

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	VI
Summary	IX
Zusammenfassung	XI
1 Einleitung	1
1.1 Src-Typ Protein-Tyrosin-Kinasen	2
1.2 Die hämatopoetische Zell-Kinase Hck	5
1.2.1 Die Rolle von Hck in der $Fc\gamma$ -Rezeptor-Signaltransduktion	6
1.2.2 Die Rolle von Hck in der Zytokin-Signaltransduktion	8
1.2.3 Die Rolle von Hck in der Integrin-Signaltransduktion	9
1.2.4 Die Rolle von Hck bei der HIV-I Infektion	10
1.3 Die Src-Homologie 3 (SH3)-Domäne	12
1.3.1 Die Struktur der SH3-Domäne	12
1.3.2 Bindungseigenschaften der SH3-Domäne	13
1.4 NMR-Spektroskopie	16
1.5 Vorarbeiten	18
1.6 Zielsetzung der Arbeit	20
2 Material und Methoden	23
2.1 Verwendete Materialien	23
2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide	23
2.1.2 Peptide	23
2.1.3 Enzyme und Chemikalien	24
2.1.4 Sonstige Materialien	24
2.1.5 Datenbanken	25
2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Laemmli)	25
2.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	26

2.4	Reinigung des rekombinanten Proteins HckSH3	27
2.4.1	Expression von rekombinatem HckSH3	27
2.4.2	Zellaufschluss	28
2.4.3	Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose	29
2.4.4	Abspaltung des GST-Affinitäts- <i>tags</i> mittels PreScission-Protease	29
2.4.5	Größenausschluß-Chromatographie	30
2.5	Fluoreszenzspektroskopie	31
2.5.1	Dissoziationskonstanten-Bestimmung mittels Fluoreszenzspektroskopie	32
2.6	Kernresonanzspektroskopie	33
2.6.1	Probenvorbereitung	33
2.6.2	NMR-Experimente	33
2.6.3	NOE-Zuordnung und Strukturberechnung	36
2.6.4	Kartierung der Bindungsstelle aus Analyse der Differenz der chemischen Verschiebungen bei Peptidbindung	38
3	Ergebnisse	41
3.1	Expression und Reinigung des rekombinanten Proteins HckSH3 aus <i>E. coli</i>	41
3.2	Fluoreszenztitrations-Experimente mit PD1-Mutanten	44
3.3	Sequenzspezifische Resonanzzuordnung	45
3.3.1	Zuordnung der Proteinrückgrat-Resonanzen der freien Hck SH3-Domäne	47
3.3.2	Zuordnung der Proteinrückgrat-Resonanzen des HckSH3:PD1-Komplexes	48
3.3.3	Zuordnung der Seitenketten-Resonanzen des HckSH3:PD1-Komplexes	49
3.3.4	Zuordnung der Protonen-Resonanzen des PD1-Peptids	50
3.3.5	Vollständigkeit der Resonanzzuordnung	51
3.4	Bestimmung der struktureinschränkende Parameter aus NOE-Korrelationen	52
3.4.1	Analyse der NOE-abgeleiteten Distanzeinschränkungen	54
3.5	Raumstrukturberechnung und -analyse	56
3.6	Kartierung der HckSH3:PD1-Bindungsstelle	60
3.7	Untersuchung der HckSH3:PD1-Bindungsstelle	63
3.8	Untersuchung von H ₂ O-/D ₂ O-Austauschraten der HckSH3-Amidprotonen .	67
3.9	Vergleich mit anderen HckSH3-Strukturen	70
4	Diskussion	73
4.1	Standardverfahren für Proteinreinigungen lieferte ausreichende Mengen an rekombinatem HckSH3	73
4.2	NMR-spektroskopische Experimente ermöglichten nahezu vollständige Resonanzzuordnung	74
4.3	Lösungsstruktur des HckSH3:PD1-Komplexes	74
4.3.1	Die Bindung von PD1 stabilisiert die HckSH3-Struktur	75

4.3.2	HckSH3:PD1-Komplexstruktur zeigt einige deutliche Abweichungen zu bekannten HckSH3-Strukturen	76
4.3.3	Bindungsstellenkartierung bestätigt die Ergebnisse der Strukturanalysen	77
4.3.4	PD1 ist ein Klasse-I'-Ligand von HckSH3	77
4.3.5	Die aminoterminalen PD1-Aminosäurereste zeigen eine untypische Ligandensequenz mit neuen Bindungseigenschaften zu HckSH3 . . .	79
4.4	PD1 ist der erste hochaffine Nicht-Standard-Ligand für Src-Typ SH3-Domänen	83
4.5	Vorhersage-Algorithmen für SH3-Bindungspartner erkennen PD1 nicht als hochaffinen HckSH3-Liganden	84
4.6	Es existieren PD1-ähnliche Sequenzen im humanen Proteom	86
4.7	Ausblick	88
5	Anhang	91
5.1	Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	91
5.2	Ein- und Dreibuchstaben-Aminosäure-Kode	94
	Literaturverzeichnis	95
	Danksagung	114