

## Inhaltsverzeichnis

<i>Summary</i>	<i>i</i>
<i>Zusammenfassung</i>	<i>ii</i>
<i>Danksagung</i>	<i>iii</i>
<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>iv</i>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das spezifische Immunsystem	1
1.1.1 Der T-Zell-Rezeptor-Komplex	2
1.2 Src-Typ Protein-Tyrosin-Kinasen	4
1.3 Die Lymphocytenspezifische Kinase Lck	5
1.4 Struktur der Src-Homologie 3-Domäne (SH3-Domäne)	7
1.4.1 SH3-Liganden und das xPxxP-Bindungsmotiv	8
1.5 HIV-1-Nef: Ein viraler SH3-Ligand	11
1.6 Methodischer Hintergrund	14
1.6.1 In vitro-Selektion mittels Phagendisplay	14
1.6.2 Bindungstest an immobilisierten Peptiden (PepSpot)	16
1.6.3 <sup>1</sup> H-Kernresonanz-Spektroskopie (1H-NMR)	16
Charakterisierung von Protein:Ligand-Interaktionen	17
1.7 Ziele der Arbeit	19
<b>2 Materialien</b>	<b>21</b>
2.1 Bakterienstämme	21
2.2 Phagendisplay-Peptid-Bibliothek	21
2.3 IMAGE-cDNA-Klone	22
2.4 Oligonukleotide	22
2.5 Peptide und PepSpot-Membran	23
2.6 Plasmide	23
2.7 Größenmarker	24
2.8 Enzyme, Proteine und Antikörper	24
2.9 Biochemikalien, Chemikalien und Kits	25
2.10 Sonstige Materialien	26
2.11 Datenbanken und Informationen zu DNA- und Aminosäuresequenzen sowie Strukturen von Proteinen	26
<b>3 Methoden</b>	<b>27</b>
3.1 Isolierung von DNA	27
3.1.1 Plasmidpräparation aus Escherichia coli (E. coli)	27
3.1.2 Isolierung von Einzelstrang-DNA aus M13-Phagen	27

3.2	Konzentrationsbestimmung von DNA	27
3.3	Gelelektrophorese von DNA	28
3.4	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	29
3.5	Klonierungstechniken	29
3.5.1	Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme	29
3.5.2	Dephosphorylierung	29
3.5.3	Ligation von DNA	30
3.6	Bakterienkultur	30
3.6.1	Kultivierung und Konservierung von E. coli-Stämmen	30
3.6.2	Herstellung kompetenter Zellen	30
3.6.3	Transformation von E. coli	31
3.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
3.7.1	Amplifikation von DNA	32
3.7.2	Kolonie-PCR mit E. coli	32
3.8	Sequenzierung von DNA	33
3.9	Klonierung und Transformation der SH3-Konstrukte	34
3.10	SDS-PAGE nach Laemmli	35
3.10.1	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	37
3.11	Bestimmung der Protein- und Peptidkonzentration	37
3.11.1	Konzentrationsbestimmung mittels UV/VIS-Spektrometer	37
3.11.2	Konzentrationsbestimmung nach Bradford	37
3.11.3	Bestimmung der Peptidkonzentration mit dem BCA-Kit	38
3.12	Expression von rekombinanten Proteinen	38
3.13	Zellaufschluss	39
3.14	Proteinreinigungen	40
3.14.1	Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose	40
3.14.2	Abspaltung des Fusionspartners mit Thrombin bzw. mit PreScission	41
3.14.3	Größenausschlusschromatographie zur Trennung der Spaltprodukte.	41
3.15	Phagendisplay	42
3.16	Anti-Phagen-ELISA - Bestimmung der relativen Lck-SH3-Bindungsaktivität einzelner Phagenklone	44
3.17	PepSpot-Membran-Technologie	44
3.17.1	Inkubation der PepSpot-Membran	45
3.17.2	Regeneration der PepSpot-Membran	45
3.18	Fluoreszenzspektroskopische Messung	46
3.18.1	Bestimmung der Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) aus den Fluoreszenzdaten	47
3.19	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie	48
3.20	NMR-Spektroskopie	49
3.20.1	Probenvorbereitung für die NMR-Messung	49
3.20.2	NMR-Messbedingungen und Spektrenauswertung	49
3.20.3	Bestimmung der Differenz der chemischen Verschiebung bei Peptid-Bindung	50
3.20.4	Bestimmung der Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) aus NMR-Kompetitionsexperimenten	50

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>52</b>
4.1	Klonierung der Glutathion-S-Transferase-SH3-Fusionsproteine	52
4.2	Expression und Reinigung der SH3-Domänen	53
4.3	Identifizierung von Peptiden mit Lck-SH3-Bindungseigenschaften	55
4.4	Bindungsanalyse der Phagendisplay-Peptide (PD-Peptide) und deren Varianten mittels der PepSpot-Membran	57
4.4.1	Bindung der Lck-SH3-Domäne an PepSpots der Phagendisplay-Peptide und deren Varianten	59
4.4.2	Untersuchung der Bindungsspezifität der PD-Peptide und deren Varianten	60
4.4.3	Optimierung der Bindungsaffinität des Peptides PD1-R an die Lck-SH3	62
4.5	Bestimmung der Ligandenspezifität aus Sequenzen von physiologischen Interaktionspartnern der Lck-SH3-Domäne	64
4.5.1	Gemeinsame Sequenzelemente der physiologischen Lck-SH3-Interaktionspartner	68
4.6	Lck-SH3-Bindung an bekannten in vitro selektierten Konsensus-Peptiden	70
4.7	Bestimmung der Bindungsaffinität der Phagendisplay-Peptide PD1 und PD1-R an die Lck-SH3-Domäne	71
4.8	Untersuchung der Konformation der Phagendisplay-Peptide PD1 und PD1-R und der Peptid-SH3-Komplexe	74
4.9	NMR-Spektroskopische Untersuchungen der SH3:Peptid-Interaktionen	77
4.9.1	Strukturelle Charakterisierung der Bindung von PD1 und PD1-R an die Lck-SH3-Domäne	77
4.9.2	Strukturelle Charakterisierung der Bindung von PD1 und PD1-R an die Hck-SH3-Domäne	82
4.9.3	Untersuchung der Stabilität der SH3-Peptid-Komplexe	87
4.9.4	Bindung von HIV-1 Nef an die Lck- und Hck-SH3-Domäne	89
4.9.5	Kompetition von HIV-1-Nef und PD1-R um die Lck-SH3-Bindung	90
4.9.6	Kompetition von HIV-1-Nef und PD1 um die Hck-SH3-Bindung	92
4.9.7	Bestimmung des $K_D$ -Wertes für den HIV-1-Nef-Hck-SH3-Komplex aus den NMR-Kompetitionsexperimenten	93
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>96</b>
5.1	Die Klonierung, Expression und Reinigung der SH3-Domänen von Lck, Hck, Fyn, Src, PI3K und Abl verlief erfolgreich	96
5.2	Phagendisplay führt zur Identifizierung von vier neuen Klasse-I-Liganden der Lck-SH3-Domäne	97
5.2.1	Die Peptide PD1, PD2 und PD4 sowie die Variante PD1-R gehören zu einer speziellen Gruppe von Klasse-I-Liganden, den Lig-I $\square$ -Peptiden	99
5.3	Die Analyse der „PD-Peptide“ und deren Varianten in Form immobilisierter PepSpots erlaubt einen Einblick in die Bindungsspezifität der Lck-SH3-Domäne	101
5.3.2	Alle PD-Peptid-Varianten mit Arginin-Substitution an Position P-3 zeigen eine stärkere Bindung an die Lck-SH3 als die Ausgangspeptide	101
5.3.3	Histidin an Position P-6 der PD-Peptide ist essentiell für die Lck-SH3-Bindung und trägt zur Spezifität der Bindung bei	102
5.3.4	Die Substitutionsanalyse von PD-1-R identifiziert Peptide mit verbesserten Lck-SH3-Bindungseigenschaften	104

5.4	Die PepSpot-Analyse natürlicher Lck-SH3-Bindungspartner erlaubt die Identifizierung ihrer potenziellen Lck-SH3-Bindungsregionen	105
5.4.1	Lck-SH3 interagiert mit der Aminosäureregion 816 bis 830 von c-Cbl und bevorzugt mit drei Regionen von Cbl-b	106
5.4.2	Lck-SH3 bindet an die Aminosäureregion 34 bis 48 von Sam68, einem RNA-Bindungsprotein	107
5.4.3	Lck-SH3 interagiert mit der Aminosäureregion 62 bis 76 des menschlichen Fas-Liganden, jedoch nicht mit der entsprechenden Region von FasL aus Maus	108
5.5	Alle untersuchten nativen Lck-SH3-Bindungspartner können als Klasse II-Liganden eingestuft werden und binden in entgegengesetzter Orientierung wie die PD-Peptide	109
5.5.1	In vitro werden Klasse-I-Liganden selektiert, in vivo kommen nur Klasse-II-Liganden vor	110
5.6	PD-Peptide PD1 und PD1-R interagieren mit den SH3-Domänen	113
5.6.1	PD1 und PD1-R bilden schon als freie Peptide eine PPII-Helix aus	113
5.6.2	PD1 und PD1-R binden neben Lck-SH3 auch die SH3-Domänen anderer Src-Typ-Kinasen	114
5.6.3	PD1 und PD1-R binden an die für SH3-Liganden typischen Regionen auf der Lck-SH3-Domäne	116
5.6.4	PD1 und PD1-R binden im oberen nanomolaren Bereich an die Hck-SH3-Domäne	118
5.7	Die Strukturbestimmung der SH3:PD-Komplexe ist möglich	120
5.8	HIV-1-Nef interagiert mit den SH3-Domänen von Lck und Hck	122
5.8.1	PD1 und PD1-R verdrängen HIV-1-Nef aus bestehenden Lck-SH3:Nef- und Hck-SH3:Nef-Komplexen	123
5.9	Ausblick	126
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>128</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>139</b>
7.1	Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	139
7.2	Abbildungsverzeichnis	142
7.3	Tabellenverzeichnis	144
7.4	DNA- und Proteinsequenzen	145
7.4.1	Abl-SH3	145
7.4.2	Fyn-SH3	145
7.4.3	Hck-SH3	145
7.4.4	Lck-SH3	146
7.4.5	PI3K-SH3	146
7.4.6	Src-SH3	146