähigkeit besäße Liganden in der invertierten C→N-Orientierung zu binden, dann wäre die Position des Bausteins vermutlich nicht optimal gewählt. Da für die GYF-Domänen die Bindung eines invertierten Liganden noch nicht beobachtet wurde, scheint dies nicht der Grund für die reduzierte Bindungsaffinität zu sein. Zudem besitzt der WT-Ligand ein PPGW-Motiv, von dem bekannt ist, dass es spezifisch von der CD2BP2-GYF-Domäne gebunden wird (s. 1.4). Zur Bestimmung der tatsächlichen Ligandenbindung durch die Domäne ist eine Strukturaufklärung des Protein-Peptid-Komplexes empfehlenswert.

4.2.2 Validierung der *small molecules* für das PRS-Bindungsepitop der CD2BP2- GYF-Domäne

Die zweite Strategie für die Suche eines Inhibitors, die auf einer Fluoreszenzpolarisations-(FP)-basierten Hochdurchsatz-Analyse der ChemBioNet-Bibliothek durchgeführt wurde, lieferte keinen geeigneten Inhibitor der PRS-Bindungsstelle der CD2BP2-GYF-Domäne.

Die Untersuchung der Fluorescein-gekoppelten Peptide zeigte, dass alle synthetisierten Peptide an die GYF-Domäne binden. Die ermittelten K_d -Werte aus den NMR-Messungen waren zwar höher als die der FP-Assays, jedoch waren ihre Größenordnungen vergleichbar (s. 3.5.2, Tabelle 3.3). Die höheren K_d -Werte aus den NMR-Messungen lassen sich durch die Vermessung einzelner Proben mit definierter Ligandenkonzentration erklären. Durch die Vermessung von Einzelproben war die Menge des Liganden limitiert, so dass nur wenige Messpunkte aufgenommen werden konnten. Optimierbar ist dies durch Vermessung von zwei Proben, bei der in einer Probe die maximale verfügbare Ligandenkonzentration eingesetzt wird. Einzelne Titrationsschritte können so durch Mischen der beiden Proben erzeugt werden. Aufgrund der Ungewissheit über die Löslichkeit des Liganden in maximaler Konzentration wurde diese Strategie nicht angewandt. Zudem war unbekannt, ob der Ligand einen negativen Effekt auf die Proteinstabilität ausübt und dessen Löslichkeit reduziert. Auch die 5%-ige DMSO-Konzentration, welche in den NMR-Proben vorlag, kann die Bindungskonstante künstlich erhöhen, da DMSO ebenfalls an die Domäne bindet (s. Abbildung 3.36, B)

Die inhibitorische Wirkung der im FP-Assay identifizierten Kleinmoleküle konnte mittels NMR-Spektroskopie nicht bestätigt werden. Da die untersuchten Verbindungen teilweise eine starke Gelb- und Orangefärbung in den DMSO-Stammlösungen aufwiesen, ist eine Korrelation von Autofluoreszenz der Verbindungen mit dem FP-Signal demnach nicht auszuschließen. Eine Autofluoreszenz der Kleinmoleküle kann in einer falsch-positiven Identifizierung resultieren. Ein derartiger Effekt wurde bereits beschrieben^[140]. Aufgrund der

unbestätigten Bindung der Kleinmoleküle wurde eine Kontrollmessung mit GST in einem FP-Assay durchgeführt, in dem die Moleküle ebenfalls eine Bindung zeigten (Viviane Uryga-Polowy, persönliche Kommunikation). Es ist daher anzunehmen, dass die beobachtete Peptidverdrängung im FP-Assay eher eine Folge der Titration steigender Molekülkonzentrationen ist und somit irrtümlich eine Autofluoreszenzkurve bestimmt wurde.

4.2.3 Bewertung der Strategien zur Identifizierung von Inhibitoren

GYF-Domänen zeichnen sich durch eine hydrophobe Bindungsfurche aus, die an der Ligandenbindung beteiligt ist. Deswegen sollten sich beide Herangehensweisen, die Verwendung eines *small molecule* und eines Peptidmimetikums, für die Inhibition der PRS-Erkennung durch die GYF-Domäne eignen.

Die verfolgten Strategien, die FP-basierte Hochdurchsatz-Analyse der ChemBioNet-Bibliothek und das gezielte Design eines Peptidmimetikums, lieferten nicht die erwünschten Ergebnisse. Der Vorteil in der Hochdurchsatz-Analyse liegt in der schnellen Untersuchung vieler verschiedener Moleküle, jedoch ist dabei die Qualität und die Breite der verwendeten Bibliothek entscheidend. Wie sich zeigte, ist bei Verwendung der ChemBioNet-Bibliothek zu berücksichtigen, dass aufgrund autofluoreszierender Verbindungen bei der FP-basierten Hochdurchsatz-Analyse viele falsch-positive Verbindungen identifiziert werden. Hilfreich ist es in erster Linie das Bibliotheken-Design zu überdenken. Chemisch instabile, reaktive oder unlösliche Verbindungen sowie jene Verbindungen, welche häufig als Treffer identifiziert werden, sollten aus dem FP-Screen ausgeschlossen werden.

Das Modellieren eines Inhibitors auf der Grundlage einer gut aufgelösten Struktur kann sehr gute Ergebnisse erzielen. Obwohl es eine NMR-Struktur des Peptid-Liganden im Komplex mit der GYF-Domäne von CD2BP2 gibt, kann die Bindung des Mimetikums durchaus strukturell unterschiedlich sein. Insbesondere die Orientierung des Liganden kann eine gewisse Flexibilität aufweisen für die die Genauigkeit der NMR-Struktur nicht ausreichend ist, um geometrische Verschiebungen im Bereich von 0.2-0.5 Å vorherzusagen. Zudem weist der GYF-Ligand (nach der NMR-Struktur) eine intramolekulare Wechselwirkung auf, die möglicherweise durch den Diprolin-Baustein gestört wird. Weiterhin ist zu bedenken, dass die Synthese eines einzelnen Bausteins schwierig und mit einem großen experimentellen Aufwand verbunden sein kann.

4.3 Die GYF-Domäne von Smy2 bindet an Proteine der mRNA-Prozessierung

Die SILAC-Versuche mit der GYF-Domäne des Proteins Smy2 aus *S. cerevisiae* lieferten den Hinweis, dass Smy2 mit mRNA-prozessierenden Proteinen interagiert. Die *Pulldown*-Experimente deuteten auf eine Interaktion der Smy2-GYF-Domäne mit Proteinen des CCR4-Not-Komplexes hin. Es handelt sich dabei um einen evolutionär konservierten Komplex aus 9 Proteinen (in Hefe: Not1-5, CCR4, Pop2, Caf40 und Caf130), der sowohl an zellulären Prozessen im Zellkern als auch im Zytoplasma beteiligt ist. Neben nukleären Funktionen bei der Transkriptionsregulation und der RNA-Degradation scheint die Hauptaufgabe des CCR4-Not-Komplexes in der zytoplasmatischen Deadenylierung von mRNA zu bestehen^[141-143]. Im Zytoplasma ist dieser Proteinkomplex in *P Bodies* (PBs) lokalisiert. Da für Smy2, ebenso wie für die isolierte GYF-Domäne, eine Lokalisation in *P Bodies* demonstriert wurde^[40], ist die Rekrutierung von Smy2 in PBs über die Interaktion mit den Bindungsmotiv-enthaltenden Proteinen des CCR4-Not-Komplexes oder der 5'-3'-RNA-Exonuklease Xrn1 vorstellbar.

Neben dieser Interaktion mit den Proteinen des CCR4-Not-Komplexes wurde auch der bereits bekannte Interaktionspartner Eap1, ein Translationsinhibitor, identifiziert. Smy2 und Eap1 wurden als Komponenten des SESA-(Smy2–Eap1–Scp160–Asc1)-Komplexes beschrieben, der an der spezifischen Regulation der POM34-mRNA auf Translationsebene beteiligt ist^[63]. Bei einem Defekt des Proteins Mps2, welches für die Verankerung des Spindelpolkkörpers (SPB, *spindle pole body*) in die Kernhülle notwendig ist, wird der neu gebildete SPB nicht in die Kernmembran inseriert. Die durch den SESA-Komplex vermittelte Translationsinhibition der POM34-mRNA resultiert in einer verringerten Konzentration des POM34-Proteins, wodurch die Lebensfähigkeit der Zelle wieder hergestellt wird. Dabei ist die Interaktion der Smy2-GYF-Domäne mit dem C-terminalen PPGL-Motiv von Eap1 für die Translationsinhibition essentiell^[63].

Weiterhin wurden spleißosomale Proteine identifiziert, die über die PRS-Bindungsstelle der Smy2-GYF-Domäne gebunden wurden (s. Abbildung 3.6). Die zytoplasmatische Lokalisation von Smy2 lässt jedoch keine Funktion beim Spleißprozess vermuten^[40, 42, 54]. Inwiefern es sich bei diesen spleißosomalen Proteinen um tatsächliche *in vivo* Bindungspartner handelt ist nicht abschließend geklärt. Eine artifiziell begünstigte Interaktion mit Kernproteinen ist in den durchgeführten Experimenten nicht auszuschließen (s. 4.1). Andererseits könnten die identifizierten spleißosomalen Proteine ein Hinweis auf den Transport von mRNPs (*messenger ribonucleoprotein complexes*) unter bestimmten zellulären Bedingungen sein. Ein Beispiel sind Lsm-Proteine die sowohl in zytoplasmatischen als auch nukleären

Subkomplexen zu finden sind. Sie sind dabei am Zusammenbau des Spleißosoms im Kern als auch an der zytoplasmatischen mRNA-Degradation beteiligt^[124].

4.3.1 Die C-terminale Domäne von Smy2 vermittelt keine Protein-Protein-Interaktion

Smy2 wurde als ER-lokalisiertes, peripheres Membranprotein beschrieben, das Interaktionen mit Proteinen des sekretorischen Transportwegs zeigt^[54, 74, 144]. Die beschriebene Interaktion zwischen Smy2 und dem Sec23/Sec24-Subkomplex ist dabei unabhängig von der GYF-Domäne^[54]. Da die Membranlokalisierung von Smy2 vermutlich ebenfalls nicht über die GYF-Domäne vermittelt wird, wurde im Folgenden ein weiterer Proteinabschnitt von Smy2 betrachtet.

Smy2 besitzt am C-Terminus eine α -helikale Domäne unbekannter Funktion. Untersuchungen in Hinblick auf eine Funktion als Protein-Protein-Interaktionsdomäne erfolgten in der vorliegenden Arbeit durch Phagen-Display- und SILAC-*Pulldown*-Experimente mit der isolierten Proteindomäne. Diese Versuche lieferten keinen Hinweis auf eine Beteiligung der Domäne an PPIs (s. 3.3.1 und 3.3.2). Syh1, das paraloge Protein zu Smy2, besitzt eine ähnliche Domänenstruktur wie Smy2. Da für Syh1 eine Membran-Assoziation beschrieben worden ist, wurde die C-terminale Domäne von Smy2 auf Lipidinteraktion untersucht^[74]. Aus der PIP-*Strip*-Analyse ging hervor, dass die C-terminalen Domäne von Smy2 an Phospholipide binden kann (s. 3.3.3).

Da es mehrere Arten von peripheren Membranproteinen gibt, die über unterschiedliche Mechanismen mit Membranen interagieren, wurde untersucht, ob die C-Terminale Domäne Lipidkopfguppen bindet^[145]. Die NMR-Untersuchung der C-terminalen Smy2-Domäne mit dem Kopfguppenanalogon (IP3) von PI(4,5)P2 (Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat) zeigte jedoch keine Bindung. Hier ist zu bemerken, dass die Interaktion zwischen der Domäne und PI(4,5)P2 zu den schwächsten im PIP-*Strip* gehörte.

Vorstellbar ist, dass es zu einer sterischen Hinderung durch die benachbarten Phosphorylierungen an den Positionen 4 und 5 dieser Kopfgruppe kommt, die die Bindung an die Domäne verhindern. Da eine Bindung der C-terminalen Domäne auch an PI(3)P, PI(4)P und PI(5)P erfolgt, könnte auch eine lokal auftretende hohe negative Ladung, hervorgerufen durch die benachbarten Phosphorylierungen, ein Grund für die verminderte Bindung an PI(4,5)P2 sein. Die Bindungsfähigkeit der C-terminalen Domäne an Membranen ist damit noch nicht abschließend geklärt. Eine weitere Untersuchung mit der Kopfgruppe des Phosphatidylinositol-(3,5)-bisphosphat bietet sich an, da die PIP-*Strip*-Analyse eine stärkere

Interaktion zwischen der Domäne und diesem Phospholipid vermuten lässt. Durch die Phosphorylierungen an den Positionen 3 und 5 könnten die sterische Hinderung und die lokale negative Ladung reduziert werden.

Es ist durchaus möglich, dass die C-terminale Domäne von Smy2 mit Membranen interagiert, die nicht spezifisch über eine Erkennung von Kopfgruppen erfolgt. Ein Beispiel ist die C-terminale hSH3-Domäne (hSH3^C) von ADAP (*adhesion and degranulation promoting adapter protein*). Für diese Lipidbindungs-Domäne wurde ebenfalls über PIP-Strips eine Lipidinteraktion gezeigt. NMR-Untersuchungen der hSH3^C-Domäne mit IP3 zeigten keinen Effekt, dagegen konnte eine Interaktion mit Lipid-Vesikeln beobachtet werden^[21, 146].

Zur weiteren Untersuchung der C-terminalen Domäne bieten sich neben der NMR-Untersuchung mit der Kopfgruppe von Phosphatidylinositol-(3,5)-bisphosphat auch Sedimentations- oder Flotationsassays mit der Domäne und weiteren Teilkonstrukten von Smy2 an.

4.3.2 Bewertung der Versuche mit der GYF- und der C-terminalen Domäne von Smy2

Eine Interaktion zwischen Smy2 als TAP-fusioniertes Volle-Länge-Protein und den chromosomal HA-markierten Proteinen CCR4 und Lsm5 konnte nicht durch Kopräzipitation bestätigt werden. Für den Nachweis transienter Interaktionen, die nur unter bestimmten physiologischen Bedingungen oder in einem bestimmten Interaktionszeitraum stattfinden, sind Kopräzipitationsexperimente ineffizient. In diesem Fall empfiehlt es sich auf genetisch veränderte Hefestämme zurückzugreifen, in denen diese Interaktionen nachweisbar sind. Es ist auch nicht auszuschließen, dass der TAP-Tag die Interaktion und somit die Ausbildung von Proteinkomplexen stört oder die Affinitätsaufreinigung unter zu stringenten Bedingungen durchgeführt wurde. Wie bereits erwähnt (s. 4.1), gibt es zwei Studien bei denen die Verwendung des TAP-Smy2 keine Interaktionspartner hervorbrachte.

Eine Bindung an die isolierte GYF-Domäne von Smy2 konnte für CCR4-HA demonstriert werden, jedoch nicht für Lsm5-HA (Abbildung 3.12). Lsm5 besitzt keine Motive für die Smy2-GYF-Domäne und ist somit kein direkter Interaktionspartner. Aus den MS-Daten geht nicht hervor, dass es sich bei Lsm5 um einen falsch-positiven Binder der GYF-Domäne handelt. Lsm5 wurde in beiden Experimenten mit 2 von 4 möglichen Peptiden identifiziert. Jedes der Peptide war angereichert und eindeutig Lsm5 zugeordnet. Inwiefern die Verwendung eines anderen Hefestamms (TAP-Smy2) im Vergleich zum SILAC-Experiment (YAL6B) dieses Ergebnis beeinflusst ist unbekannt.

Zur Bestimmung der Funktion der C-terminalen Domäne von Smy2 wurde ein Phagen-Display-Experiment durchgeführt, bei dem es zu keiner spezifischen Anreicherung von Peptid-präsentierenden Phagen kam. Da in dem Experiment keine Kontroll-Domäne mit bekannter Peptidspezifität eingesetzt wurde, kann ein experimenteller Fehler nicht ausgeschlossen werden. Andererseits wurden nur Peptidsequenzen einer Länge von neun Aminosäuren betrachtet. Protein-Protein-Interaktionen auf Basis der Erkennung längerer Peptide oder großflächigen Interaktionen, wie beispielsweise zwischen der GYF-Domäne von CD2BP2 mit dem Protein U5-15K, konnten hierbei nicht untersucht werden. Die vier durchgeführten SILAC-Versuche mit der C-terminalen Domäne lieferten jedoch keine Hinweise auf eine Beteiligung der Domäne an Protein-Protein-Interaktionen (s. 4.3.1). Somit ist eine Bindung der Domäne an nicht-proteinerge Moleküle in der Zelle zu vermuten.

4.4 GIGYF2 interagiert mit Proteinen des sekretorischen Transportweges und des mRNA Metabolismus

Die Experimente mit der GYF-Domäne von GIGYF2 resultierten in der Identifizierung von vier funktionalen Proteingruppen, die über die PRS-Bindungsstelle der Domäne gebunden wurden. Diese Proteingruppen umfassen: (1) COPII-Proteine (*coat protein complex II*, COPII), (2) Proteine des SMN-Komplexes (*survival of motor neurons*, SMN), (3) Proteine der zytoplasmatischen *P Bodies* und *Stress Granules* und (4) ribosomale Proteine. Die meist falsch-positiven ribosomalen Proteine^[123] werden hier nicht weiter betrachtet.

Die Interaktion der GIGYF2-GYF-Domäne mit Sec-Proteinen (Sec13, 16A, 23A, 23B, 24A und 31A), die an der Bildung von COPII-Vesikeln beteiligt sind, lieferte den ersten Hinweis auf eine Funktion von GIGYF2 im sekretorischen Transportweg. COPII-Vesikel sind für den anterograden Proteintransport vom ER zum Golgi verantwortlich^[55]. Anhand der Kolo-kalisation von GIGYF2 mit Sec31 und den Markerproteinen für das ER und den Golgi-Apparat ist eine tatsächliche *in vivo* Interaktion zwischen GIGYF2 und den Sec-Proteinen denkbar (s. 3.2.2).

Als weitere Bindungspartner der GIGYF2-GYF-Domäne wurden Proteine des SMN-Komplexes (DDX20, Gemin 4-6 und Mep-50) sowie diesem Komplex assoziierte Proteine (pICln, PRMT5) identifiziert. Der SMN-Komplex ist an der zytoplasmatischen Biogenese der spleißosomalen snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*), des verwandten U7 snRNPs sowie weiterer RNPs beteiligt^[147-149]. Eine verminderte Expression des SMN-Proteins (*survival motor neuron protein*) führt zur Spinalen Muskelatrophie (SMA), die aus einer Degeneration von α -Motorneuronen im Rückenmark resultiert^[150]. Dem Protein SMN wurde

weiterhin eine Motorneuronen-spezifische Rolle beim axonalen mRNA-Transport zugeschrieben^[151]. Die identifizierten Proteine des SMN-Komplexes weisen keine Bindungsmotive für die GYF-Domäne auf. SMN besitzt in seiner C-terminalen Proteinsequenz vermehrt Proline jedoch kein direktes PPGΦ-Motiv. Inwiefern SMN durch die GYF-Domäne von GIGYF2 gebunden werden kann, ist nicht bekannt. SMN wurde aufgrund seines Molekulargewichtes (MW: 31,8 kDa) nicht im Experiment identifiziert (s. 4.1.2). Die Kopräzipitation der Proteine des SMN-Komplexes erfolgt daher entweder über Kernproteine, die bei der Interaktion-Beschreibung des zytoplasmatischen GIGYF2 nicht berücksichtigt wurden (s. 3.1.4), oder einen direkten Bindungspartner der im MW-Bereich der GST-fusionierten GYF-Domäne liegt. Weiterhin kann eine Interaktion über einen bisher unbeschriebenen Bindungspartner nicht ausgeschlossen werden. Die Interaktion mit dem SMN-Komplex ist interessant, da für heterozygote GIGYF2-*knockout*-Mäuse eine altersbedingte motorische Dysfunktion beschrieben wurde^[51]. Das SMN Protein wird auch in den zytoplasmatischen *Stress Granules* (SGs) gefunden, und der *knockdown* dieses Proteins resultiert in einer Abnahme von SGs. SMN-defiziente Zellen besitzen eine reduzierte Stress-Resistenz und verminderte Lebensfähigkeit^[152].

In den *Pulldown*-Experimenten wurden über die PRS-Bindungsstelle auch Proteine der *P Bodies* (PBs) und *Stress Granules* angereichert. Zu diesen *P Body*-Proteinen gehören unter anderem Ago2, Mov10, Rent1 und TNRC6B, die mit Ausnahme von Ago2 ein Bindungsmotiv für die GIGYF2-GYF-Domäne besitzen. Ago2 und TNRC6B sind ebenfalls Proteinkomponenten der *Stress Granules*. Wie in Abbildung 3.15 gezeigt, führte die Behandlung von HeLa-Zellen mit Arsen zu einer Rekrutierung von GIGYF2 in *Stress Granules*. Inwiefern die Lokalisation von GIGYF2 in diesen Aggregaten über eine Interaktion der GYF-Domäne oder andere Sequenzabschnitte vermittelt wird, ist unbekannt. GIGYF2 besitzt in seiner C-terminalen Sequenz Q-reiche Regionen. Eine Assoziation von Q/N-reichen Proteinsequenzen mit der Ausbildung von PBs und SGs wurde bereits beschrieben^[126, 153].

4.4.1 Gemeinsamkeiten der Proteine mit Smy2-Typ GYF-Domäne

Das humane Protein GIGYF2 und das dazu orthologe Hefeprotein Smy2 besitzen eine GYF-Domäne vom Smy2-Typ. Obwohl die Proteine außerhalb ihrer GYF-Domänen wenig Sequenzähnlichkeit besitzen, weisen sie anhand ihrer bereits beschriebenen Interaktionen, sowie der in dieser Arbeit ermittelten Protein-Protein-Interaktionen, Parallelen auf.

Beide Proteine lokalisieren in den zueinander verwandten PBs und SGs und interagieren über ihre GYF-Domänen mit Motiv-enthaltenden Proteinen dieser Aggregate. Inwiefern die

Rekrutierung von Smy2 und GIGYF2 in diese Aggregate über ihre GYF-Domänen oder andere Sequenzabschnitte (s. 4.4) vermittelt wird sollte überprüft werden. Lokalisationsstudien beider Proteine, die Mutationen in der PRS-Bindungsstelle ihrer GYF-Domänen aufweisen, sowie von Deletionskonstrukten, bieten sich dazu an. Eine mögliche Funktion von Smy2 und GIGYF2 bei der Assemblierung oder dem Zerfall von PBs und SGs bzw. der Rekrutierung oder Freisetzung von mRNPs aus diesen Aggregaten könnte über Überexpressions- und Deletionsstudien untersucht werden

Für beide Proteine gibt es zudem eine Assoziation mit der vesikulären Transportmaschinerie. Während GIGYF2 direkt mit Proteinen der COPII-Vesikel interagiert (s. 3.1.4), zeigte sich dies nicht für Smy2. Die Proteine der COPII-Vesikel in der Hefe besitzen keine Bindungsmotive (s. 3.2.3) was erklärt, warum diese nicht als Bindungspartner für die Smy2-GYF Domäne identifiziert wurden. Neben der von Higashio *et al.* (2008) beschriebenen Interaktion zwischen Smy2 und dem Sec23p/Sec24p Subkomplex gibt es weitere Hinweise in Form von genetischen Interaktionen auf eine Beteiligung am vesikulären Transport^[52, 54, 144]. Inwiefern GIGYF2 und Smy2 eine Funktion am anterograden Proteintransport ausüben ist noch zu klären. Dies könnte beispielsweise über Transport-Assays untersucht werden. Für die Bestimmung einer direkten Interaktion zwischen GIGYF2 und den Sec-Proteinen ist zudem die Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-(FRET)-Analyse hilfreich.

Die beobachteten Unterschiede des direkten Interaktions der GYF-Domänen vom Smy2-Typ in Mensch und Hefe lassen eine evolutionäre Verschiebung der PRS-Verteilung vermuten. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass in den Volle-Länge-Proteinen weitere Bindungsstellen für Proteine, Membranen oder auch RNA vorhanden sind, durch die Interaktionen vermittelt werden könnten. Auch der wesentliche Unterschied in der Proteingröße von 740 AS für Smy2 zu 1299 AS für GIGYF2 lässt vermuten, dass GIGYF2 als Adapterprotein weitere Proteine assembliert, die im Falle von Smy2 indirekt vermittelt werden, um vergleichbare Funktionen auszuüben.

4.5 Die GYF-Domäne von CD2BP2 bindet mRNA-Prozessierungsfaktoren

Für die GYF-Domäne von CD2BP2 erfolgte bereits 2009 eine MS-basierte Analyse der über die PRS-Bindungsstelle gebundenen Proteine^[44]. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente unterscheiden sich von den vorherigen Versuchen durch die Verwendung muriner Milzlysate, die ¹⁸O-Markierung der Peptide und die Bestimmung der Anreicherungsfaktoren aller Proteine. Für die Versuche wurde die humane GYF-Domäne von

CD2BP2 verwendet. Die Proteinsequenzen der humanen und der murinen CD2BP2-GYF-Domänen unterscheiden sich nicht (s. 1.2.1, Abbildung 1.4). Die *Pulldown*-Experimente der GYF-Domäne von CD2BP2 mit murinen Milzlysaten resultierten vorwiegend in der Präzipitation spleißosomaler Subkomplexe. Dieses Ergebnis zeigte sich auch in den Versuchen von 2009. Eine Beteiligung von CD2BP2 an Prozessen, die mit der Spleißreaktion assoziiert sind, wird bereits vermutet, da CD2BP2 eine Komponente des U5 snRNP ist und mit den Proteinen U5-15K und Prp6 interagiert. Die Interaktionen mit U5-15K und Prp6 beruhen nicht auf der Erkennung prolinreicher Sequenzen durch die GYF-Domäne. Da CD2BP2 nicht als eine Komponente des U5 snRNP in den katalytisch aktiven spleißosomalen Komplexen gefunden wird^[43], kann für CD2BP2 eher eine Funktion bei der Assemblierung des Spleißosoms vermutet werden anstelle einer aktiven Beteiligung am Spleißprozess. Die Beobachtung, dass die isolierte GYF-Domäne von CD2BP2 in einem *in vitro* Spleiß-Experiment bereits die Ausbildung des spleißosomalen Komplexes A verhindert, weist auf die Bedeutung der Erkennung prolinreicher Sequenzen durch PRDs in spleißosomalen Proteinen für den Zusammenbau und die Funktion des Spleißosoms hin^[44].

Neben den spleißosomalen Proteinen, die als Bindungspartner für die GYF-Domäne identifiziert wurden, konnten weitere nukleäre Proteine angereichert werden, die an der Genregulation und mRNA-Prozessierung beteiligt sind. Zu diesen gehören Proteine des SWI/SNF-Komplexes und des CPSF-Komplexes. Der CPSF-Komplex ist an der 3'-Endprozessierung, genauer der Spaltungs- und Polyadenylierungsreaktion der mRNA beteiligt^[154, 155]. Der SWI/SNF-Komplex ist an der transkriptionellen Aktivierung und Repression ausgewählter Gene durch Chromatin-Remodelierung beteiligt^[156, 157]. Für den SWI/SNF-Komplex wurde zudem eine Rolle beim alternativen Spleißen und/oder der Polyadenylierung von mRNA beschrieben^[158]. Da alle mRNA-Prozessierungsschritte von der Transkription bis zum Export der reifen mRNA aus dem Kern in enger Verbindung zueinander stehen ist es interessant herauszufinden auf welchen Regulationsprozess CD2BP2 den größten Einfluss hat.

Für das zu CD2BP2 orthologe Protein TEG-1 in *C. elegans* wurde eine Funktion bei der Regulation der Zellproliferation und -differenzierung beschrieben. Die Interaktion von TEG-1 mit dem Spleißfaktor UAF-1, dem Homolog des humanen UA2F65 in *C. elegans*, weist auf eine bisher unbekannt Funktion des Proteins beim Spleißprozess hin^[78]. UA2F65, eine Untereinheit des U2AF (*U2 auxiliary factor*), ist an der Erkennung der 3'-Spleißstelle beteiligt und bekanntermaßen bereits im spleißosomalen Komplex A enthalten. Für das humane UA2F65 wurde zudem eine essentielle Funktion bei der Verknüpfung der

spleißosomalen Entfernung von Introns und der 3'-Endprozessierung von mRNA beschrieben^[159]. U2AF65 enthält im N-Terminus ein Interaktionsmotiv für U2AF35, das zudem ein PPGF-Motiv enthält. Es wird daher interessant sein herauszufinden, ob die Interaktion von CD2BP2 mit dem heterodimeren U2AF65/U2AF35-Komplex möglich ist.

Für eine erste Validierung der *in vivo* Interaktion von CD2BP2 mit Proteinen dieser identifizierten Proteinkomplexe bieten sich FRET-Analysen an, bevor experimentell aufwendigere Untersuchungen, wie beispielsweise *in vitro* 3'-Spaltungs- oder Polyadenylierungsexperimente, durchgeführt werden^[160].

4.6 Organspezifische Interaktionspartner der GYF-Domäne von CD2BP2

Aus der organspezifischen Proteinexpressionsanalyse in der Maus (s. 3.4.2) ging hervor, dass CD2BP2 insbesondere in lymphatischen Organen wie dem Thymus, den Lymphknoten und der Milz exprimiert wird.

Die Verwendung des murinen Milzlysates für die *Pulldown*-Experimente sollte der Identifizierung neuer organspezifischer Interaktionspartner dienen (s. 3.4.3). Es wurden drei stark angereicherte Proteine gefunden, die spezifisch für dieses Gewebe sind. Es handelt sich dabei um die Proteine CDK13, M4K1 und CYFIP2. Für CDK13 (*Cyclin dependent kinase 13*) wurde beschrieben, dass es eine Funktion bei der Regulation des alternativen Spleißens eines Reportergens ausführt^[131, 132]. M4K1 (*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 1*) ist eine Serin/Threoninkinase deren Expression auf hämatopoetische Organe und Hoden beschränkt ist^[129, 130]. CYFIP2 (*Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2*) wird in T-Zellen exprimiert und ist an der T-Zelladhäsion und der p53/TP53-abhängigen Induktion der Apoptose beteiligt^[128, 161, 162]. Diese drei gewebespezifischen Proteine besitzen keine Bindungsmotive. Lediglich für das humane Protein CYFIP2 findet gemäß der BioGrid-Datenbank eine Interaktion mit TCERG1 (*Transcription elongation regulator 1*) statt^[163]. TCERG1 besitzt 3 Bindungsmotive für die GYF-Domäne von CD2BP2 und wurde ebenfalls angereichert. Für das murine CYFIP2 gibt es noch keine beschriebenen Interaktionen nach Angaben der BioGrid-Datenbank.

Inwiefern diese identifizierten organspezifischen Proteine von physiologischer Bedeutung sind, ist ungewiss, da bislang keine spezifischen Bindungspartner beschrieben sind, die ihre Kopräzipitation erklären könnten. Der Versuch lieferte somit keine Hinweise auf Milzspezifische, direkte Bindungspartner. Eine gewebespezifische Funktion von CD2BP2 ist aber, insbesondere in Bezug auf eine potentielle spleißosomale Funktion, wahrscheinlich.

Ebenso wie für die Proteine Smy2 und GIGYF2 ist es für das molekulare Verständnis der Bedeutung von CD2BP2 wichtig, neben der GYF-Domäne auch andere Proteinabschnitte näher zu untersuchen.

4.7 Schlussfolgerung

Anhand der durchgeführten *Pulldown*-Experimente unter Verwendung der GYF-Domänen der Proteine Smy2, GIGYF2 und CD2BP2 als exogenes *Bait*, konnten neue bisher unentdeckte Interaktionspartner für die PRS-Bindungsstelle der GYF-Domänen dieser Proteine ermittelt werden (s. 4.3, 4.4 und 4.5). Insbesondere für die Proteine Smy2 und GIGYF2 konnten weitere Hinweise auf die Funktion dieser zytoplasmatischen Proteine mit einer GYF-Domäne vom Smy2-Typ gewonnen werden.

Letztlich ist zu bemerken, dass ungeachtet der Hinweise die sich aus den MS-Analysen ergeben eine Validierung der Protein-Protein-Interaktionen durch eine komplementäre Methode unerlässlich ist. Die möglichen Bindungspartner müssen weiterhin in Bezug auf ihre physiologische Relevanz bestätigt werden.

5 Literatur

1. Pawson, T. and Nash, P., *Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains*. Science, 2003. **300**(5618): p. 445-52.
2. Cesareni, G., Gimona, M., Sudol, M., and Yaffe, M., *Modular protein domains*. 2004: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
3. Kay, B.K., Williamson, M.P., and Sudol, M., *The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains*. FASEB J, 2000. **14**(2): p. 231-41.
4. Komuro, A., Nagai, M., Navin, N.E., and Sudol, M., *WW domain-containing protein YAP associates with ErbB-4 and acts as a co-transcriptional activator for the carboxyl-terminal fragment of ErbB-4 that translocates to the nucleus*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 33334-41.
5. Hurley, J.H. and Emr, S.D., *The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2006. **35**: p. 277-98.
6. Dustin, M.L., Olszowy, M.W., Holdorf, A.D., Li, J., et al., *A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts*. Cell, 1998. **94**(5): p. 667-77.
7. Laurent, V., Loisel, T.P., Harbeck, B., Wehman, A., et al., *Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of Listeria monocytogenes*. J Cell Biol, 1999. **144**(6): p. 1245-58.
8. Goldstrohm, A.C., Albrecht, T.R., Sune, C., Bedford, M.T., et al., *The transcription elongation factor CA150 interacts with RNA polymerase II and the pre-mRNA splicing factor SF1*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(22): p. 7617-28.
9. Zhang, Y., Lindblom, T., Chang, A., Sudol, M., et al., *Evidence that dim1 associates with proteins involved in pre-mRNA splicing, and delineation of residues essential for dim1 interactions with hnRNP F and Npw38/PQBP-1*. Gene, 2000. **257**(1): p. 33-43.
10. Ball, L.J., Kuhne, R., Schneider-Mergener, J., and Oschkinat, H., *Recognition of proline-rich motifs by protein-protein-interaction domains*. Angew Chem Int Ed Engl, 2005. **44**(19): p. 2852-69.
11. Volkman, B.F., Prehoda, K.E., Scott, J.A., Peterson, F.C., et al., *Structure of the N-WASP EVH1 domain-WIP complex: insight into the molecular basis of Wiskott-Aldrich Syndrome*. Cell, 2002. **111**(4): p. 565-76.
12. Mayer, B.J., Hamaguchi, M., and Hanafusa, H., *A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C*. Nature, 1988. **332**(6161): p. 272-5.
13. Stahl, M.L., Ferez, C.R., Kelleher, K.L., Kriz, R.W., et al., *Sequence similarity of phospholipase C with the non-catalytic region of src*. Nature, 1988. **332**(6161): p. 269-72.
14. Niebuhr, K., Ebel, F., Frank, R., Reinhard, M., et al., *A novel proline-rich motif present in ActA of Listeria monocytogenes and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family*. EMBO J, 1997. **16**(17): p. 5433-44.
15. Bork, P. and Sudol, M., *The WW domain: a signalling site in dystrophin?* Trends Biochem Sci, 1994. **19**(12): p. 531-3.
16. Sancho, E., Vila, M.R., Sanchez-Pulido, L., Lozano, J.J., et al., *Role of UEV-1, an inactive variant of the E2 ubiquitin-conjugating enzymes, in in vitro differentiation and cell cycle behavior of HT-29-M6 intestinal mucosecretory cells*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(1): p. 576-89.

17. Pornillos, O., Alam, S.L., Davis, D.R., and Sundquist, W.I., *Structure of the Tsg101 UEV domain in complex with the PTAP motif of the HIV-1 p6 protein*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(11): p. 812-7.
18. Freund, C., Dotsch, V., Nishizawa, K., Reinherz, E.L., *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.
19. Carlsson, L., Nystrom, L.E., Sundkvist, I., Markey, F., *et al.*, *Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells*. J Mol Biol, 1977. **115**(3): p. 465-83.
20. Kang, H., Freund, C., Duke-Cohan, J.S., Musacchio, A., *et al.*, *SH3 domain recognition of a proline-independent tyrosine-based RKxxYxxY motif in immune cell adaptor SKAP55*. EMBO J, 2000. **19**(12): p. 2889-99.
21. Heuer, K., Arbuzova, A., Strauss, H., Kofler, M., *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.
22. Stamenova, S.D., French, M.E., He, Y., Francis, S.A., *et al.*, *Ubiquitin binds to and regulates a subset of SH3 domains*. Mol Cell, 2007. **25**(2): p. 273-84.
23. Cowan, P.M., McGavin, S., and North, A.C., *The polypeptide chain configuration of collagen*. Nature, 1955. **176**(4492): p. 1062-4.
24. MacArthur, M.W. and Thornton, J.M., *Influence of proline residues on protein conformation*. J Mol Biol, 1991. **218**(2): p. 397-412.
25. Williamson, M.P., *The structure and function of proline-rich regions in proteins*. Biochem J, 1994. **297** (Pt 2): p. 249-60.
26. Zarrinpar, A., Bhattacharyya, R.P., and Lim, W.A., *The structure and function of proline recognition domains*. Sci STKE, 2003. **2003**(179): p. RE8.
27. Zarrinpar, A. and Lim, W.A., *Converging on proline: the mechanism of WW domain peptide recognition*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(8): p. 611-3.
28. Mahoney, N.M., Rozwarski, D.A., Fedorov, E., Fedorov, A.A., *et al.*, *Profilin binds proline-rich ligands in two distinct amide backbone orientations*. Nat Struct Biol, 1999. **6**(7): p. 666-71.
29. Freund, C., Schmalz, H.G., Sticht, J., and Kuhne, R., *Proline-rich sequence recognition domains (PRD): ligands, function and inhibition*. Handb Exp Pharmacol, 2008(186): p. 407-29.
30. Cubellis, M.V., Caillez, F., Blundell, T.L., and Lovell, S.C., *Properties of polyproline II, a secondary structure element implicated in protein-protein interactions*. Proteins, 2005. **58**(4): p. 880-92.
31. Jardetzky, T.S., Brown, J.H., Gorga, J.C., Stern, L.J., *et al.*, *Crystallographic analysis of endogenous peptides associated with HLA-DR1 suggests a common, polyproline II-like conformation for bound peptides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(2): p. 734-8.
32. Nishizawa, K., Freund, C., Li, J., Wagner, G., *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.
33. Balaji, S. and Aravind, L., *The RAGNYA fold: a novel fold with multiple topological variants found in functionally diverse nucleic acid, nucleotide and peptide-binding proteins*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(17): p. 5658-71.
34. Freund, C., Kuhne, R., Yang, H., Park, S., *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.
35. Freund, C., Kuhne, R., Park, S., Thiemke, K., *et al.*, *Structural investigations of a GYF domain covalently linked to a proline-rich peptide*. J Biomol NMR, 2003. **27**(2): p. 143-9.
36. Kofler, M., Motzny, K., Beyermann, M., and Freund, C., *Novel interaction partners of the CD2BP2-GYF domain*. J Biol Chem, 2005. **280**(39): p. 33397-402.
37. Kofler, M., Motzny, K., and Freund, C., *GYF domain proteomics reveals interaction sites in known and novel target proteins*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(11): p. 1797-811.

38. Ash, M.R., Faelber, K., Kosslick, D., Albert, G.I., *et al.*, *Conserved beta-hairpin recognition by the GYF domains of Smy2 and GIGYF2 in mRNA surveillance and vesicular transport complexes*. *Structure*, 2010. **18**(8): p. 944-54.
39. Kofler, M.M. and Freund, C., *The GYF domain*. *FEBS J*, 2006. **273**(2): p. 245-56.
40. Georgiev, A., Sjostrom, M., and Wieslander, A., *Binding specificities of the GYF domains from two *Saccharomyces cerevisiae* paralogs*. *Protein Eng Des Sel*, 2007. **20**(9): p. 443-52.
41. Kofler, M., Heuer, K., Zech, T., and Freund, C., *Recognition sequences for the GYF domain reveal a possible spliceosomal function of CD2BP2*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(27): p. 28292-7.
42. Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., *et al.*, *Global analysis of protein localization in budding yeast*. *Nature*, 2003. **425**(6959): p. 686-91.
43. Lagerbauer, B., Liu, S., Makarov, E., Vornlocher, H.P., *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.
44. Kofler, M., Schuemann, M., Merz, C., Kosslick, D., *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.
45. Giovannone, B., Lee, E., Laviola, L., Giorgino, F., *et al.*, *Two novel proteins that are linked to insulin-like growth factor (IGF-I) receptors by the Grb10 adapter and modulate IGF-I signaling*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(34): p. 31564-73.
46. Ajiro, M., Katagiri, T., Ueda, K., Nakagawa, H., *et al.*, *Involvement of RQCD1 overexpression, a novel cancer-testis antigen, in the Akt pathway in breast cancer cells*. *Int J Oncol*, 2009. **35**(4): p. 673-81.
47. Ajiro, M., Nishidate, T., Katagiri, T., and Nakamura, Y., *Critical involvement of RQCD1 in the EGFR-Akt pathway in mammary carcinogenesis*. *Int J Oncol*, 2010. **37**(5): p. 1085-93.
48. Lautier, C., Goldwurm, S., Durr, A., Giovannone, B., *et al.*, *Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease*. *Am J Hum Genet*, 2008. **82**(4): p. 822-33.
49. Bras, J., Simon-Sanchez, J., Federoff, M., Morgadinho, A., *et al.*, *Lack of replication of association between GIGYF2 variants and Parkinson disease*. *Hum Mol Genet*, 2009. **18**(2): p. 341-6.
50. Tan, E.K. and Schapira, A.H., *Summary of GIGYF2 studies in Parkinson's disease: the burden of proof*. *Eur J Neurol*, 2010. **17**(2): p. 175-6.
51. Giovannone, B., Tsiaras, W.G., de la Monte, S., Klysik, J., *et al.*, *GIGYF2 gene disruption in mice results in neurodegeneration and altered insulin-like growth factor signaling*. *Hum Mol Genet*, 2009. **18**(23): p. 4629-39.
52. Lillie, S.H. and Brown, S.S., *Suppression of a myosin defect by a kinesin-related gene*. *Nature*, 1992. **356**(6367): p. 358-61.
53. Brown, S.S., *Myosins in yeast*. *Curr Opin Cell Biol*, 1997. **9**(1): p. 44-8.
54. Higashio, H., Sato, K., and Nakano, A., *Smy2p participates in COPII vesicle formation through the interaction with Sec23p/Sec24p subcomplex*. *Traffic*, 2008. **9**(1): p. 79-93.
55. Zanetti, G., Pahuja, K.B., Studer, S., Shim, S., *et al.*, *COPII and the regulation of protein sorting in mammals*. *Nat Cell Biol*, 2012. **14**(1): p. 20-8.
56. Fromont-Racine, M., Rain, J.C., and Legrain, P., *Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens*. *Nat Genet*, 1997. **16**(3): p. 277-82.
57. Wang, Q., Zhang, L., Lynn, B., and Rymond, B.C., *A BBP-Mud2p heterodimer mediates branchpoint recognition and influences splicing substrate abundance in budding yeast*. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(8): p. 2787-98.
58. Rutz, B. and Seraphin, B., *A dual role for BBP/ScSF1 in nuclear pre-mRNA retention and splicing*. *EMBO J*, 2000. **19**(8): p. 1873-86.
59. Sheth, U. and Parker, R., *Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies*. *Science*, 2003. **300**(5620): p. 805-8.
60. Chang, W., Zaarour, R.F., Reck-Peterson, S., Rinn, J., *et al.*, *Myo2p, a class V myosin in budding yeast, associates with a large ribonucleic acid-protein complex that contains mRNAs and subunits of the RNA-processing body*. *RNA*, 2008. **14**(3): p. 491-502.

61. Cosentino, G.P., Schmelzle, T., Haghghat, A., Helliwell, S.B., *et al.*, *Eap1p, a novel eukaryotic translation initiation factor 4E-associated protein in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(13): p. 4604-13.
62. Deloche, O., de la Cruz, J., Kressler, D., Doere, M., *et al.*, *A membrane transport defect leads to a rapid attenuation of translation initiation in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell, 2004. **13**(3): p. 357-66.
63. Sezen, B., Seedorf, M., and Schiebel, E., *The SESA network links duplication of the yeast centrosome with the protein translation machinery*. Genes Dev, 2009. **23**(13): p. 1559-70.
64. Chang, H.C., Moingeon, P., Pedersen, R., Lucich, J., *et al.*, *Involvement of the PPPGHR motif in T cell activation via CD2*. J Exp Med, 1990. **172**(1): p. 351-5.
65. Hahn, W.C. and Bierer, B.E., *Separable portions of the CD2 cytoplasmic domain involved in signaling and ligand avidity regulation*. J Exp Med, 1993. **178**(5): p. 1831-6.
66. Heinze, M., Kofler, M., and Freund, C., *Investigating the functional role of CD2BP2 in T cells*. Int Immunol, 2007. **19**(11): p. 1313-8.
67. Bach, M., Winkelmann, G., and Luhrmann, R., *20S small nuclear ribonucleoprotein U5 shows a surprisingly complex protein composition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(16): p. 6038-42.
68. Behrens, S.E. and Luhrmann, R., *Immunoaffinity purification of a [U4/U6.U5] tri-snRNP from human cells*. Genes Dev, 1991. **5**(8): p. 1439-52.
69. Hartmuth, K., Urlaub, H., Vornlocher, H.P., Will, C.L., *et al.*, *Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 16719-24.
70. Deckert, J., Hartmuth, K., Boehringer, D., Behzadnia, N., *et al.*, *Protein composition and electron microscopy structure of affinity-purified human spliceosomal B complexes isolated under physiological conditions*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(14): p. 5528-43.
71. Reuter, K., Nottrott, S., Fabrizio, P., Luhrmann, R., *et al.*, *Identification, characterization and crystal structure analysis of the human spliceosomal U5 snRNP-specific 15 kD protein*. J Mol Biol, 1999. **294**(2): p. 515-25.
72. Bialkowska, A. and Kurlandzka, A., *Proteins interacting with Lin 1p, a putative link between chromosome segregation, mRNA splicing and DNA replication in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 2002. **19**(15): p. 1323-33.
73. Stevens, S.W., Barta, I., Ge, H.Y., Moore, R.E., *et al.*, *Biochemical and genetic analyses of the U5, U6, and U4/U6 x U5 small nuclear ribonucleoproteins from Saccharomyces cerevisiae*. RNA, 2001. **7**(11): p. 1543-53.
74. Georgiev, A., Leipus, A., Olsson, I., Berrez, J.M., *et al.*, *Characterization of MYR1, a dosage suppressor of YPT6 and RIC1 deficient mutants*. Curr Genet, 2008. **53**(4): p. 235-47.
75. Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., *et al.*, *Global landscape of protein complexes in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Nature, 2006. **440**(7084): p. 637-43.
76. Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., *et al.*, *A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(8): p. 4569-74.
77. Fleischer, T.C., Weaver, C.M., McAfee, K.J., Jennings, J.L., *et al.*, *Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes*. Genes Dev, 2006. **20**(10): p. 1294-307.
78. Wang, C., Wilson-Berry, L., Schedl, T., and Hansen, D., *TEG-1 CD2BP2 regulates stem cell proliferation and sex determination in the C. elegans germ line and physically interacts with the UAF-1 U2AF65 splicing factor*. Dev Dyn, 2012. **241**(3): p. 505-21.
79. Proudfoot, N.J., Furger, A., and Dye, M.J., *Integrating mRNA processing with transcription*. Cell, 2002. **108**(4): p. 501-12.
80. McKee, A.E. and Silver, P.A., *Systems perspectives on mRNA processing*. Cell Res, 2007. **17**(7): p. 581-90.
81. Shatkin, A.J. and Manley, J.L., *The ends of the affair: capping and polyadenylation*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(10): p. 838-42.
82. Jurica, M.S. and Moore, M.J., *Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins*. Mol Cell, 2003. **12**(1): p. 5-14.
83. Wahl, M.C., Will, C.L., and Luhrmann, R., *The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine*. Cell, 2009. **136**(4): p. 701-18.

84. Adesnik, M., Salditt, M., Thomas, W., and Darnell, J.E., *Evidence that all messenger RNA molecules (except histone messenger RNA) contain Poly (A) sequences and that the Poly(A) has a nuclear function.* J Mol Biol, 1972. **71**(1): p. 21-30.
85. Garneau, N.L., Wilusz, J., and Wilusz, C.J., *The highways and byways of mRNA decay.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(2): p. 113-26.
86. Bruno, I. and Wilkinson, M.F., *P-bodies react to stress and nonsense.* Cell, 2006. **125**(6): p. 1036-8.
87. Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., and Izaurralde, E., *P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(1): p. 9-22.
88. Kedersha, N. and Anderson, P., *Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability.* Biochem Soc Trans, 2002. **30**(Pt 6): p. 963-9.
89. Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., *et al.*, *Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling.* J Cell Biol, 2005. **169**(6): p. 871-84.
90. Schaefer, M., Albrecht, N., Hofmann, T., Gudermann, T., *et al.*, *Diffusion-limited translocation mechanism of protein kinase C isoforms.* FASEB J, 2001. **15**(9): p. 1634-6.
91. Felici, F., Castagnoli, L., Musacchio, A., Jappelli, R., *et al.*, *Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector.* J Mol Biol, 1991. **222**(2): p. 301-10.
92. Puck, T.T., Marcus, P.I., and Cieciura, S.J., *Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer.* J Exp Med, 1956. **103**(2): p. 273-83.
93. Gruhler, A., Olsen, J.V., Mohammed, S., Mortensen, P., *et al.*, *Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway.* Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(3): p. 310-27.
94. Stark, C., Breitkreutz, B.J., Reguly, T., Boucher, L., *et al.*, *BioGRID: a general repository for interaction datasets.* Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Database issue): p. D535-9.
95. Stark, C., Breitkreutz, B.J., Chatr-Aryamontri, A., Boucher, L., *et al.*, *The BioGRID Interaction Database: 2011 update.* Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D698-704.
96. Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., *et al.*, *Clustal W and Clustal X version 2.0.* Bioinformatics, 2007. **23**(21): p. 2947-8.
97. Wilkins, M.R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.C., *et al.*, *Protein identification and analysis tools in the ExPASy server.* Methods Mol Biol, 1999. **112**: p. 531-52.
98. Hermjakob, H., Montecchi-Palazzi, L., Lewington, C., Mudali, S., *et al.*, *IntAct: an open source molecular interaction database.* Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Database issue): p. D452-5.
99. Kerrien, S., Aranda, B., Breuza, L., Bridge, A., *et al.*, *The IntAct molecular interaction database in 2012.* Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D841-6.
100. Cox, J. and Mann, M., *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.
101. Mortensen, P., Gouw, J.W., Olsen, J.V., Ong, S.E., *et al.*, *MSQuant, an open source platform for mass spectrometry-based quantitative proteomics.* J Proteome Res, 2010. **9**(1): p. 393-403.
102. Sigrist, C.J., Cerutti, L., de Castro, E., Langendijk-Genevaux, P.S., *et al.*, *PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation.* Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Database issue): p. D161-6.
103. Sigrist, C.J., Cerutti, L., Hulo, N., Gattiker, A., *et al.*, *PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors.* Brief Bioinform, 2002. **3**(3): p. 265-74.
104. Szklarczyk, D., Franceschini, A., Kuhn, M., Simonovic, M., *et al.*, *The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored.* Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D561-8.
105. Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., and Schwede, T., *The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling.* Bioinformatics, 2006. **22**(2): p. 195-201.
106. Bordoli, L., Kiefer, F., Arnold, K., Benkert, P., *et al.*, *Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace.* Nat Protoc, 2009. **4**(1): p. 1-13.

107. *Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt)*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D71-5.
108. Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A., and Schiestl, R.H., *Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(6): p. 1425.
109. Longtine, M.S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., *et al.*, *Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 1998. **14**(10): p. 953-61.
110. Davies, J. and Jimenez, A., *A new selective agent for eukaryotic cloning vectors*. Am J Trop Med Hyg, 1980. **29**(5 Suppl): p. 1089-92.
111. Hadfield, C., Jordan, B.E., Mount, R.C., Pretorius, G.H., *et al.*, *G418-resistance as a dominant marker and reporter for gene expression in Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet, 1990. **18**(4): p. 303-13.
112. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
113. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
114. Schnolzer, M., Jedrzejewski, P., and Lehmann, W.D., *Protease-catalyzed incorporation of 18O into peptide fragments and its application for protein sequencing by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Electrophoresis, 1996. **17**(5): p. 945-53.
115. Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., *et al.*, *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics*. Mol Cell Proteomics, 2002. **1**(5): p. 376-86.
116. Gavin, A.C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., *et al.*, *Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery*. Nature, 2006. **440**(7084): p. 631-6.
117. Collins, S.R., Kemmeren, P., Zhao, X.C., Greenblatt, J.F., *et al.*, *Toward a comprehensive atlas of the physical interactome of Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(3): p. 439-50.
118. Fromont-Racine, M., Mayes, A.E., Brunet-Simon, A., Rain, J.C., *et al.*, *Genome-wide protein interaction screens reveal functional networks involving Sm-like proteins*. Yeast, 2000. **17**(2): p. 95-110.
119. Hurt, E., Luo, M.J., Rother, S., Reed, R., *et al.*, *Cotranscriptional recruitment of the serine-arginine-rich (SR)-like proteins Gbp2 and Hrb1 to nascent mRNA via the TREX complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 1858-62.
120. Tardiff, D.F., Abruzzi, K.C., and Rosbash, M., *Protein characterization of Saccharomyces cerevisiae RNA polymerase II after in vivo cross-linking*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(50): p. 19948-53.
121. Wilmes, G.M., Bergkessel, M., Bandyopadhyay, S., Shales, M., *et al.*, *A genetic interaction map of RNA-processing factors reveals links between Sem1/Dss1-containing complexes and mRNA export and splicing*. Mol Cell, 2008. **32**(5): p. 735-46.
122. Trinkle-Mulcahy, L., Boulon, S., Lam, Y.W., Urcia, R., *et al.*, *Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes*. J Cell Biol, 2008. **183**(2): p. 223-39.
123. Gingras, A.C., Gstaiger, M., Raught, B., and Aebersold, R., *Analysis of protein complexes using mass spectrometry*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(8): p. 645-54.
124. Beggs, J.D., *Lsm proteins and RNA processing*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 3): p. 433-8.
125. Kedersha, N. and Anderson, P., *Mammalian stress granules and processing bodies*. Methods Enzymol, 2007. **431**: p. 61-81.
126. Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., *et al.*, *Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(12): p. 5383-98.
127. Rondon, A.G., Gallardo, M., Garcia-Rubio, M., and Aguilera, A., *Molecular evidence indicating that the yeast PAF complex is required for transcription elongation*. EMBO Rep, 2004. **5**(1): p. 47-53.
128. Mayne, M., Moffatt, T., Kong, H., McLaren, P.J., *et al.*, *CYFIP2 is highly abundant in CD4+ cells from multiple sclerosis patients and is involved in T cell adhesion*. Eur J Immunol, 2004. **34**(4): p. 1217-27.

129. Kiefer, F., Tibbles, L.A., Anafi, M., Janssen, A., *et al.*, *HPK1, a hematopoietic protein kinase activating the SAPK/JNK pathway*. EMBO J, 1996. **15**(24): p. 7013-25.
130. Hu, M.C., Qiu, W.R., Wang, X., Meyer, C.F., *et al.*, *Human HPK1, a novel human hematopoietic progenitor kinase that activates the JNK/SAPK kinase cascade*. Genes Dev, 1996. **10**(18): p. 2251-64.
131. Even, Y., Durieux, S., Escande, M.L., Lozano, J.C., *et al.*, *CDC2L5, a Cdk-like kinase with RS domain, interacts with the ASF/SF2-associated protein p32 and affects splicing in vivo*. J Cell Biochem, 2006. **99**(3): p. 890-904.
132. Chen, H.H., Wong, Y.H., Geneviere, A.M., and Fann, M.J., *CDK13/CDC2L5 interacts with L-type cyclins and regulates alternative splicing*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **354**(3): p. 735-40.
133. Uryga-Polowy, V., Kosslick, D., Freund, C., and Rademann, J., *Resin-bound aminofluorescein for C-terminal labeling of peptides: high-affinity polarization probes binding to polyproline-specific GYF domains*. Chembiochem, 2008. **9**(15): p. 2452-62.
134. Phizicky, E.M. and Fields, S., *Protein-protein interactions: methods for detection and analysis*. Microbiol Rev, 1995. **59**(1): p. 94-123.
135. Gong, Y., Kakihara, Y., Krogan, N., Greenblatt, J., *et al.*, *An atlas of chaperone-protein interactions in Saccharomyces cerevisiae: implications to protein folding pathways in the cell*. Mol Syst Biol, 2009. **5**: p. 275.
136. Selbach, M. and Mann, M., *Protein interaction screening by quantitative immunoprecipitation combined with knockdown (QUICK)*. Nat Methods, 2006. **3**(12): p. 981-3.
137. Nguyen, G.H., Milea, J.S., Rai, A., and Smith, C.L., *Mild conditions for releasing mono and bis-biotinylated macromolecules from immobilized streptavidin*. Biomol Eng, 2005. **22**(4): p. 147-50.
138. Piotukh, K., Geltinger, B., Heinrich, N., Gerth, F., *et al.*, *Directed evolution of sortase A mutants with altered substrate selectivity profiles*. J Am Chem Soc, 2011. **133**(44): p. 17536-9.
139. Dalgarno, D.C., Botfield, M.C., and Rickles, R.J., *SH3 domains and drug design: ligands, structure, and biological function*. Biopolymers, 1997. **43**(5): p. 383-400.
140. Fowler, A., Swift, D., Longman, E., Acornley, A., *et al.*, *An evaluation of fluorescence polarization and lifetime discriminated polarization for high throughput screening of serine/threonine kinases*. Anal Biochem, 2002. **308**(2): p. 223-31.
141. Tucker, M., Valencia-Sanchez, M.A., Staples, R.R., Chen, J., *et al.*, *The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in Saccharomyces cerevisiae*. Cell, 2001. **104**(3): p. 377-86.
142. Collart, M.A., *Global control of gene expression in yeast by the Ccr4-Not complex*. Gene, 2003. **313**: p. 1-16.
143. Azzouz, N., Panasenko, O.O., Colau, G., and Collart, M.A., *The CCR4-NOT complex physically and functionally interacts with TRAMP and the nuclear exosome*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6760.
144. Buchanan, R., Kaufman, A., Kung-Tran, L., and Miller, E.A., *Genetic analysis of yeast Sec24p mutants suggests cargo binding is not co-operative during ER export*. Traffic, 2010. **11**(8): p. 1034-43.
145. Lemmon, M.A., *Membrane recognition by phospholipid-binding domains*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 99-111.
146. Heuer, K., Sylvester, M., Kliche, S., Pusch, R., *et al.*, *Lipid-binding hSH3 domains in immune cell adapter proteins*. J Mol Biol, 2006. **361**(1): p. 94-104.
147. Gubituz, A.K., Feng, W., and Dreyfuss, G., *The SMN complex*. Exp Cell Res, 2004. **296**(1): p. 51-6.
148. Kolb, S.J., Battle, D.J., and Dreyfuss, G., *Molecular functions of the SMN complex*. J Child Neurol, 2007. **22**(8): p. 990-4.
149. Pellizzoni, L., *Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease*. EMBO Rep, 2007. **8**(4): p. 340-5.
150. Kostova, F.V., Williams, V.C., Heemskerk, J., Iannaccone, S., *et al.*, *Spinal muscular atrophy: classification, diagnosis, management, pathogenesis, and future research directions*. J Child Neurol, 2007. **22**(8): p. 926-45.

151. Fallini, C., Zhang, H., Su, Y., Silani, V., *et al.*, *The survival of motor neuron (SMN) protein interacts with the mRNA-binding protein HuD and regulates localization of poly(A) mRNA in primary motor neuron axons.* J Neurosci, 2011. **31**(10): p. 3914-25.
152. Zou, T., Yang, X., Pan, D., Huang, J., *et al.*, *SMN deficiency reduces cellular ability to form stress granules, sensitizing cells to stress.* Cell Mol Neurobiol, 2011. **31**(4): p. 541-50.
153. Reijns, M.A., Alexander, R.D., Spiller, M.P., and Beggs, J.D., *A role for Q/N-rich aggregation-prone regions in P-body localization.* J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 15): p. 2463-72.
154. Wahle, E. and Keller, W., *The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors.* Annu Rev Biochem, 1992. **61**: p. 419-40.
155. Proudfoot, N.J., *Ending the message: poly(A) signals then and now.* Genes Dev, 2011. **25**(17): p. 1770-82.
156. Reisman, D., Glaros, S., and Thompson, E.A., *The SWI/SNF complex and cancer.* Oncogene, 2009. **28**(14): p. 1653-68.
157. Tang, L., Nogales, E., and Ciferri, C., *Structure and function of SWI/SNF chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription.* Prog Biophys Mol Biol, 2010. **102**(2-3): p. 122-8.
158. Waldholm, J., Wang, Z., Brodin, D., Tyagi, A., *et al.*, *SWI/SNF regulates the alternative processing of a specific subset of pre-mRNAs in Drosophila melanogaster.* BMC Mol Biol, 2011. **12**: p. 46.
159. Millevoi, S., Loulergue, C., Dettwiler, S., Karaa, S.Z., *et al.*, *An interaction between U2AF 65 and CF I(m) links the splicing and 3' end processing machineries.* EMBO J, 2006. **25**(20): p. 4854-64.
160. Christofori, G. and Keller, W., *3' cleavage and polyadenylation of mRNA precursors in vitro requires a poly(A) polymerase, a cleavage factor, and a snRNP.* Cell, 1988. **54**(6): p. 875-89.
161. Saller, E., Tom, E., Brunori, M., Otter, M., *et al.*, *Increased apoptosis induction by 121F mutant p53.* EMBO J, 1999. **18**(16): p. 4424-37.
162. Jackson, R.S., 2nd, Cho, Y.J., Stein, S., and Liang, P., *CYFIP2, a direct p53 target, is leptomycin-B sensitive.* Cell Cycle, 2007. **6**(1): p. 95-103.
163. Ingham, R.J., Colwill, K., Howard, C., Dettwiler, S., *et al.*, *WW domains provide a platform for the assembly of multiprotein networks.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(16): p. 7092-106.

6 Anhang

6.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Häufigkeit von PRDs in verschiedenen Organismen	4
Tabelle 1.2: Beschriebene Interaktionen weiterer Proteine mit GYF-Domänen	16
Tabelle 2.1: Liste der verwendeten Enzyme	21
Tabelle 2.2: Liste der verwendeten Vektoren	22
Tabelle 2.3: Liste der verwendeten Oligonukleotide	23
Tabelle 2.4: Übersicht der verwendeten DNA-Konstrukte	24
Tabelle 2.5: Übersicht der verwendeten Antikörper	26
Tabelle 2.6: Übersicht der verwendeten Peptide	26
Tabelle 2.7: Zusammensetzung der SDS-Gele	40
Tabelle 3.1: Vergleich der PPG Φ -Motivverteilung	75
Tabelle 3.2: Vergleich beschriebener Interaktionspartner für Smy2 und GIGYF2	76
Tabelle 3.2: Phagentiter-Bestimmung	77
Tabelle 3.3: K_d -Werte N-Terminal Fluorescein-markierter Peptide	96
Tabelle 6.3.1: Anreicherungsfaktoren der Proteine der Smy2-GYF-SILAC-Pulldown-Experimente	131
Tabelle 6.4.1: Versuchsbedingungen der GIGYF2-GYF-SILAC-Pulldown-Experimente	134
Tabelle 6.4.2: Anreicherungsfaktoren der Proteine der GIGYF2-GYF-SILAC-Pulldown-Experimente	134
Tabelle 6.6.1: Interaktionspartner des Proteins Smy2 aus <i>S. cerevisiae</i>	140
Tabelle 6.6.2: Interaktionspartner des humanen Proteins GIGYF2	141
Tabelle 6.7.1: Interaktionspartner des humanen Proteins CD2BP2	142

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Proteinstrukturen	2
Abbildung 1.2: Strukturen der PRS-Interaktionsdomänen	3
Abbildung 1.3: Symmetrie in der PPII-Helix	5
Abbildung 1.4: Sequenzvergleich der Unterfamilien von GYF-Domänen	7
Abbildung 1.5: Die Struktur der GYF-Domäne von CD2BP2	8
Abbildung 1.6: Peptidbindung der GYF-Domänen von CD2BP2 und Smy2	9
Abbildung 1.7: Proteinorganisation von GIGYF2	11
Abbildung 1.8: Proteinorganisation und -funktion von Smy2	12
Abbildung 1.9: Proteinorganisation, Interaktionen und mögliche Funktionen von CD2BP2	15
Abbildung 1.10: mRNA-Metabolismus in Eukaryoten	17
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines SILAC-Affinitäts-Experimentes	52
Abbildung 3.1: Fluoreszenztitrations der GIGYF2-GYF-Domäne	58
Abbildung 3.2: Inhibition der PRS-Bindungsstelle der GIGYF2-GYF-Domäne	59
Abbildung 3.3: Allgemeiner Ablauf eines SILAC-Pulldown-Experimentes	60
Abbildung 3.4: Venn-Diagramm der Smy2-GYF-Pulldown-Experimente	61
Abbildung 3.5: Streudiagramme der Smy2-GYF-Pulldown-Experimente	62
Abbildung 3.6: Interaktom der Smy2-GYF-Domäne	63
Abbildung 3.7: Venn-Diagramm der GIGYF2-GYF-Pulldown-Experimente	64

Abbildung 3.8.1: Streudiagramme der GIGYF2-GYF- <i>Pulldown</i> -Experimente I und II.....	65
Abbildung 3.8.2: Streudiagramm des GIGYF2-GYF- <i>Pulldown</i> -Experiment III.....	66
Abbildung 3.9: Peptidspektren.....	67
Abbildung 3.10: Interaktom der GIGYF2-GYF-Domäne.....	68
Abbildung 3.11: Überprüfen des chromosomalen HA- <i>Tags</i>	70
Abbildung 3.12: Untersuchung der Interaktion von Smy2-GYF mit Lsm5 und CCR4.....	71
Abbildung 3.13: GIGYF2 und Sec31 kolokalisieren in HeLa-Zellen.....	72
Abbildung 3.14: GIGYF2 ist am ER und am Golgi-Apparat lokalisiert.....	73
Abbildung 3.15: Stress-induzierte Lokalisation von GIGYF2 in zytoplasmatischen Granulae.....	74
Abbildung 3.16: SILAC- <i>Pulldown</i> -Experimente mit der C-terminalen Domäne von Smy2.....	78
Abbildung 3.17: PIP- <i>Strip</i> -Analyse der Lipidbindungseigenschaften von GST-Smy2-C631.....	79
Abbildung 3.18: Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat.....	80
Abbildung 3.19: NMR-Titration der C-terminalen Domäne von Smy2 mit IP3.....	81
Abbildung 3.20: Bestimmung der Bindungskonstanten der CD2BP2-GYF-Varianten.....	82
Abbildung 3.21: Inhibierte PRS-Bindung von CD2BP2-GYF W8R Y33A.....	83
Abbildung 3.22: Organspezifische Proteinexpressionsanalyse für CD2BP2 in der Maus.....	84
Abbildung 3.24: Venn-Diagramm der CD2BP2-GYF-Experimente.....	86
Abbildung 3.25: Gelbahnen der separat aufgetrennten <i>Pulldown</i> -Experimente mit Milzlysat.....	87
Abbildung 3.26: Peptidspektren des zweiten CD2BP2-GYF- <i>Pulldown</i> mit murinem Milzlysat.....	88
Abbildung 3.27: Streudiagramme und Verhältnisdiagramm beider CD2BP2-GYF-Experimente.....	89
Abbildung 3.28: Interaktom der GYF-Domäne von CD2BP2 (Hs).....	90
Abbildung 3.29: Modellierung eines Peptidmimetikums.....	91
Abbildung 3.30: NMR-Titration der GYF-Domäne von CD2BP2.....	92
Abbildung 3.31: Kd-Bestimmung des CD2BP-GYF/EFGP(ProM-2)GWLGR-Komplexes.....	93
Abbildung 3.32: 5(6)-Carboxyfluorescein.....	94
Abbildung 3.33: NMR-Untersuchung der CD2BP2-GYF/VUP496-Interaktion.....	95
Abbildung 3.34: Bestimmung der Dissoziationskonstante des CD2BP2-GYF/VUP496-Komplexes.....	96
Abbildung 3.35: Identifizierte Kleinmoleküle der FP-Assays.....	97
Abbildung 3.36: Untersuchung der Bindung von 2945-011 und des DMSO-Effektes auf die GYF-Domäne.....	99
Abbildung 3.37: Untersuchung der Bindung von D058-0287 an die CD2BP2-GYF-Domäne.....	100
Abbildung 3.38: Verdrängungstest des Liganden VUP496 durch das <i>small molecule</i> D058-0287.....	101
Abbildung 6.8.1: Bindungsstudien der Kleinmoleküle.....	146

6.3 Anreicherungsfaktoren der Proteine der Smy2-GYF-SILAC-*Pulldown*-Experimente

Das Mischverhältnis der Ansätze betrug 1:1. Proteine, die für die Beschreibung des Interaktoms herangezogen wurden sind in Rot hervorgehoben und die Anreicherungsfaktoren ≥ 2 in Grün. Die spezifisch an die WT-Smy2-GYF-Domäne gebundenen Proteine waren ^{13}C -markiert ($^{13}\text{C}_6$ -Lys, $^{13}\text{C}_6$ -Arg). Die Inhibition der Domäne erfolgte durch Zugabe von 2 mM Msl5-L1-Peptid.

Experiment I: Die Proben wurden am Q-Tof Ultima API-Massenspektrometer vermessen. Die Suche erfolgte gegen die Datenbank: UniProtKB/Swiss-Prot Release 56.0 (392667 Sequenzen), 22-Jul-08

Experiment II: Die Proben wurden am LTQ Orbitrap XL-Massenspektrometer vermessen. Die Suche erfolgte gegen die Datenbank: SwissProt 2010_10 (521016 Sequenzen, 183900292 Reste), 2010-10-05

Tabelle 6.3.1: Anreicherungs-faktoren der Proteine der Smy2-GYF-SILAC-Pulldown-Experimente

		Experiment I		Experiment II		
	Acession number	Protein	H/L	# seq. Peptide	H/L	# seq. Peptide
1	P32639	BRR2_YEAST	11,1	14	11	56
2	P25655	NOT1_YEAST	25,8	12	10,9	77
3	P30822	XPO1_YEAST	3	10	10,5	21
4	P38203	LSM2_YEAST	4,6	3	9,8	5
5	P06197	PIS_YEAST	3,5	3	8,7	5
6	P36048	SN114_YEAST	10,4	6	8,6	26
7	P36041	EAP1_YEAST	28,1	7	8,5	13
8	P31384	CCR4_YEAST	23,5	14	8,4	18
9	Q12514	NOT5_YEAST	10,5	4	8,4	13
10	Q06089	YP098_YEAST	3	2	7,7	3
11	P53280	CF130_YEAST	5	2	7,2	4
12	P47079	TCPQ_YEAST	2	7	6,8	20
13	P37898	AAP1_YEAST	2,5	7	6,7	11
14	P40413	TCPE_YEAST	2,2	3	6,2	14
15	P34909	NOT4_YEAST	21	4	5,4	7
16	Q05567	SGPL_YEAST	2,5	2	5,3	6
17	P40030	ERG28_YEAST	2,2	2	5	2
18	Q08972	NEW1_YEAST	6	5	5	9
19	P10591	HSP71_YEAST	9,5	2	4,9	33
20	P36084	MUD2_YEAST	26,5	5	4,7	12
21	P00359	G3P3_YEAST	2,2	8	4,7	11
22	P33334	PRP8_YEAST	9,2	6	4,5	61
23	P22147	XRN1_YEAST	5,8	10	4,4	37
24	Q12186	BBP_YEAST	25,4	4	4,3	9
25	P07342	ILVB_YEAST	2	10	4,3	25
26	P32327	PYC2_YEAST	2,2	8	4,1	6
27	P10592	HSP72_YEAST	7,1	37	4	34
28	P39008	POP2_YEAST	16,2	3	3,8	7
29	P43621	COPD_YEAST	2	3	3,7	6
30	P00330	ADH1_YEAST	2,6	3	3,7	14
31	P40089	LSM5_YEAST	5,9	2	3,6	2
32	P16474	GRP78_YEAST	5,5	5	3,4	10
33	P07251	ATPA_YEAST	2,5	12	3,3	20
34	Q96VH5	YCF7_YEAST	3,1	1	3,3	5
35	P47912	LCF4_YEAST	2,8	7	3,2	3
36	Q06217	SMD2_YEAST	11,6	2	3,2	4

37	Q01217	ARG56_YEAST	2	6	3	9
38	P00937	TRPG_YEAST	2,3	4	3	13
39	P12398	HSP77_YEAST	17,3	13	2,9	12
40	P07244	PUR2_YEAST	2,2	2	2,8	13
41	P14742	GFA1_YEAST	2,8	14	2,7	19
42	P37291	GLYC_YEAST	7,2	2	2,4	19
43	Q12466	TCB1_YEAST	3,4	4	2,1	12
44	Q01560	NOP3_YEAST	8,9	4	2	7
45	P38631	FKS1_YEAST	2	5	1,7	3
46	P05759	RS27A_YEAST	2,1	3	1,1	3
47	P32589	HSP7F_YEAST	2,7	9	1,1	13
48	P40150	HSP76_YEAST	8,7	22	1	23
49	P22138	RPA2_YEAST	2,2	2	0,3	5
50	Q03640	TCB3_YEAST	2,1	3	0,1	16
51	P22943	HSP12_YEAST	7,5	5	0	3
52	P32074	COPG_YEAST	1,9	9	5	32
53	P41811	COPB_YEAST	1,9	17	4,4	27
54	P00549	KPYK1_YEAST	1,9	20	2	30
55	P41940	MPG1_YEAST	1,9	2	8,2	12
56	P38088	SYG_YEAST	1,9	8	4,5	15
57	P39078	TCPD_YEAST	1,9	4	3,8	14
58	P10659	METK1_YEAST	1,9	6	4,9	12
59	P0COV8	RS21A_YEAST	1,9	2	1,5	4
60	P17695	GLRX2_YEAST	1,9	3	0,2	2
61	P30624	LCF1_YEAST	1,9	7	2,3	5
62	P40069	IMB4_YEAST	1,9	13	7	22
63	P07259	PYR1_YEAST	1,8	38	2,9	85
64	P02309	H4_YEAST	1,8	5	0,9	5
65	P38708	YHIO_YEAST	1,8	23	4,6	10
66	P00830	ATPB_YEAST	1,8	4	3,2	19
67	P16861	K6PF1_YEAST	1,8	4	4,2	24
68	Q00955	ACAC_YEAST	1,8	9	4,2	33
69	P17255	VATA_YEAST	1,8	3	2,8	41
70	P00927	THDH_YEAST	1,8	10	2,3	21
71	P48570	HOSC_YEAST	1,8	2	1,6	6
72	P38264	PHO88_YEAST	1,8	12	6	5
73	P36008	EF1G2_YEAST	1,8	2	6,2	13
74	P00815	HIS2_YEAST	1,8	13	2,8	5
75	P04801	SYTC_YEAST	1,7	4	1,2	4
76	P53622	COPA_YEAST	1,7	34	2,9	40
77	P48589	RS12_YEAST	1,7	12	9,9	8
78	P00958	SYMC_YEAST	1,7	11	5,8	8
79	P03965	CARB_YEAST	1,7	7	5,5	32
80	P07149	FAS1_YEAST	1,7	1	0,9	23
81	P02994	EF1A_YEAST	1,7	26	2,3	20
82	P15992	HSP26_YEAST	1,7	6	7,9	4

83	P49167	RL38_YEAST	1,7	5	1	4
84	P09733	TBA1_YEAST	1,6	10	3,8	9
85	P39079	TCPZ_YEAST	1,6	2	4,3	6
86	P02557	TBB_YEAST	1,6	6	3	14
87	P32324	EF2_YEAST	1,6	4	1,7	30
88	P16140	VATB_YEAST	1,6	21	3,1	28
89	P22137	CLH_YEAST	1,6	3	4,1	17
90	P41810	COPB2_YEAST	1,6	23	4,7	27
91	P33892	GCN1_YEAST	1,6	6	4,2	11
92	P11076	ARF1_YEAST	1,5	9	1,4	10
93	Q12335	PST2_YEAST	1,5	2	3,2	2
94	P09436	SYIC_YEAST	1,5	6	3,3	16
95	P34760	TSA1_YEAST	1,4	2	2,5	6
96	P20606	SAR1_YEAST	1,4	8	1,7	11
97	P15108	HSC82_YEAST	1,4	23	2,1	31
98	P04147	PABP_YEAST	1,4	10	1	6
99	P38116	ARL1_YEAST	1,4	2	1,7	5
100	P38701	RS20_YEAST	1,3	5	3,3	7
101	P38764	RPN1_YEAST	1,3	3	3,3	5
102	POC2H8	RL31A_YEAST	1,3	7	1,4	5
103	P41805	RL10_YEAST	1,3	4	0,7	2
104	POCOW9	RL11A_YEAST	1,3	7	1,2	8
105	P32445	RIM1_YEAST	1,3	5	2,3	3
106	P07280	RS19A_YEAST	1,3	11	2,4	5
107	P05743	RL26A_YEAST	1,2	6	0,7	3
108	P26782	RS24_YEAST	1,2	6	1,7	4
109	P35271	RS18_YEAST	1,2	7	0,8	3
110	Q01855	RS15_YEAST	1,2	4	0,7	3
111	P02407	RS17A_YEAST	1,2	3	0,5	6
112	P40213	RS16_YEAST	1,1	9	1,3	5
113	P05739	RL6B_YEAST	1,1	7	0,3	5
114	Q02326	RL6A_YEAST	1,1	13	0,4	6
115	P17079	RL12_YEAST	1,1	4	1,4	3
116	P02400	RLA4_YEAST	1,1	8	1,2	3
117	P36105	RL14A_YEAST	1,1	7	2,3	5
118	P05319	RLA2_YEAST	1,1	8	2,6	4
119	P26785	RL16B_YEAST	1,1	9	0,2	3
120	POC2H6	RL27A_YEAST	1,1	10	0,5	3
121	POC2I0	RL20_YEAST	1	10	0,3	7
122	P04451	RL23_YEAST	1	10	1,3	2
123	P05756	RS13_YEAST	1	16	0,5	6
124	P25373	GLRX1_YEAST	0,8	4	0,6	6

6.4 Anreicherungsfaktoren der Proteine der GIGYF2-GYF-SILAC-Pulldown-Experimente

Proteine, die für die Beschreibung des GIGYF2-GYF-Interaktoms herangezogen wurden sind in Rot hervorgehoben und die Anreicherungsfaktoren ≥ 2 in Grün. Die Inhibition der GIGYF2-GYF-Domäne erfolgte durch Zugabe von 2 mM SmB-2-Peptid. Die Versuchsbedingungen sind der Tabelle 6.4.1 zu entnehmen.

Tabelle 6.4.1: Versuchsbedingungen der GIGYF2-GYF-SILAC-Pulldown-Experimente

Experiment	Mischverhältnis WT: inhibierte Domäne	Verwendete HeLa- Zellfraktion	Markierung WT
I	1:1	Gesamtzell-Lysat	H (13C6-Lys, 13C6-Arg)
II	1:2	Zytoplasma	H (13C6-Lys, 13C6-Arg)
III	1:1	Zytoplasma	H (13C6-Lys, 13C615N4-Arg)

Experiment I & II: Die Proben wurden am Q-ToF Ultima API-Massenspektrometer vermessen. Die Suche erfolgte gegen die Datenbank: UniProtKB/Swiss-Prot Release 56.0 (392667 Sequenzen), 22-Jul-08

Experiment III: Die Proben wurden am LTQ Orbitrap XL-Massenspektrometer vermessen. Die Suche erfolgte gegen die Datenbank: SwissProt 2010_10 (521016 Sequenzen, 183900292 Reste), 2010-10-05

Tabelle 6.4.2: Anreicherungsfaktoren der Proteine der GIGYF2-GYF-SILAC-Pulldown-Experimente

	Accession number	Protein	Experiment II		Experiment I		Experiment III	
			H/L	# seq. Peptide	H/L	# seq. Peptide	H/L	# seq. Peptide
1	O94979	SC31A_HUMAN	9,5	12	22,5	28	20,5	39
2	Q32P44	EMAL3_HUMAN	8,1	4	25,3	9	25,8	21
3	Q9P210	CPSF2_HUMAN	4,5	3			15,4	14
4	Q6UN15	FIP1_HUMAN	4,5	2			7,4	8
5	P55735	SEC13_HUMAN	4,1	2	22,0	2	20,1	3
6	O95486	SC24A_HUMAN	4,1	7			10,3	14
7	Q8N8S7	ENAH_HUMAN	4,1	10	6,3	2	33,2	15
8	P00966	ASSY_HUMAN	4,0	11	10,5	7	8,0	19
9	Q15436	SC23A_HUMAN	3,9	5			3,1	3
10	Q8IU81	I2BP1_HUMAN	3,7	3			1,4	3
11	O14776	TCRG1_HUMAN	3,6	32	25,6	10	37,7	35

12	Q8N684	CPSF7_HUMAN	3,4	3	28,1	7	8,9	12
13	Q96CW5	GCP3_HUMAN	3,3	8			2,3	2
14	Q8N163	K1967_HUMAN	3,2	5	25,9	18	19,8	36
15	Q5VTR2	BRE1A_HUMAN	3,2	3	3,8	3	11,6	21
16	Q15437	SC23B_HUMAN	3,2	7			4,7	12
17	Q86UU0	BCL9L_HUMAN	2,2	3	32,3	9	13,2	22
18	P98175	RBM10_HUMAN	2,0	5	25,1	4	15,0	19
19	Q9BUQ8	DDX23_HUMAN	2,0	18	29,1	6	22,3	30
20	Q15029	U5S1_HUMAN	1,9	21	21,5	18	25,1	35
21	O75643	U520_HUMAN	1,9	23	18,7	6	20,8	99
22	Q6P2Q9	PRP8_HUMAN	1,9	8	19,7	17	25,2	122
23	Q9NTZ6	RBM12_HUMAN	1,7	22	12,8	4	19,2	29
24	P50552	VASP_HUMAN	1,6	8	30,0	7	39,7	8
25	P49756	RBM25_HUMAN	1,5	4	23,9	4	13,5	22
26	O75400	PR40A_HUMAN	1,5	7	20,3	2	12,2	22
27	P57678	GEMI4_HUMAN	1,4	10	17,7	16	12,1	22
28	Q13435	SF3B2_HUMAN	1,4	14	27,7	10	18,8	50
29	O94906	PRP6_HUMAN	1,3	6	26,7	11	16,5	26
30	Q93052	LPP_HUMAN	1,3	4			7,0	5
31	Q9UHI6	DDX20_HUMAN	1,3	9	24,6	8	8,1	11
32	Q12874	SF3A3_HUMAN	1,2	9	31,2	4	34,6	23
33	P11021	GRP78_HUMAN	1,2	12	2,8	6	5,8	26
34	Q15459	SF3A1_HUMAN	1,1	36	29,9	12	16,6	39
35	O15042	SR140_HUMAN	1,1	6	11,3	4	12,0	31
36	O43684	BUB3_HUMAN	1,1	3	26,4	10	24,4	11
37	P08107	HSP71_HUMAN	1,0	10	2,7	25	3,5	26
38	Q12965	MYO1E_HUMAN	1,0	13	6,3	25	9,9	40
39	O14744	ANM5_HUMAN	1,0	6	7,2	2	17,2	24
40	P54259	ATN1_HUMAN			34,2	7	16,7	16
41	Q15428	SF3A2_HUMAN			33,7	3	35,6	11
42	O60828	PQBP1_HUMAN			33,3	3	7,2	2
43	O43670	ZN207_HUMAN			32,9	4	13,9	9
44	Q8WXD5	GEMI6_HUMAN			31,7	2	7,2	3
45	Q9P2N5	RBM27_HUMAN			30,7	4	5,1	8
46	Q9BRQ0	PYGO2_HUMAN			30,6	2	23,6	3
47	Q9BWW4	SSBP3_HUMAN			30,6	2	16,9	3
48	Q9UPN6	SCAF8_HUMAN	0,3	10	28,8	9	7,2	28
49	O95104	SFR15_HUMAN			28,4	6	10,4	15
50	P62306	RUXF_HUMAN			27,7	2	11,0	6
51	P62304	RUXE_HUMAN			26,7	2	12,5	4
52	Q5T6F2	UBAP2_HUMAN			26,4	11	13,6	22
53	Q96DI7	SNR40_HUMAN			25,1	2	40,6	9
54	Q86U70	LDB1_HUMAN			24,7	3	19,2	2
55	Q8IXQ4	K1704_HUMAN			24,6	6	12,1	6
56	P61964	WDR5_HUMAN			24,2	4	13,0	9
57	Q8IWX8	CHERP_HUMAN			23,1	5	11,2	14
58	P35637	FUS_HUMAN			22,9	7	4,1	9
59	P09012	SNRPA_HUMAN			22,9	2	4,7	3

60	O95777	NAA38_HUMAN			22,6	2	58,8	4
61	O75909	CCNK_HUMAN			22,6	3	13,7	8
62	O75533	SF3B1_HUMAN	0,9	40	22,3	11	14,5	63
63	P23246	SFPQ_HUMAN	0,9	21	22,0	4	17,9	41
64	Q96125	SPF45_HUMAN			21,5	3	8,3	12
65	O43395	PRPF3_HUMAN			21,1	6	25,4	32
66	Q14157	UBP2L_HUMAN	0,6	16	21,0	11	11,2	26
67	Q9Y2W2	WBP11_HUMAN	0,7	18	20,8	3	13,5	28
68	P62316	SMD2_HUMAN	0,7	3	20,7	4	10,3	8
69	Q9Y3B4	PM14_HUMAN			20,7	3	11,2	5
70	Q9UN86	G3BP2_HUMAN			20,5	2	1,9	6
71	P08621	RU17_HUMAN			20,3	5	8,1	21
72	Q15233	NONO_HUMAN	0,7	11	20,2	3	25,4	26
73	Q9Y4Z0	LSM4_HUMAN			19,9	2	9,5	3
74	O95628	CNOT4_HUMAN			19,6	3	12,6	9
75	P09234	RU1C_HUMAN			19,2	2	4,6	2
76	Q8WWY3	PRP31_HUMAN			19,1	2	10,8	11
77	Q53GS9	SNUT2_HUMAN			18,9	2	10,6	7
78	Q9BWW5	SF3B5_HUMAN			18,1	3	12,0	3
79	P08572	CO4A2_HUMAN			18,0	2	20,8	3
80	Q15427	SF3B4_HUMAN			18,0	3	8,1	10
81	O95400	CD2B2_HUMAN			18,0	3	35,2	7
82	Q9Y5U2	TSSC4_HUMAN			17,7	2	72,9	3
83	O43290	SNUT1_HUMAN	0,8	8	17,6	3	8,9	16
84	Q13283	G3BP1_HUMAN			17,5	4	1,3	6
85	P62314	SMD1_HUMAN			17,5	3	9,7	5
86	Q9BTD8	RBM42_HUMAN			17,4	2	4,7	2
87	Q9NYV4	CDK12_HUMAN			17,4	2	5,6	6
88	Q04726	TLE3_HUMAN			17,3	3	11,3	13
89	Q8NBJ5	GT251_HUMAN			16,6	7	11,7	7
90	Q9Y4B5	KO802_HUMAN			16,5	11	4,5	6
91	Q15393	SF3B3_HUMAN	0,9	12	16,5	19	17,6	50
92	Q16630	CPSF6_HUMAN			16,3	4	7,9	8
93	O60568	PLOD3_HUMAN			16,0	9	14,4	15
94	P08579	RU2B_HUMAN	0,9	2	15,6	4	17,1	2
95	P56545	CTBP2_HUMAN			15,5	3	16,5	12
96	O43172	PRP4_HUMAN			15,2	3	13,3	14
97	O60610	DIAP1_HUMAN			15,1	12	5,1	30
98	Q9BRS2	RIOK1_HUMAN			14,6	3	0,2	4
99	O43719	HTSF1_HUMAN	0,9	15	14,1	4	22,7	33
100	P84103	SRSF3_HUMAN			13,2	3	5,0	4
101	Q14444	CAPR1_HUMAN			12,8	9	0,6	3
102	Q9BQA1	MEP50_HUMAN			12,7	5	26,3	4
103	Q9UKV8	AGO2_HUMAN			12,4	3	6,3	14
104	Q9Y3F4	STRAP_HUMAN			12,2	8	1,8	11
105	Q96GM8	TOE1_HUMAN			12,1	4	3,7	5
106	P84090	ERH_HUMAN			11,9	2	1,3	2
107	O43143	DHX15_HUMAN			11,8	5	9,2	31

108	P61962	DCAF7_HUMAN			11,8	3	4,9	5
109	Q15020	SART3_HUMAN			11,7	10	25,6	29
110	Q02809	PLOD1_HUMAN			11,4	5	9,3	9
111	Q96EP5	DAZP1_HUMAN			11,3	2	15,6	6
112	P62318	SMD3_HUMAN			11,2	2	9,0	2
113	P49902	5NTC_HUMAN			11,1	4	24,3	17
114	Q9UPQ9	TNR6B_HUMAN			10,9	2	7,8	15
115	P68400	CSK21_HUMAN			10,3	4	8,8	6
116	P51991	ROA3_HUMAN			10,2	3	7,7	3
117	P54105	ICLN_HUMAN			9,6	3	23,4	3
118	O00512	BCL9_HUMAN			9,5	2	13,8	21
119	Q7Z4S6	KI21A_HUMAN			9,2	3	14,8	35
120	P53999	TCP4_HUMAN			9,2	2	0,5	6
121	P52294	IMA1_HUMAN			8,4	3	8,8	3
122	P26368	U2AF2_HUMAN			8,3	4	5,2	5
123	Q14694	UBP10_HUMAN			8,1	6	0,5	2
124	Q6PKG0	LARP1_HUMAN			8,0	3	2,9	8
125	Q7Z417	NUFP2_HUMAN	0,4	13	8,0	3	1,2	7
126	Q9HCE1	MOV10_HUMAN			7,9	5	4,8	5
127	P22626	ROA2_HUMAN	0,4	8	7,7	8	6,3	12
128	Q92890	UFD1_HUMAN			7,7	7	10,2	7
129	P17844	DDX5_HUMAN			7,4	8	2,4	19
130	P09651	ROA1_HUMAN			6,9	3	7,0	4
131	Q13310	PABP4_HUMAN			6,8	2	1,5	10
132	P16989	DBPA_HUMAN			6,8	2	2,2	2
133	Q8TAT6	NPL4_HUMAN			6,8	7	8,2	10
134	Q96SB4	SRPK1_HUMAN			6,7	2	4,0	4
135	Q07666	KHDR1_HUMAN			6,6	4	2,7	8
136	Q7Z739	YTHD3_HUMAN			6,6	2	2,3	5
137	P63173	RL38_HUMAN	0,6	5	6,2	5	0,1	6
138	Q92900	RENT1_HUMAN			6,2	6	3,9	14
139	P61254	RL26_HUMAN			6,1	5	0,8	6
140	P62750	RL23A_HUMAN			6,0	4	0,2	4
141	P37108	SRP14_HUMAN			5,9	2	1,2	5
142	P49458	SRP09_HUMAN			5,9	2	1,2	3
143	P62244	RS15A_HUMAN			5,8	2	2,1	5
144	P08708	RS17_HUMAN			5,8	4	2,2	7
145	Q01844	EWS_HUMAN			5,7	6	3,6	7
146	Q9UPS6	SET1B_HUMAN			5,6	2	11,9	18
147	P62081	RS7_HUMAN			5,5	3	0,9	2
148	P62847	RS24_HUMAN			5,5	2	1,0	4
149	Q08211	DHX9_HUMAN			5,4	5	5,4	17
150	Q15637	SF01_HUMAN			5,3	2	10,6	12
151	P18621	RL17_HUMAN			5,3	4	0,1	4
152	P05387	RLA2_HUMAN			5,2	4	1,5	3
153	P62263	RS14_HUMAN			5,2	2	2,0	4
154	P83731	RL24_HUMAN			5,2	3	0,2	4
155	Q99729	ROAA_HUMAN			5,1	4	2,8	5

156	O60506	HNRPQ_HUMAN			5,1	9	3,6	8
157	Q9BQ61	CS043_HUMAN			5,0	2	2,5	3
158	P62851	RS25_HUMAN			5,0	2	1,9	4
159	P62280	RS11_HUMAN			5,0	2	1,7	5
160	P52272	HNRPM_HUMAN			4,9	3	3,5	46
161	P42766	RL35_HUMAN			4,9	2	0,0	2
162	P62249	RS16_HUMAN	0,4	6	4,9	6	5,2	9
163	Q9UMS4	PRP19_HUMAN			4,9	2	3,4	2
164	P07910	HNRPC_HUMAN			4,9	7	3,7	2
165	Q92734	TFG_HUMAN			4,8	5	1,3	4
166	Q92841	DDX17_HUMAN			4,8	3	4,9	24
167	P31943	HNRH1_HUMAN			4,6	4	3,1	14
168	Q99873	ANM1_HUMAN			4,6	11	0,9	4
169	P30050	RL12_HUMAN			4,6	2	0,7	5
170	P19525	E2AK2_HUMAN			4,6	2	0,0	5
171	P42677	RS27_HUMAN			4,6	3	0,9	2
172	P46776	RL27A_HUMAN			4,5	3	0,4	2
173	P52597	HNRPF_HUMAN			4,5	3	3,0	14
174	P46783	RS10_HUMAN			4,4	3	2,2	5
175	Q8TEQ6	GEMIS_HUMAN			4,3	8	7,2	42
176	P06748	NPM_HUMAN			4,2	9	0,5	7
177	P11940	PABP1_HUMAN	0,7	19	4,1	8	1,4	15
178	P62269	RS18_HUMAN	0,5	13	4,1	6	6,2	12
179	P61353	RL27_HUMAN			4,1	2	13,5	7
180	P62277	RS13_HUMAN			3,9	2	0,7	8
181	P39019	RS19_HUMAN			3,9	4	3,6	11
182	Q14103	HNRPD_HUMAN			3,7	5	3,2	6
183	P62829	RL23_HUMAN			3,7	2	0,2	3
184	Q92974	ARHG2_HUMAN			3,7	3	0,1	30
185	Q7L2J0	MEPCE_HUMAN			3,7	2	5,5	5
186	O15027	SC16A_HUMAN			3,5	3	2,9	35
187	P62913	RL11_HUMAN			3,5	3	0,3	3
188	Q00839	HNRPU_HUMAN			3,4	6	1,2	19
189	Q12905	ILF2_HUMAN			3,3	7	1,5	2
190	P26599	PTBP1_HUMAN			3,2	5	0,2	8
191	Q8NE71	ABCF1_HUMAN			3,2	5	0,1	9
192	O00571	DDX3X_HUMAN			3,2	6	1,6	29
193	P62857	RS28_HUMAN			3,1	2	7,6	2
194	P62888	RL30_HUMAN			3,1	2	1,2	4
195	Q6Y7W6	PERQ2_HUMAN			3,0	3	0,1	12
196	P53621	COPA_HUMAN			2,5	9	0,2	5
197	P11142	HSP7C_HUMAN			2,5	17	3,4	30
198	P52907	CAZA1_HUMAN			2,5	3	0,3	7
199	P62158	CALM_HUMAN			2,4	2	1,3	9
200	P60866	RS20_HUMAN			2,2	2	2,3	2
201	P05198	IF2A_HUMAN			2,1	3	0,0	7
202	Q86W92	LIPB1_HUMAN			2,0	2	0,0	16
203	P55884	EIF3B_HUMAN			2,0	2	0,6	7

204	Q13509	TBB3_HUMAN			2,0	2	1,0	12
205	Q86UK7	ZN598_HUMAN			2,0	32	1,9	35
206	P49411	EFTU_HUMAN			1,7	16	0,0	9
207	P68366	TBA4A_HUMAN			1,7	2	1,5	18
208	P68371	TBB2C_HUMAN			1,7	3	1,0	19
209	Q15293	RCN1_HUMAN			1,5	4	0,3	3
210	Q15366	PCBP2_HUMAN			1,5	3	0,1	7
211	Q9BQE3	TBA1C_HUMAN			1,4	12	1,2	20
212	P68363	TBA1B_HUMAN			1,4	6	0,0	20
213	Q01813	K6PP_HUMAN			1,4	7	0,6	16
214	P07437	TBB5_HUMAN	0,4	3	1,4	18	1,1	19
215	P38646	GRP75_HUMAN			1,4	6	4,3	17
216	P78527	PRKDC_HUMAN			1,3	2	0,2	105
217	P18085	ARF4_HUMAN			1,3	4	0,1	8
218	P11310	ACADM_HUMAN			1,3	2	0,1	2
219	P25705	ATPA_HUMAN			1,3	19	0,2	5
220	P15924	DESP_HUMAN			1,2	9	0,0	55
221	P52701	MSH6_HUMAN			1,2	3	0,1	27
222	Q15645	TRP13_HUMAN			1,2	3	0,1	11
223	P61978	HNRPK_HUMAN			1,2	11	1,1	13
224	O75340	PDCD6_HUMAN			1,1	3	2,2	6
225	Q04637	IF4G1_HUMAN			1,1	3	0,1	73
226	Q14152	EIF3A_HUMAN			1,0	16	0,8	13
227	O95373	IPO7_HUMAN			0,9	4	0,7	9
228	Q16531	DDB1_HUMAN			0,9	7	1,1	18
229	P50454	SERPH_HUMAN			0,9	2	0,2	6
230	O43813	LANC1_HUMAN			0,9	2	0,7	7
231	P10809	CH60_HUMAN			0,8	16	0,1	18
232	P31327	CPSM_HUMAN			0,7	40	0,1	8
233	P53396	ACLY_HUMAN			0,7	4	0,2	4
234	P50990	TCPQ_HUMAN			0,6	5	0,5	13
235	P08238	HS90B_HUMAN			0,6	14	0,1	24
236	P68104	EF1A1_HUMAN	0,4	12	0,5	2	0,1	23
237	P07900	HS90A_HUMAN			0,3	12	0,1	14
238	Q14697	GANAB_HUMAN			0,3	4	0,2	2
239	P62937	PPIA_HUMAN			0,1	2	0,1	6
240	P21266	GSTM3_HUMAN	0,7	9			0,5	14
241	P08670	VIME_HUMAN	0,2	45			0,1	35
242	P35579	MYH9_HUMAN	0,2	113			1,1	109
243	P60660	MYL6_HUMAN	0,2	7			0,5	7

6.5 Proteinsequenz von SMN

Accession Number: Q16637

Name: SMN, *Survival motor neuron protein*

Swissprot-ID: SMN_HUMAN

MW: 31,8 kDa

Aminosäuresequenz:

MAMSSGGSGGGVPEQEDSVLFRRTGTGQSDSDIWDDTALIKAYDKAVASFKHALKNGDICE
 TSGKPKTTPKRKPAKKNKSQKKNTAASLQQWKVGDKCSAIWSEDGCIYPATIASIDFKRETC
 VVVYTYGNREEQNLSDLLSPICEVANNIEQNAQENENESQVSTDESENSRSPGNKSDNIKPK
 SAPWNSFLPPPPMPGPRLGPGKPGGLKFNGPPPPPPPPPHLLSCWLPPFPSPGPPPPPPPPICPDSL
 DDADALGSMLISWYMSGYHTGYMGFRQNQKEGRCSHSLN

6.6 Beschriebene Interaktionspartner von Smy2 und GIGYF2

Die folgenden Tabellen geben die in der BioGrid (www.thebiogrid.org) und der IntAct-Datenbank (www.ebi.ac.uk/intact/) bereits beschriebenen Interaktionen für Smy2 und GIGYF2 wieder.

Tabelle 6.6.1: Interaktionspartner des Proteins Smy2 aus *S. cerevisiae*

Smy2 Interaktionen:

Affinitätsaufreinigung

Interaktionspartner	Swissprot-ID	Beschreibung
RPS0A, RPS11B, RPS17A, RPS1A, RPS24B, RPP0, RPL1B, RPL20B	P32905, P0CX48, P02407, P33442, P0CX32, P05317, P0CX44, P0CX24	ribosomal Proteine
TEF2	P02994	<i>Eukaryotic elongation factor 1A</i>
CDC33	P07260	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
HSP82, SSE1, SSA1, SSA2, ECM10	P02829, P32589, P10591, P10592, P39987	Hitzeschockproteine
HEK2	P38199	<i>Heterogeneous nuclear rnp K-like protein 2</i>
CSE4	P36012	<i>Histone H3-like centromeric protein CSE4</i>
NAB2	P32505	<i>Nuclear polyadenylated RNA-binding protein NAB2</i>
UBI4	P0CG63	Polyubiquitin
IMD4	P50094	<i>Probable inosine-5'-monophosphate dehydrogenase</i>
SMY2	P32909	Protein SMY2
SSB1	P10080	<i>Single-stranded nucleic acid-binding protein</i>
BRE5	P53741	<i>UBP3-associated protein BRE5</i>
VMA2	P16140	<i>Vacuolar proton pump subunit B</i>

Rekonstruktionsassay (Y2H/DHFR)

Interaktionspartner	Swissprot-ID	Beschreibung
MUD2	P36084	<i>Splicing factor MUD2</i>
MSL5	Q12186	<i>Branchpoint-bridging protein</i>
NCS6	P53088	<i>Cytoplasmic tRNA 2-thiolation protein 1</i>

Genetische Interaktion

Interaktionspartner	Swissprot-ID	Beschreibung
RPB8	P20436	<i>RNA polymerases I, II, and III subunit ABC3</i>
SEC24	P40482	<i>Protein transport protein SEC24</i>
AAT2	P23542	Transaminase A
FRA1	Q07825	<i>Putative Xaa-Pro Aminopeptidase</i>
YIRO16W	P40572	Uncharakterisiertes Protein
AIM44	Q99299	<i>Altered inheritance of mitochondria protein 44</i>
SBA1	P28707	<i>Co-chaperone protein SBA1</i>
HOF1	Q05080	<i>Cytokinesis protein 2</i>
ILM1	P47155	<i>Increased loss of mitochondrial DNA protein 1</i>
PPA2	P28239	<i>Inorganic pyrophosphatase, mitochondrial</i>
YME1	P32795	<i>Yeast mitochondrial escape protein 1</i>
CDC48	P25694	<i>Cell division control protein 48</i>
DSN1	P40568	<i>Kinetochore-associated protein DSN1</i>
EAF1, EAF5, EAF7, YNG2	Q06337, P39995, P53911, P38806	<i>Chromatin modification-related protein</i>
FLC1, FLC2	Q08967, P39719	<i>Flavin carrier protein</i>
ASC1	P38011	<i>Receptor of activated protein kinase C 1 (RACK1)</i>
BBP1	Q12365	<i>BFR1-binding protein 1</i>
BFR1	P38934	<i>Brefeldin A resistance protein 1</i>
MPS2	P53159	<i>Monopolar spindle protein 2</i>
SCP160	P06105	<i>Protein SCP160 (Protein HX)</i>
EAP1	P36041	<i>eIF4E-associated protein 1 (EAP1)</i>
RAD9	P14737	<i>DNA repair protein RAD9</i>

Tabelle 6.6.2: Interaktionspartner des humanen Proteins GIGYF2**GIGYF2 Interaktionen:****Affinitätsaufreinigung**

Interaktionspartner	Swissprot-ID	Beschreibung
USP11	P51784	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 11</i>
HSP90AA1	P07900	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>
EIF4A2	Q14240	<i>Eukaryotic initiation factor 4A-II</i>
MYC	P01106	<i>Transcription factor p64</i>

Rekonstruktionsassay (Y2H)

Interaktionspartner	Swissprot-ID	Beschreibung
APC	P25054	<i>Adenomatous polyposis coli protein</i>
GRB10	Q13322	<i>Growth factor receptor-bound protein 10</i>
RBM12	Q9NTZ6	<i>RNA-binding protein 12</i>
SNRPB	P14678	<i>Sm protein B/B'</i>
SNRPC	P09234	<i>U1 small nuclear ribonucleoprotein C</i>
SNRPN	P63162	<i>Sm protein N</i>
WBP11	Q9Y2W2	<i>WW domain-binding protein 11</i>

6.7 Anreicherungsfaktoren der Proteine der CD2BP2-GYF-Pulldown-Experimente mit ¹⁸O-Markierung

Proteine des CPSF-, des SWI/SNF-Komplexes und die gewebespezifischen Proteine sind in Rot hervorgehoben. Die Anreicherungsfaktoren ≥ 2 sind in Grün hervorgehoben. Das Mischverhältnis der Ansätze betrug 1:1. Die Inhibition der CD2BP2-GYF-Domäne erfolgte durch Mutation der PRS-Bindungsstelle (W8R Y33A). Spezifische Binder der PRS-Bindungsstelle waren in Experiment I ¹⁸O-markiert und in Experiment II ¹⁶O-markiert. Die Proben wurden am LTQ Orbitrap XL-Massenspektrometer vermessen. Die Suche erfolgte gegen die Datenbank: SwissProt 2010_10 (521016 Sequenzen, 183900292 Reste), 2010-10-05

Tabelle 6.7.1: Interaktionspartner des humanen Proteins CD2BP2

	Accession number	Protein	Experiment I		Experiment II	
			H/L	# seq. Peptide	L/H	# seq. Peptide
1	Q6NVF9	CPSF6_MOUSE	4,37E+06	4	3,0	11
2	Q69ZA1	CDK13_MOUSE	3,75E+06	3	36,8	5
3	Q922U1	PRPF3_MOUSE	2,85E+06	3	6,3	24
4	O08553	DPYL2_MOUSE	2,10E+06	8	228,8	8
5	Q8C9B9	DIDO1_MOUSE	1,66E+06	2	95,6	4
6	Q9EPU4	CPSF1_MOUSE	1,43E+06	7	8,8	30
7	Q9DC48	PRP17_MOUSE	1,39E+06	4	15,9	14
8	Q3TKT4	SMCA4_MOUSE	1,12E+06	25	24,8	3
9	Q6DIC0	SMCA2_MOUSE	1,11E+06	16	241,8	18
10	Q8VDP4	K1967_MOUSE	1,00E+06	4	154,4	29
11	Q9CSN1	SNW1_MOUSE	8,72E+05	3	4,4	14
12	P97384	ANX11_MOUSE	7,97E+05	8	193,1	5
13	P70460	VASP_MOUSE	7,39E+05	13	190,9	9
14	Q6NV83	SR140_MOUSE	6,46E+05	10	89,8	10
15	P62317	SMD2_MOUSE	6,01E+05	3	14,4	6
16	Q9ESU6	BRD4_MOUSE	5,69E+05	5	1809,0	2

17	Q921M3	SF3B3_MOUSE	5,38E+05	26	4,0	37
18	Q923D5	WBP11_MOUSE	5,25E+05	5	3,9	17
19	P39054	DYN2_MOUSE	5,19E+05	22	53,1	9
20	Q6PDG5	SMRC2_MOUSE	4,81E+05	23	143,7	24
21	O54941	SMCE1_MOUSE	4,62E+05	5	415,3	3
22	Q8CH02	SUGP1_MOUSE	4,46E+05	6	43,4	12
23	Q3U0V1	FUBP2_MOUSE	4,35E+05	10	28,2	2
24	Q8CFQ3	AQR_MOUSE	4,15E+05	13	55,1	21
25	Q91WJ8	FUBP1_MOUSE	3,19E+05	4	635,1	7
26	Q9Z0H3	SNF5_MOUSE	2,10E+05	2	319,0	3
27	P62315	SMD1_MOUSE	1,95E+05	7	15,0	7
28	Q8R081	HNRPL_MOUSE	1,85E+05	9	44,3	23
29	P62309	RUXG_MOUSE	1,68E+05	2	2,9	3
30	P97496	SMRC1_MOUSE	1,37E+05	17	341,4	14
31	O35286	DHX15_MOUSE	1,29E+05	13	22,5	36
32	Q3UIA2	RHG17_MOUSE	1,29E+05	8	171,1	8
33	Q99PV0	PRP8_MOUSE	1,15E+05	51	6,2	117
34	Q8VC03	EMAL3_MOUSE	1,04E+05	5	107,8	2
35	Q9Z315	SNUT1_MOUSE	1,03E+05	4	9,5	23
36	Q8JZX4	SPF45_MOUSE	1,02E+05	4	19,2	7
37	Q61656	DDX5_MOUSE	9,69E+04	9	24,5	16
38	Q8CGF7	TCRG1_MOUSE	8,75E+04	12	20,4	26
39	Q9D554	SF3A3_MOUSE	8,23E+04	9	5,4	27
40	Q7TMK9	HNRPQ_MOUSE	7,10E+04	2	201,5	4
41	Q64213	SF01_MOUSE	6,93E+04	3	172,5	5
42	Q61466	SMRD1_MOUSE	6,55E+04	3	164,9	7
43	P70315	WASP_MOUSE	6,11E+04	6	5,0	10
44	P70429	EVL_MOUSE	5,63E+04	22	101,6	13
45	Q9DAW6	PRP4_MOUSE	5,60E+04	3	5,9	9
46	Q99K48	NONO_MOUSE	5,50E+04	18	5,7	23
47	Q99KP6	PRP19_MOUSE	5,27E+04	4	2,4	3
48	Q3TIX9	SNUT2_MOUSE	4,90E+04	3	18,3	10
49	A2BH40	ARI1A_MOUSE	4,30E+04	9	340,6	11
50	Q91YR7	PRP6_MOUSE	2,85E+04	12	21,3	31
51	Q60749	KHDR1_MOUSE	2,44E+04	4	8,5	10
52	Q7TQH0	ATX2L_MOUSE	2,01E+04	7	16,3	2
53	Q9CQU1	MFAP1_MOUSE	1,67E+04	2	7,4	9
54	Q6PE01	SNR40_MOUSE	1,54E+04	9	3,6	14
55	Q8QZY9	SF3B4_MOUSE	1,48E+04	5	8,0	10
56	Q99JR8	SMRD2_MOUSE	1,36E+04	8	286,5	6
57	O35218	CPSF2_MOUSE	1,15E+04	6	12,9	31
58	Q8C5N3	CWC22_MOUSE	1,14E+04	3	31,0	2
59	P63154	CRNL1_MOUSE	5,82E+03	3	26,3	10
60	B2RY56	RBM25_MOUSE	5,42E+03	4	51,2	9
61	Q8K117	WIPF1_MOUSE	5,15E+03	3	6,2	9
62	P61979	HNRPK_MOUSE	4,45E+03	16	89,2	16

63	Q3UKJ7	SMU1_MOUSE	3,88E+03	4	4,0	21
64	Q922V4	PLRG1_MOUSE	3,56E+03	3	9,7	15
65	Q6A068	CDC5L_MOUSE	3,28E+03	4	4,3	36
66	Q8BG05	ROA3_MOUSE	2,19E+03	6	169,5	21
67	P70218	M4K1_MOUSE	2,05E+03	5	16,7	2
68	P54823	DDX6_MOUSE	1,60E+03	2	22,2	2
69	Q8VIJ6	SFPQ_MOUSE	1,13E+03	19	1,0	37
70	Q9DCD2	SYF1_MOUSE	858,7	6	51,8	15
71	Q7TSC1	PRC2A_MOUSE	849,3	4	28,5	4
72	Q91VC3	IF4A3_MOUSE	677,0	5	18,4	14
73	P19157	GSTP1_MOUSE	498,9	13	0,0	6
74	Q8BHS3	RBM22_MOUSE	358,5	2	5,6	9
75	Q8CCF0	PRP31_MOUSE	241,9	5	4,6	12
76	Q62376	RU17_MOUSE	199,6	2	54,2	3
77	Q8K4Z5	SF3A1_MOUSE	154,7	21	10,6	38
78	Q8R326	PSPC1_MOUSE	122,4	5	2,1	12
79	Q9ES52	SHIP1_MOUSE	118,3	6	130,7	7
80	Q99NB9	SF3B1_MOUSE	104,5	26	18,4	57
81	O08810	U5S1_MOUSE	93,6	25	8,9	45
82	Q9JII5	DAZP1_MOUSE	66,9	2	1029,0	3
83	Q8CGZ0	CHERP_MOUSE	51,7	5	6,9	8
84	Q00PI9	HNRL2_MOUSE	44,6	2	13,1	5
85	Q9R0I7	YLPM1_MOUSE	43,6	3	36,3	7
86	Q8BHD7	ROD1_MOUSE	31,3	2	26,4	9
87	Q8VDM6	HNRL1_MOUSE	26,0	5	204,9	7
88	Q5SQX6	CYFP2_MOUSE	23,9	4	6,6	2
89	Q9R1C7	PR40A_MOUSE	22,2	6	31,5	13
90	Q9JJI8	RL38_MOUSE	21,4	2	3,6	5
91	Q9JKF1	IQGA1_MOUSE	20,6	3	2,7	2
92	P62305	RUXE_MOUSE	18,5	3	7,5	4
93	Q501J6	DDX17_MOUSE	15,0	5	47,5	3
94	Q99LF4	RTCB_MOUSE	12,4	6	28,4	2
95	P27659	RL3_MOUSE	10,4	4	22,5	5
96	P58252	EF2_MOUSE	7,1	13	17,8	3
97	Q91VR5	DDX1_MOUSE	6,8	14	28,3	5
98	P62843	RS15_MOUSE	5,9	6	3,2	2
99	P61358	RL27_MOUSE	5,5	9	21,3	3
100	P63017	HSP7C_MOUSE	5,2	10	2,2	2
101	Q9D0E1	HNRPM_MOUSE	5,1	9	161,1	25
102	P62301	RS13_MOUSE	4,3	5	0,6	3
103	Q8BK67	RCC2_MOUSE	4,2	13	6,2	5
104	P62889	RL30_MOUSE	4,2	5	6,7	3
105	P01872	IGHM_MOUSE	4,0	2	2,6	2
106	P83877	TXN4A_MOUSE	3,6	3	2,7	7
107	Q99J72	ABEC3_MOUSE	3,6	3	3,5	2
108	P62852	RS25_MOUSE	3,5	5	7,2	3

109	P20029	GRP78_MOUSE	3,3	23	1,6	26
110	Q9CWK3	CD2B2_MOUSE	3,3	5	1,5	4
111	P02088	HBB1_MOUSE	1,7	10	1,6	5
112	P10126	EF1A1_MOUSE	1,3	7	2,9	4
113	Q64475	H2B1B_MOUSE	1,1	10	6,1	6
114	Q9D8N0	EF1G_MOUSE	0,5	11	1,6	7
115	P62806	H4_MOUSE	0,4	2	5,7	5
116	P18760	COF1_MOUSE	0,3	3	1,1	2
117	Q8VDD5	MYH9_MOUSE	0,030	89	0,8	53
118	P62307	RUXF_MOUSE	0,002	3	8,0	3

6.8 NMR-Untersuchungen mit den *small molecules*

In Tabelle 6.8.1 sind die eingesetzten Protein-, Ligand- und DMSO-Konzentrationen der NMR-Bindungsstudien der *small molecules* (s. 3.5.3, Ergebnisteil) angegeben. Die Spektren der NMR-Untersuchungen der Verbindungen D058-0287 (1,09 mM), 2922-0532 (0,2 mM), 5408-0428 (0,2 mM) und D011-1842 (0,2 mM) sind in Abbildung 6.8.1 gezeigt.

Weitere Verbindungen im Ergebnisteil unter 3.5.3:

Abbildung 3.36: Verbindung 2945-011 (1,98 mM)

Abbildung 3.37: Verbindung D058-0287 (0,2 mM)

Tabelle 6.8.1: Eingesetzte Konzentrationen der Kleinmoleküle

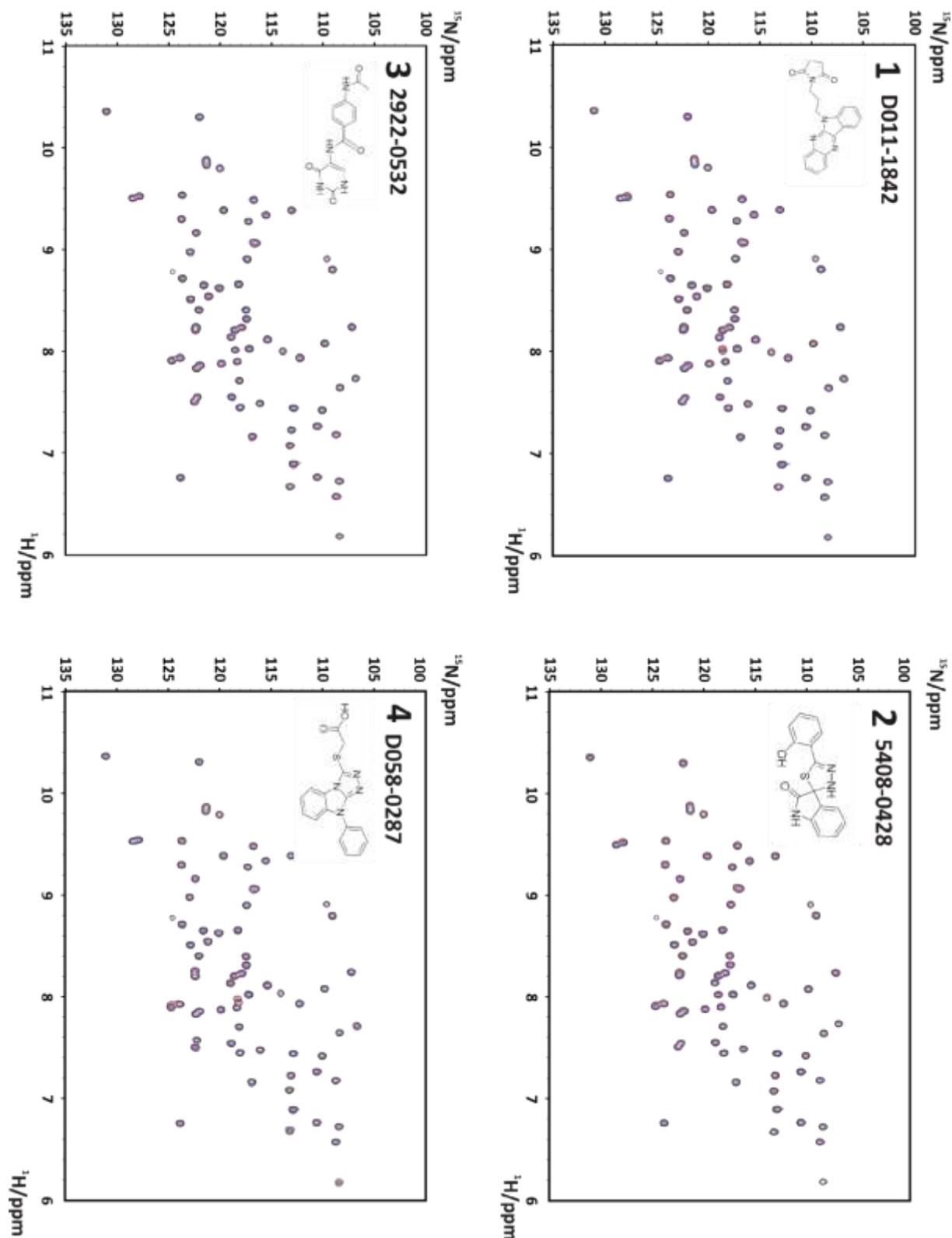
Substanz	FP-Assay				NMR-Probe		Referenz-Probe	
	K _d	MW (Da)	mg	Stammlösung	C _{Ligand}	C _{DMSO}	C _{GYF62}	C _{DMSO}
D058-0287	21 µM	324,4	5	100 mM	1,09 mM	1,31 %	150 µM	1,31 %
2945-0011	29 µM	310,7	5,1	100 mM	1,98 mM	2,22 %	150 µM	3,07 %
6153-0089	36 µM	275,4	5,3	50 mM* ¹	nicht vermessen			
2922-0532	55 µM	288,3	1	50 mM	0,2 mM	0,4 %	150 µM	0,4 %
5408-0428	84 µM	297,3	5	100 mM	0,2 mM	0,2 %	150 µM	0,2 %
D011-1842	87 µM	358,4	5,3	100 mM	0,2 mM* ²	0,2 %	151 µM	0,2 %

Bemerkungen:

*¹ Substanz war in einer Konzentration von 50 mM unlöslich

*² Substanz fiel in der NMR-Probe aus

Abbildung 6.8.1: Bindungsstudien der Kleinmoleküle an die ^{15}N -markierte GYF-Domäne von CD2BP2. Das rote Spektrum zeigt jeweils die isolierte GYF-Domäne, das blaue Spektrum die GYF-Domäne nach Zugabe der Verbindung. Die untersuchte Verbindung ist mit Struktur und Bezeichnung in den Spektren angegeben. Die Probenzusammensetzungen sind der Tabelle 6.8.1 zu entnehmen.



6.9 Abkürzungsverzeichnis

Φ	hydrophobe Aminosäure (Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr oder Val)
AS	Aminosäure/ Aminosäuren
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BBP	<i>Branchpoint-bridging protein</i> , alternativer Name für Msl5
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CCR4	<i>Carbon catabolite repressor protein 4</i>
cDNA	komplementäre DNA
cfu	colony forming unit
CD2	<i>T-cell surface antigen CD2</i>
CD2BP2	CD2 bindendes Protein 2
CIAP	<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i>
CYFIP2	<i>Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2</i>
C-terminal	Carboxyterminal
D ₂ O	Deuteriumoxid
Da	Dalton
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E ₂₈₀	Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAP1	eIF4E-assoziiertes Protein
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
EVH1	<i>Ena/Vasp Homology domain 1</i>
FP	Fluoreszenzpolarisation
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung $g = 9,81\text{m/s}^2$, zur Bestimmung der relativen Zentrifugalkraft eines Rotors
GIGYF	<i>GRB10-interacting GYF protein</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein

GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
GST	Glutathion-S-Transferase
GYF	Domänenname, abgeleitet vom Ein-Buchstaben-Code des charakteristischen Glycin-Tyrosin-Phenylalanin Tripeptids innerhalb der Domäne
GYN4	<i>GYF domain-containing protein binding to Not4</i> (Swiss-Prot Eintrag: Q9FMM3)
h	Stunde, <i>hour</i>
HA	Hemagglutinin
His ₆	Hexahistidin
H ₂ O	Wasser
HSQC	heteronukleare Einquantenkohärenz, <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IMAC	immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IUP	intrinsisch ungefaltetes Protein
K	Kelvin
kb	Kilobasenpaare
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton (äquivalent zu kg·mol ⁻¹)
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LiAc	Lithiumacetat
Lsm5	<i>U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm5</i>
m	milli
M	Molarität in mol·L ⁻¹
M4K1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 1</i>
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (<i>matrix assisted laser desorption ionisation</i>)
MW	Molmasse, <i>Molecular Weight</i>
mA	Milliampère
mg	Milligramm
Min.	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar (mmol·l ⁻¹)

ms	Millisekunde
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
Msl5	<i>MUD synthetic-lethal 5</i> , alternativer Name für BBP
MUD2	<i>mutant synthetic-lethal with U1 snRNA 2</i>
Myr1	<i>MYR1</i> for multicopy suppressor of <i>YPT6</i> and <i>RIC</i> , alternativer Name für Syh1
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-terminal	Aminoterminal
NMR	Kernmagnetresonanz-Spektroskopie
NPWBP	Npw38-bindendes Protein
OD _{280/600}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280 bzw. 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PB	<i>Processing (P) Bodies</i>
PBS	phosphatgepufferte Saline (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
PERQ2	<i>PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 2</i> , alternativer Name für GIGYF2
PBMC	Mononukleare Zellen des peripheren Blutes (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>)
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
PPII	Polyprolin Typ II
ppm	Teilchen pro Million, <i>parts per million</i>
PRD	Prolinbindungsdomäne, <i>proline recognition domain</i>
PRS	prolinreiche Sequenz(en)
RNA	Ribonukleinsäure
RQCD1	<i>Required for Cell Differentiation 1 homolog</i>
RT	Raumtemperatur (25°C)
s.	siehe
sek	Sekunde
SD	<i>synthetic drop-out</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SG	<i>Stress Granules</i>
SH3	<i>Src-homology 3</i>

SILAC	stabile Isotopenmarkierung von Aminosäuren in der Zellkultur, (<i>stable isotope labeling by amino acids in cell cultur</i>)
snRNP	<i>small nuclear ribonucleoprotein particle</i>
Smy2	<i>Suppressor of MYO2-66 protein</i>
Syh1	<i>SMY2 homolog 2</i>
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TAP	Tandemaffinitätsaufreinigungs-Markierung
Tag	kurzes endständiges Peptid
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
Tween 20	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UEV	<i>ubiquitin E2 variant</i>
V	Volt
VUP	Viviane Uryga-Polowy
WT	Wildtyp
WW	Domänenname, abgeleitet von zwei konservierten Tryptophanresten innerhalb der Domäne
Y2H	Hefe-2-Hybrid (<i>Yeast Two-hybrid</i>)
YNB	Hefe-Stickstoffbase ohne Aminosäuren (<i>yeast nitrogen base without amino acids</i>)
YPD	Hefe Pepton Dextrose (<i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>)
μ	SI-Präfix: Mikro (10^{-6}), Millionstel
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	mikromolar

Publikationen

Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit:

Ash MR, Faelber K, **Kosslick D**, Albert GI, Roske Y, Kofler M, Schuemann M, Krause E, Freund C.: Conserved beta-hairpin recognition by the GYF domains of Smy2 and GIGYF2 in mRNA surveillance and vesicular transport complexes. *Structure*. 2010 Aug 11;18(8):944-54.

Kofler M, Schuemann M, Merz C, **Kosslick D**, Schlundt A, Tannert A, Schaefer M, Lührmann R, Krause E, Freund C.: Proline-rich sequence recognition: I. Marking GYF and WW domain assembly sites in early spliceosomal complexes. *Mol Cell Proteomics*. 2009 Nov;8(11):2461-73.

Uryga-Polowy V, **Kosslick D**, Freund C, Rademann J.: Resin-bound aminofluorescein for C-terminal labeling of peptides: high-affinity polarization probes binding to polyproline-specific GYF domains. *Chembiochem*. 2008 Oct 13;9(15):2452-62.

Veröffentlichungen während dieser Arbeit:

Schlundt A, Sticht J, Piotukh K, **Kosslick D**, Jahnke N, Keller S, Schuemann M, Krause E, Freund C.: Proline-rich sequence recognition: II. Proteomics analysis of Tsg101 ubiquitin-E2-like variant (UEV) interactions. *Mol Cell Proteomics*. 2009 Nov;8(11):2474-86.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christian Freund, für sein entgegengebrachtes Vertrauen, die sehr gute fachliche Betreuung und seine Unterstützung während der letzten Jahre.

Bei Herrn Prof. Dr. Markus Wahl möchte ich mich herzlich für seine Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Großer Dank gilt Herrn Dr. Eberhard Krause und Herrn Dr. Michael Schümann für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen. Auch den anderen Mitgliedern der AG E. Krause, insbesondere Frau Heike Stephanowitz, möchte ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft danken.

Allen weiteren Kooperationspartnern, Prof. Dr. Jörg Rademann und Dr. Viviane Uryga-Polowy sowie Dr. Ronald Kühne und Robert Opitz, die an der Erstellung der Ergebnisse beteiligt waren, danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Bei allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe möchte ich mich für die schöne Arbeitsatmosphäre und den wissenschaftlichen Austausch bedanken. Dr. Michael Kofler danke ich für die Einführung in das GYF-Projekt sowie Herrn Dr. Kirill Piotoukh für die Einführung in die Phagen-Display-Technik und die hilfreichen labortechnischen Hinweise. Katharina Thiemke und Kathrin Motzny, gilt ebenfalls großer Dank. Ohne Euch wären wir alle im Chaos versunken.

Mein herzlichster Dank gilt den Menschen, die mir besonders in den letzten Monaten mit Geduld und Hilfsbereitschaft zur Seite standen. Gesa möchte ich für die gute Zusammenarbeit am GYF-Projekt danken. Andreas, danke für Deine NMR-Nachhilfe und Deine Unterstützung bei allen weiteren Schwierigkeiten, die sich mir in der ganzen Zeit stellten! Sebastian und Bernhard, Euch Spezialisten in Proteinaufreinigung und Pymol, danke ich, dass Ihr mir immer

mit Rat und Tat zur Seite standet. Niko möchte ich für seine Diskussionsbereitschaft und die vielen kleinen Tipps danken. Diana, danke für's Dasein!

Ganz besonders möchte ich meinem geliebten Sascha und meiner Mutter danken, die mich immer unterstützt, verstanden und bestärkt haben. Ihr habt immer an mich geglaubt, auch wenn ich es manchmal nicht tat.